

Université de Montréal

# **Études des interactions entre la mucine et certains polymères bioadhésifs**

par  
Siwar Chayed

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences  
en sciences pharmaceutiques  
option technologie pharmaceutique

Août, 2005

© Siwar Chayed, 2005





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté de Pharmacie

Ce mémoire intitulé :

Étude des interactions entre la mucine et certains polymères bioadhésifs

présenté par :

Siwar Chayed

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Professeur Patrice Hildgen

Président-rapporteur

Professeur Françoise Winnik

Directrice de recherche

Professeur Géraldine Bazuin

Membre du jury

## Résumé

Cette étude met en oeuvre les propriétés mucoadhésives de l'hydroxypropyl cellulose et du dextran modifiés (HM-HPC, HM-DEX10) ou non (HPC, et DEX10) par des groupements hydrophobes. Des études antérieures ont démontré que les polysaccharides neutres telle que l'HPC ne montrait virtuellement aucune interaction avec la mucine. Cependant, ce polymère est connu comme étant bioadhésif et même plus bioadhésif que le DEX10. Ainsi, les interactions entre la mucine et ces polymères ont été étudiées en utilisant trois méthodes différentes, soit la microbalance à cristal de quartz (QCM) et la résonance plasmons de surface (SPR) pour les études d'adhésion en surface et la titration calorimétrique isothermique (ITC) pour l'étude d'adhésion en solution.

L'adsorption de la mucine dans un premier temps et celle du polymère par la suite ont été déterminées en fonction du pH, de la température et de la force ionique du milieu par QCM. L'ajout de groupements hydrophobes sur l'HPC et le DEX10 augmente l'adhésion de ces polymères sur la mucine du moment où l'adsorption de ces derniers est meilleure que celle des polymères non modifiés. Toutes les mesures ont été faites à pH acide pour être dans les conditions physiologiques de l'estomac humain (pH 2 à 4). Les résultats montrent que l'adsorption, et de la mucine et du polymère ne dépend ni du pH ni de la température. Cependant, la quantité de mucine et de polymère adsorbée dépend de la valeur de la force ionique. Quand la

concentration de sel du milieu augmente, l'adsorption diminue, ce qui correspond au phénomène de « salting-out ».

En plus de l'étude d'adsorption, la SPR a aussi été utilisée pour étudier la stabilité des films formés par la mucine et le polymère modifié à température ambiante (pH 3, 0.15 M de NaCl). Une désorption progressive est notée avec l'augmentation du pH du milieu. Cependant, une certaine quantité du polymère demeure adsorbée.

**Mots-clés :** bio(muco)adhésion, mucine, hydroxypropyl cellulose, HM-HPC, dextran, HM-DEX10, micelles polymères, microbalance à cristal de quartz, résonance plasmons de surface, titration calorimétrique isothermique.

**ABSTRACT.**

This study investigated the mucoadhesive property of non modified and hydrophobically modified hydroxypropyl cellulose and dextran, i.e. HPC, HM-HPC and DEX10, HM-DEX10. Prior studies demonstrated that the neutral polysaccharides such HPC gave virtually no interaction with the mucin. However, this polymer is known to be more bioadhesif than dextran.

Mucin interactions with these polymers were investigated using differents methods: quartz crystal microbalance (QCM), surface plasmon resonance (SPR) and isothermal titration calorimetry (ITC). Mucin and polymer adsorptions were determined as a function of pH, temperature and ionic strength using QCM. This technique enabled us to measure both frequency shifts ( $\Delta f$ ), i.e. the increase in mass on the surface, and simultaneously dissipation shifts ( $\Delta D$ ), i.e., the viscoelastic energy losses on the surface. Changes in the parameters measured by the QCM technique reflect the dynamic character of the adhesion process. We were able to show clear differences in the viscoelastic behavior of modified and non modified polymers attached to the mucin. The addition of hydrophobic groups on HPC and DEX10 increase the adhesion of both polymers onto mucin since the adsorption of these polymers was more important than the adsorption of the non modified ones. All the measurements were performed at acidic pH to be in physiological conditions in the human stomach (pH 3). Our results showed that the adsorption does not change with increasing pH and with increasing temperature from 25°C to 37°C. However,

the adsorbed amount is ionic strength dependent, decreasing with increasing monovalent salt concentration. SPR was also used to study the stability of the bilayer formed by mucin and modified polymer at room temperature (25°C, 0.15 M NaCl). A progressive desorption of the HM-polymer was observed as a function of time with increasing pH.

**KEY WORDS:** bio(muco)adhesion, bovine submaxillary mucin, hydroxypropyl cellulose, HM-HPC, dextran, HM-DEX10, polymeric micelles, quartz crystal microbalance, surface plasmon resonance, isothermal titration calorimetry.



## Remerciements

J'aimerais remercier en tout premier lieu ma directrice de recherche, P<sup>r</sup> Françoise Winnik, pour son aide et pour les précieux conseils qu'elle m'a fournis.

J'aimerais aussi remercier les personnes avec qui j'ai travaillé pendant ces deux dernières années, en particulier Piotr Kujawa qui m'a beaucoup aidé et m'a prodigué aide et conseils sans lesquels certains problèmes n'auraient pas été résolus. Florence Segui pour sa présence et son amitié, Mira Francis qui m'a aidé et conseillé à mon arrivée au sein de ce groupe. Rodolphe Obeid, Yali Yang, Charbel Diab, Oscar Suarez, Sania Mansouri, Pei Lian Ma, Sophie Nguyen, Marcio et Vera Tiera m'ont tous aidé à certains moments et je les remercie de leurs diverses contributions.

A mes parents, pour leur soutien constant, leur aide et leur amour. Que Dieu les garde.

A mes frères, Wadia, Zouhair, Nawfel, Allaa et Zakaria qui sont toujours là pour moi.

A Salma dont l'amitié et la gentillesse m'ont soutenue dans les moments les plus difficiles.

*A mes parents, à mes frères...*

## Table des matières

<b>1- INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 BIOADHÉSION ET MUCOADHÉSION .....	2
1.1.1 Définitions .....	2
1.1.2 Le mucus .....	2
1.1.3 Les mucines .....	3
1.2 INTERACTIONS RESPONSABLES DE LA BIOADHÉSION .....	6
1.2.1 Interactions électrostatiques .....	7
1.2.2 Les forces de van der waals .....	8
1.2.3 Interactions hydrophobes .....	9
1.3 POLYMÈRES BIOADHÉSIFS .....	10
1.3.1 Généralités .....	10
1.3.2 Polymères étudiés .....	11
1.3.2.1 L'hydroxypropylcellulose et le dextran non modifiés .....	11
1.3.2.1.1 L' hydroxypropylcellulose (HPC) .....	11
1.3.2.1.1.1 Effet du pH .....	12
1.3.2.1.1.2 Effet de sels .....	12
1.3.2.1.1.3 Effet de la température .....	13
1.3.2.1.2 Le dextran (DEX) .....	13
1.3.2.2 L'HM-HPC et l'HM-DEX .....	16
1.3.2.2.1 Le polyoxyéthylène (POE) ou Brij <sup>®</sup> .....	16

1.3.2.2.2	L'HM-HPC .....	17
1.3.2.2.3	L'HM-DEX .....	18
1.3.2.3	le chitosan .....	19
1.4	RÔLE DE LA BIOADHÉSION DANS L'ADMINISTRATION ORALE DES MÉDICAMENTS .....	21
1.5	MÉTHODES EXPÉRIMENTALES .....	22
1.5.1	Microbalance à cristal de quartz .....	22
1.5.1.1	Principe de la méthode .....	22
1.5.1.2	Paramètres étudiés .....	23
1.5.1.3	Domaines d'application .....	24
1.5.2	Résonance plasmons de surface .....	24
1.5.2.1	Principe de la méthode .....	24
1.5.2.2	Paramètres étudiés .....	26
1.5.2.3	Domaines d'application .....	27
1.5.3	Titration calorimétrique isothermique .....	28
1.5.3.1	Principe de la méthode .....	28
1.5.3.2	Paramètres étudiés .....	33
1.5.3.3	Domaines d'application .....	33
1.6	CONCLUSIONS .....	34
1.7	RÉFÉRENCES .....	36
	<b>2-INTERACTIONS BETWEEN MUCIN AND BIOADHESIVE POLYMERS .....</b>	<b>43</b>

<b>3- RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>83</b>
3.1 Études d'adsorption des micelles d'HM-HPC et d'HM-DEX10 .....	85
3.2 Étude par QCM de la mucoadhésion de HM-HPC et HM-Dex avec différents groupements hydrophobes .....	88
3.2.1 Études d'HM-HPC .....	89
3.2.2 Études d'HM-DEX10 .....	90
3.3 Étude par SPR de la mucoadhésion de HM-HPC et HM-Dex avec différents groupements hydrophobes .....	90
3.3.1 Études d'HM-HPC .....	91
3.3.2 Études d'HM-DEX10 .....	93
3.4 Références .....	94
<b>4- CONCLUSIONS GÉNÉRALES .....</b>	<b>95</b>

## Liste des abréviations

GI	Gastrointestinal
Ser	Sérine
Thr	Thréonine
Gal-Nac	N-acétyl-galactosamine
HPC	Hydroxypropylcellulose
DS	Degré de substitution
DEX10	Dextran
DA	Degré d'acétylation
Mw	Masse molaire
QCM	Microbalance à cristal de quartz
nm	nanomètre
MHz	MégaHertz
ITC	Titration Calorimétrique Isothermique
SPR	Résonance Plasmons de Surface
$\Delta H$	Enthalpie de transition
HCl	Acide chlorhydrique
NaCl	Chlorure de sodium
POE	Polyoxyéthylène
CAC	Concentration Micellaire Critique

UV	Ultraviolet
T	Température
[NaCl]	Concentration en NaCl
IR	Infrarouge
NMR	Résonance magnétique nucléaire
PEI	Polyéthylène imine

## Liste des tableaux

**Tableau 1.1.** Compositions en acides aminés des mucines GI humaines.....3

**Tableau 1.2.** Relation entre le degré de branchement et la Mw.....15

**Tableau 1.3.** Caractéristiques moléculaires et physico-chimiques des  
surfactants  $(POE)_y-C_n$  et des copolymères HPC-g-  $(POE)_y-C_n$  .....18

**Tableau 3.1.** Propriétés des différents polymères étudiés.....88



## Liste des figures

<b>Figure 1.1.</b> Liaison Ser/Thr de la mucine.....	4
<b>Figure 1.2.</b> Structure chimique des unités de sucres trouvées généralement dans les molécules de mucine.....	5
<b>Figure 1.3.</b> Structure de l'HPC.....	12
<b>Figure 1.4.</b> Structure d'un fragment d'une molécule de Dex.....	14
<b>Figure 1.5.</b> Distribution de Mw du Dex 10.....	15
<b>Figure 1.6.</b> Structure du Brij <sup>®</sup> .....	16
<b>Figure 1.7.</b> Structure du copolymère HPC-g-(POE) <sub>y</sub> -C <sub>n</sub> .....	17
<b>Figure 1.8.</b> Structure du Dextran modifié.....	19
<b>Figure 1.9.</b> Structure du Chitosan.....	20
<b>Figure 1.10.</b> Schéma illustrant le principe de la SPR.....	26
<b>Figure 1.11.</b> Enceinte d'un appareil d'ITC.....	29
<b>Figure 1.12.</b> Exemple de thermogramme.....	30
<b>Figure 1.13.</b> Énergie libérée/mole d'injectant vs le ratio molaire.....	32
<b>Figure 3.1.</b> Masse de mucine adsorbée (en ng/cm <sup>2</sup> ) sur la surface modifiée du cristal d'or en fonction du pH du milieu.....	84

- Figure 3.2.** Étude par QCM et SPR de la mucoadhésion de HM-HPC et HM-Dex avec différents groupements hydrophobes .....88
- Figure 3.3.** Étude de mucoadhésion du Dex-B56 à différents pourcentages de greffage.....90
- Figure 3.4.** Étude d'adsorption du système mucine/HM-HPC sur la surface d'or modifiée utilisant la SPR. Les (\*) indiquent les étapes de rinçage avec 2 mL de solution tampon et les flèches montrent le temps d'injection de la mucine et des polymères.....91
- Figure 3.5.** Étude d'adsorption du système mucine/HM-DEX10 sur la surface d'or modifiée utilisant la SPR. Les (\*) indiquent les étapes de rinçage avec 2 mL de solution tampon et les flèches montrent le temps d'injection de la mucine et des polymères. ....93

## 1. Introduction

L'administration de médicaments dans l'organisme humain peut être effectuée par différentes voies (voie orale, intra-veineuse, rectale, nasale, sublinguale, etc...). Cependant, l'administration par voie orale est connue comme étant la plus facile, la plus commune et la plus commode surtout lorsqu'une administration répétée est nécessaire<sup>1,2,3</sup>. Le problème qui se pose pour cette voie et qui pose un défi important pour de nombreux chercheurs concerne entre autres les médicaments qui, une fois rendus au niveau gastro-intestinal (GI), perdent leur efficacité suite à un quelconque mécanisme (dégradations enzymatiques, faible solubilité, etc...)<sup>4</sup>. Néanmoins, plusieurs stratégies peuvent être utilisées afin d'augmenter l'efficacité de ces médicaments. Le fait que le contact de ces derniers avec le mucus soit la première étape avant l'absorption oriente certaines recherches vers l'étude de la bioadhésion<sup>3,4</sup>.

Le domaine de relargage de médicaments comprend plusieurs volets d'études. Le phénomène de mucoadhésion constitue un de ces volets<sup>5,6,7</sup>. Cependant, une plus large compréhension du processus moléculaire de ce phénomène peut aider à mieux le cerner. Il est donc important de considérer la nature du mucus, en particulier sa composition en mucines qui sont les principaux composants. Toutefois, l'étude des éventuelles interactions entre ce dernier, qui constitue une cible primaire dans le domaine du relargage des médicaments, et certains polymères ayant des propriétés bioadhésives est un point intéressant.

## **1.1 Bioadhésion et Mucoadhésion**

### 1.1.1 Définitions:

Le terme de « bioadhésion » peut être utilisé pour définir l'attachement d'une macromolécule, naturelle ou synthétique, à un substrat biologique. Lorsque ce substrat biologique est la surface d'une muqueuse, cette macromolécule va, en premier, adhérer et interagir avec la couche de mucus qui tapisse cette muqueuse. Ce phénomène est appelé « Mucoadhésion »<sup>3,8,9</sup>.

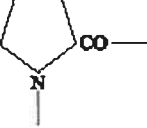
### 1.1.2 Le mucus:

Le mucus est une substance fluide ou légèrement solide, de consistance visqueuse, d'aspect translucide sécrétée par les glandes muqueuses et les cellules caliciformes<sup>10</sup>. Les glandes muqueuses appartiennent aux cellules muqueuses qui sont des cellules recouvrant l'intérieur des organes creux comme l'intestin par exemple. Le rôle du mucus est de protéger la muqueuse qu'il tapisse. Le mucus est composé de glycoprotéines (mucines), d'eau (plus que 95% en poids), de sels inorganiques (environ 1% en poids), de protéines, de lipides et de mucopolysaccharides<sup>5,10,11</sup>. Cependant, les composants principaux restent les mucines qui représentent plus que 80% des composants organiques du mucus<sup>11</sup>. Ces mucines sont des glycoprotéines qui dictent les propriétés du mucus et surtout sa viscoélasticité et sa propriété protectrice<sup>5,11,12,13</sup>.

### 1.1.3 Les mucines:

La mucine est une macromolécule de masse molaire allant de 0.5 à plus de 20 MDa<sup>5</sup>. Il s'agit d'une glycoprotéine dont plus de la moitié est constituée d'environ 150 chaînons oligosaccharidiques, liés par une liaison osidique à l'oxygène de la fonction hydroxyle d'une sérine (Ser) ou d'une thréonine (Thr). C'est une protéine O-glycosylée<sup>10,11,14,15,16,17</sup>. Dans sa composition en acides aminés, les résidus Ser et Thr sont dominants, composant 25-40% de l'ensemble des acides aminés (*Tableau 1*)<sup>11</sup>.

**Tableau 1.1 :** Compositions en acides aminés des mucines GI humaines<sup>11</sup>.

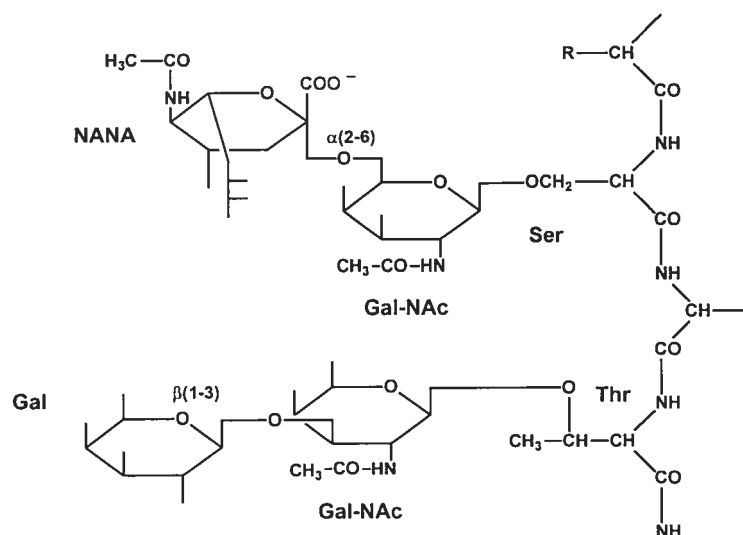
$\begin{array}{c} \text{-CO-CH-NH-} \\   \\ \text{R} \end{array}$	R	% dans l'intestin	% dans l'estomac
Thr	$\begin{array}{c} \text{-CH-OH} \end{array}$	16.8%	25.3%
Ser	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{-CH}_2\text{-OH} \end{array}$	10.5%	14.2%
Pyr		9.5%	17.8%
Glu	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	8.7%	4.7%
Asp	$\text{-CH}_2\text{-COOH}$	8.1%	2.4%
Ala	$\text{-CH}_3$	6.5%	10.8%
Gly	$\text{-H}$	7.4%	6.7%
Arg	$\begin{array}{c} \text{NH} \\    \\ \text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-C-NH}_2 \end{array}$	3.1%	2.1%
Lys	$\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$	3.3%	4.8%
Cys	$\text{-CH}_2\text{-SH}$	1.5%	-

Les oligosaccharides des mucines comprennent le plus souvent deux oses ou dérivés d'oses. Cependant, des structures plus complexes peuvent porter jusqu'à 15 oses. Le

premier d'entre eux, dont la fonction aldéhyde est liée à l'acide aminé, est une N-acétylgalactosamine (Gal-NAc) (*Figure 1.1*).

La richesse des mucines en glycanes en fait des molécules résistantes aux enzymes protéolytiques endogènes ou microbiennes. C'est ainsi que les mucines assurent la protection de nos épithéliums digestifs ou respiratoires<sup>10</sup>.

Au niveau gastrique, le rôle de ces mucines, en plus de la lubrification du bol alimentaire, est de protéger la muqueuse contre l'acidité du suc gastrique<sup>18</sup>.



***Figure 1.1*** : Liaison Ser/Thr de la mucine.

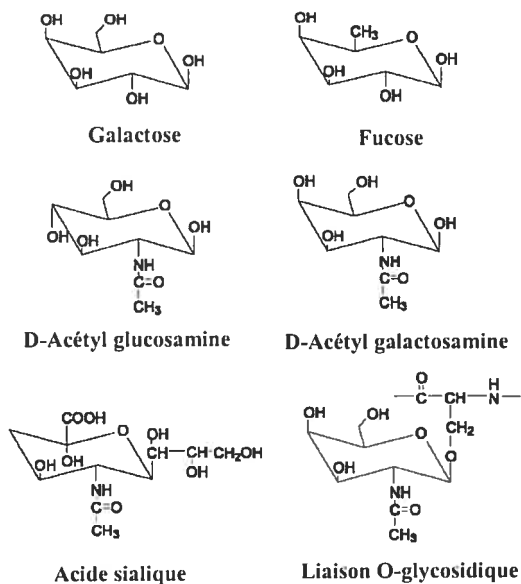
La mucine a fait l'objet de plusieurs études dans les domaines de bioadhésion et de relargage de médicaments surtout avec l'utilisation de polymères bioadhésifs. Malheureusement, le mécanisme des interactions entre les polymères et la mucine est relativement peu connu. Il a été suggéré par plusieurs chercheurs que l'interaction initiale entre un polymère donné et une surface biologique se fait par interactions

électrostatiques, liaisons van der Waals ou autres, comme par exemple, les liaisons faibles<sup>19,20</sup>.

L'importance de la mucine dans ce domaine réside dans le fait qu'elle possède 2 types de résidus pour une interaction mucoadhésive potentielle (*Figure 1.2*) :

- la fonction acide sur l'acide sialique; le point isoélectrique de l'acide sialique étant de 3, cette fonction peut être chargée négativement à un pH supérieur à cette valeur<sup>5,21</sup>.
- le groupement méthyle hydrophobe sur les résidus fucose<sup>5</sup>.

Plusieurs études de rhéologie du processus de bioadhésion ont aussi été effectuées que ce soit l'évaluation des mélanges mucine/polymères ou autres<sup>22,23,24</sup>.



***Figure 1.2*** : Structure chimique des unités de sucres trouvées généralement dans les molécules de mucines.

## ***1.2 Interactions responsables de la bioadhésion:***

Plusieurs théories ont été proposées afin d'expliquer les événements moléculaires se produisant durant le phénomène de bioadhésion. Cependant, une analyse poussée des interactions entre la mucine et les chaînes de polymères en solution aqueuse est nécessaire pour élucider plusieurs problèmes fondamentaux<sup>11</sup>. Ceci a été le sujet d'étude de plusieurs chercheurs.

Il est connu que les mucines contiennent de nombreux groupements pouvant former des ponts hydrogène (ponts H), tels les groupements hydroxyles sur les branches de sucres, les groupements amides sur la chaîne principale et quelques groupements carboxyles sur les terminaisons des chaînes qui forment les branches. Il est donc raisonnable de considérer la liaison H comme l'interaction primaire pour les mucines<sup>8,11,25</sup>. Toutefois, comme mentionnée auparavant, les mucines contiennent également deux groupements pouvant être chargés négativement à  $\text{pH} > 3$  (l'acide sialique et les sucres sulfatés). Étant donné que les liaisons faisant intervenir des groupes chargés sont plus fortes que les liaisons entre les groupements neutres, la capacité de ceux-ci à former des liaisons H est donc plus grande<sup>11</sup>.

Il a aussi été suggéré par plusieurs chercheurs que l'interaction initiale qui survient entre un polymère et la surface biologique se faisait à travers une interaction électrostatique suivie par un couplage mécanique des chaînes du polymère, des liaisons van der Waals, ou autres (liaisons faibles)<sup>19,26</sup>.



### 1.2.1 Interactions électrostatiques :

Les interactions électrostatiques peuvent être de type ion-ion, ion-dipôle ou dipôle-dipôle. Les dipôles peuvent être permanents ou induits. Les interactions ion-ion sont impliquées entre des molécules possédant une charge électrique permanente. Ces liens ont une longueur variant entre 0,2 et 0,3 nm et ont une énergie potentielle située entre 25 et 50 kJ·mol<sup>-1</sup><sup>27</sup>. La force d'interaction dépend des charges des molécules, de la distance entre les molécules et de la constante diélectrique du milieu<sup>28</sup>. Elle peut être exprimée par l'équation 1.

$$(1) \quad F = \frac{q_1 q_2}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r r^2}$$

où  $q$  : charge des molécules (C)

$\epsilon_0$  : constante diélectrique du vide ( $8,85419 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$ )

$\epsilon_r$  : constante diélectrique relative (sans unité)

Les interactions électrostatiques ion-ion ont une plus grande portée que les autres types d'interactions électrostatiques<sup>28</sup>. Les interactions électrostatiques peuvent être répulsives ou attractives selon le signe de la charge. L'énergie potentielle  $\Gamma_{12}$  entre deux ions 1 et 2 est calculée par l'équation 2.

$$(2) \quad \Gamma_{12} = \frac{z_1 z_2 e^2}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r}$$

où  $e$  : charge élémentaire ( $1,60218 \times 10^{-19}$  C)

$z$  : valence des ions

$r$  : distance entre les ions ( $\text{cm}^2$ ).

Les ponts H sont un cas particulier des interactions électrostatiques dipôle-dipôle. Ils se forment entre un atome électronégatif donneur de doublet d'électrons (F, O, N) et un hydrogène lié à un atome électronégatif qui est l'accepteur d'électrons. La force des ponts H dépend de l'électronégativité et de l'orientation des donneurs et accepteurs d'électrons. Les ponts H ont une énergie potentielle entre 10 et 40  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  et une longueur entre 0,2 et 0,3  $\text{nm}^{27}$ .

### 1.2.2 Les forces de van der Waals :

De faibles forces intermoléculaires apparaissent entre tous les atomes neutres lors d'interactions électrostatiques transitoires. Ces forces sont les forces de van der Waals. Elles n'apparaissent que lorsque les atomes sont très proches. Elles proviennent de dipôles infinitésimaux produits dans les atomes par le mouvement des électrons autour de leur noyau chargé positivement. Ces forces représentent donc l'attraction électrostatique entre le noyau d'un atome et les électrons d'un autre atome.

Quand les atomes soumis à des forces de van der Waals se rapprochent trop, ils subissent une forte répulsion. Par contre, l'attraction est pratiquement nulle quand la distance interatomique dépasse la somme des distances d'empilement optimal, distance appelée rayon de van der Waals. Quand deux atomes sont distants d'une valeur correspondant à la somme de leur rayon de van der Waals, la force qui les attire est alors maximale.

Ce sont des forces dont l'énergie de liaison est encore plus faible que celle des liaisons hydrogène (environ 0.418 à 4.18 kJ.mol<sup>-1</sup>).

### 1.2.3 Interactions hydrophobes :

Les molécules dépourvues de groupes chargés ou d'atomes capables de former des liaisons hydrogène sont dénommées substances **hydrophobes**.

Si une molécule hydrophobe entre dans le réseau des liaisons hydrogène de l'eau, elle va le rompre localement. Ce réseau va se reconstituer en se séparant des molécules hydrophobes qui elles-mêmes vont avoir tendance à fuir l'eau pour former une phase distincte: c'est l'interaction hydrophobe. Un exemple bien connu est celui de la séparation en deux phases quand on met de l'huile dans l'eau.

D'un point de vue physique, les molécules hydrophobes vont agir de la manière suivante: malgré la non polarité des molécules hydrophobes, les nuages d'électrons de deux molécules voisines interagissent de telle sorte qu'il apparaît des charges partielles

de signe contraire. Les interactions d'attraction entre ces dipôles transitoires (constitués par les électrons d'un atome et le noyau d'un autre atome) sont appelées forces de dispersion de London et elles constituent l'essence de l'effet hydrophobe.

D'un point de vue thermodynamique, la diminution du nombre de molécules d'eau enrobant les groupes non polaires et l'agrégation de ces derniers s'accompagne d'un gain net d'entropie de l'ensemble du solvant et du soluté non polaire.

Les interactions hydrophobes sont des forces de faible énergie: 20 à 30 kJ.mol<sup>-1</sup>.

### **1.3 Polymères bioadhésifs :**

#### 1.3.1 Généralités :

Les bioadhésifs sont des matériaux (principalement des polymères hydrophiles) pouvant s'attacher à une membrane biologique et capables d'être retenus sur cette membrane pendant un certain temps<sup>6</sup>. Ainsi, grâce à leur capacité d'adhérer au mucus, les polymères bioadhésifs ont pu fournir d'excellents véhicules pour le relargage d'agents pharmaceutiques à différentes surfaces muqueuses dans le corps incluant celles localisées dans le système respiratoire, dans le système reproductif et dans le système GI<sup>19,29</sup>. Ces propriétés que possèdent ces polymères mucoadhésifs leur confèrent un certain nombre d'avantages comme systèmes contrôlant la libération des médicaments. Les principaux avantages incluent une localisation du médicament à un site spécifique à l'intérieur du corps permettant ainsi une meilleure biodisponibilité<sup>25,30</sup>.

Néanmoins, les bioadhésifs choisis doivent être non toxiques, peu coûteux et dotés d'une grande capacité de transport et de libération de médicaments. Comparés aux polymères synthétiques, les polysaccharides constituent une meilleure option pour l'étude de la bioadésion étant donné que la majorité d'entre eux ne sont pas toxiques<sup>5</sup>.

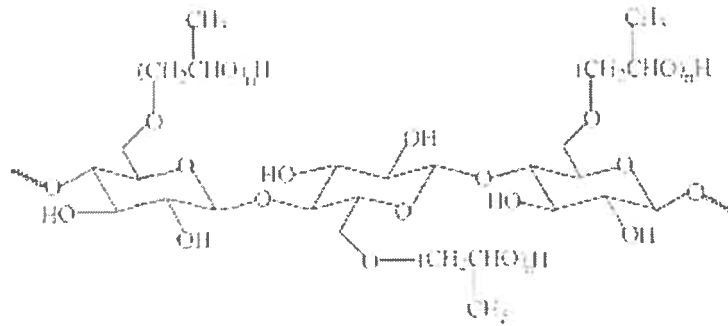
### 1.3.2 Les polymères étudiés :

#### 1.3.2.1 L'Hydroxypropylcellulose (HPC) et le Dextran (DEX) non modifiés:

##### 1.3.2.1.1 L'HPC :

L'HPC est un dérivé de cellulose soluble dans l'eau. Il est habituellement synthétisé par l'action de l'oxyde de propylène sur la cellulose sous des conditions alcalines, donnant des chaînes latérales contenant un nombre variable des groupements hydroxypropoxy<sup>31</sup>. Ce polymère est caractérisé par un degré de substitution (DS) qui représente la moyenne du nombre de substituants hydroxyle par unité de glucose ainsi que par le paramètre MS qui est défini comme étant la moyenne du nombre de molécules d'oxyde de propylène combiné par unité de glucose<sup>32</sup>.

L'HPC est un polymère non ionique largement utilisé comme excipient dans les formes pharmaceutiques solides orales dans lesquelles il agit comme désintégrant. Il peut aussi être utilisé comme liant dans la granulation<sup>33,34</sup>. Polysaccharide non toxique et non irritant, l'HPC est connu pour ses propriétés mucoadhésives. Il a également été montré qu'il favorise l'absorption des médicaments<sup>35</sup>.



**Figure 1.3:** Structure de l'HPC.

#### 1.3.2.1.1.1 Effet du pH :

L'HPC est un polymère non ionique et la viscosité de ses solutions aqueuses n'est pas affectée par les variations de pH. Cette viscosité demeure inchangée pour un pH allant de 2 à 11. Cependant, quand la stabilité d'entreposage à long terme est exigée, le pH de la solution devient important à considérer en raison de la dégradation qui peut se produire dans des conditions fortement acides ou alcalines.

#### 1.3.2.1.1.2 Effet de sels :

La compatibilité de l'HPC avec les solutions de sels organiques dissous dans l'eau varie en fonction du sel. Si la concentration de sel utilisée est élevée, la solubilité du polymère va diminuer et celui-ci va donc précipiter. Ce phénomène, appelé phénomène de « salting-out », s'accompagne généralement d'une certaine diminution de la viscosité et aussi de l'apparence d'opacité dans la solution. Dans les cas limites, ce

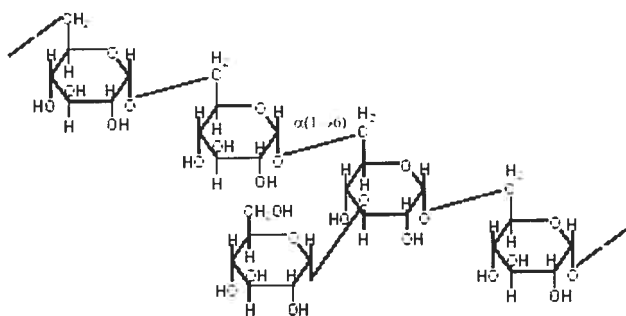
« salting-out » peut ne pas être immédiatement apparent et peut se produire en laissant reposer la solution<sup>32</sup>.

#### 1.3.2.1.1.3 Effet de la température :

Comme la plupart des éthers de cellulose, l'HPC est caractérisé par son point de turbidité, point représentant la température au-dessus de laquelle la solution du polymère devient turbide en solution. Le précipité d'HPC apparaît à une température entre 40-45°C. Toutefois, cette précipitation est complètement réversible. Le précipité d'HPC est totalement redissous en baissant la température en dessous de 40°C sous agitation<sup>32,36</sup>.

#### 1.3.2.1.2 Le Dextran (DEX):

Le dextran, polysaccharide synthétisé par des microorganismes, est obtenu à partir de résidus de glucose combinés principalement par des liaisons  $\alpha(1\rightarrow6)$  et ceci, à différents degrés de branchements (*Figure 1.4*)<sup>37</sup>.



**Figure 1.4:** Structure d'un fragment d'une molécule de DEX.

L'utilisation de polymères naturels dans la formulation de différentes formes de dosage a reçu une attention particulière, spécialement de point de vue sécurité. Parmi ces polymères, les DEX, qui sont naturellement des polysaccharides non toxiques et solubles dans l'eau, ont été utilisés dans le domaine médical<sup>38,39</sup>. Les dérivés hydrophiles du DEX sont aussi utilisés en clinique. Cependant, ce polymère n'a fait l'objet que de peu d'études dans le domaine de relargage de médicaments par voie orale du fait de sa rapide dissolution dans les environnements aqueux ; ce qui aboutit à une libération prématurée du médicament. Ceci oriente les chercheurs vers l'utilisation des dérivés du DEX pour surmonter ce problème. En outre, ils sont connus comme ayant de bonnes propriétés mucoadhésives<sup>38</sup>.

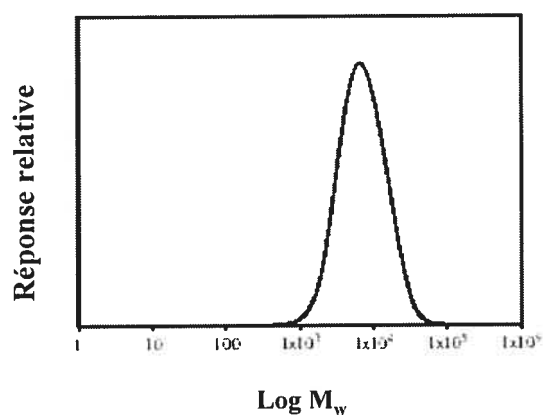
Les fractions du DEX dérivent de l'hydrolyse acide partielle du DEX natif qui mène à plusieurs composés de différentes masses molaires, propriétés et usages. Comme noté dans le tableau ci-dessous, le degré de branchement diminue après hydrolyse acide partielle (*Tableau 1.2*).



**Tableau 1.2** : Relation entre le degré de branchement et la Mw.

Dextran	Degré de branchement (%)
DEX natif	4.6
DEX 80	3.8
DEX 10	3.0

Les fractions de DEX peuvent avoir des masses molaires allant de 1000 à 2 millions Da. Ce paramètre est une propriété clé et est défini en termes de masse molaire moyenne en terme de poids de la molécule,  $\overline{M}_w$ , et de masse molaire moyenne en terme du nombre de molécules,  $\overline{M}_n$ . La courbe de distribution de Mw pour le DEX10, obtenue par chromatographie sur gel, constitue une méthode plus pratique pour caractériser la fraction en question (*Figure 1.5*).

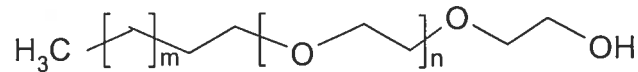


**Figure 1.5** : Distribution de Mw du DEX 10.

### 1.3.2.2 L'HM-HPC et l'HM-DEX:

#### 1.3.2.2.1 Polyoxyéthylène (POE) alkylé ou Brij<sup>®</sup> :

a) Structure :



***Figure 1.6:*** Structure du Brij<sup>®</sup>.

Le Brij est un surfactant non ionique contenant des chaînes de POE comme partie hydrophile (*Figure 1.6*). Il est très connu dans le domaine de la recherche et a été largement utilisé ces dernières années. Son utilisation dans le domaine du relargage des médicaments repose sur le fait que les surfactants non ioniques améliorent l'absorption des médicaments<sup>1</sup>. Dans ce domaine, le Brij constitue la partie hydrophobe qui a été lié à l'HPC et au DEX dans le but de former des polymères susceptibles de former des micelles polymériques d'HPC-Brij et de DEX-Brij ou d'HM-HPC et d'HM-DEX<sup>1,2</sup>.

Lorsque  $n = 9$  ;  $m = 13$ , le produit obtenu est le POE<sub>10</sub>C<sub>16</sub> qui est le Brij56.

b) Applications :

Le Brij a trouvé des applications dans plusieurs domaines :

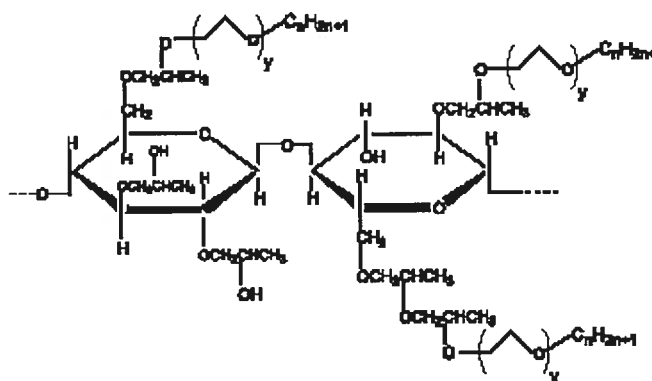
- cosmétique,
- pharmaceutique,

- peinture,
- agents nettoyants...

En plus, il est aussi utilisé pour la solubilisation de la membrane des protéines<sup>40</sup>.

### 1.3.2.2.2 L'HM-HPC:

a) Structure:



**Figure 1.7:** Structure du copolymère HPC-g-(POE)<sub>y</sub>-C<sub>n</sub>.

b) Caractéristiques des micelles de l'HM-HPC:

Il est connu que les micelles polymériques sont caractérisées par leur concentration d'agrégation critique (CAC), paramètre qui définit la concentration à partir de laquelle il y a formation de micelles en solution<sup>1,2</sup>. La valeur de la CAC varie en fonction de la longueur de la chaîne POE<sub>(y)</sub> et de la longueur de la chaîne alkyle (n) (Tableau 1.3). Dans le cas de l'HM-HPC utilisé, greffé à 0.9%, qui sera par la suite étudié, la CAC = 75 ± 14 mg/L.

La mesure du rayon hydrodynamique de ces micelles, défini comme étant le rayon d'une molécule sphérique avec le même coefficient de diffusion que la molécule étudiée, a été effectuée par diffusion de lumière utilisant une solution aqueuse à 5mg/mL. Le résultat obtenu était de  $85 \pm 2 \text{ nm}^2$ .

**Tableau 1.3 :** Caractéristiques moléculaires et physico-chimiques des surfactants  $(\text{POE})_y\text{-C}_n$  et des copolymères HPC-g-  $(\text{POE})_y\text{-C}_n^2$ .

Polymer	$(\text{POE})_y\text{-C}_n^a$ greffé (mol%)	Nb moyen d'unité de $(\text{POE})_y\text{-C}_n$ par chaîne d'HPC	CAC	
			Concentration du polymère <sup>b</sup> (mg/l)	Concentration de $(\text{POE})_y\text{-C}_n$ ( $10^6 \text{ mol/l}$ )
HPC	0	0	—	—
$(\text{POE})_{10}\text{-C}_{16}$	—	—	$4.3 \pm 1.0^c$	$6.3 \pm 1.4^c$
$(\text{POE})_{20}\text{-C}_{16}$	—	—	$4.6 \pm 0.6^c$	$4.1 \pm 0.5^c$
$(\text{POE})_{20}\text{-C}_{18}$	—	—	$3.7 \pm 0.5^c$	$3.2 \pm 0.4^c$
HPC-g- $(\text{POE})_{10}\text{-C}_{16}$	$0.9 \pm 0.1$	5	$75 \pm 14$	$1.8 \pm 0.3$
HPC-g- $(\text{POE})_{10}\text{-C}_{16}$	$4.7 \pm 0.1$	19	$17 \pm 3$	$2.1 \pm 0.4$
HPC-g- $(\text{POE})_{20}\text{-C}_{16}$	$1.1 \pm 0.1$	5	$65 \pm 12$	$1.9 \pm 0.3$
HPC-g- $(\text{POE})_{20}\text{-C}_{16}$	$3.9 \pm 0.1$	18	$15 \pm 5$	$1.5 \pm 0.5$
HPC-g- $(\text{POE})_{20}\text{-C}_{18}$	$1.1 \pm 0.1$	5	$135 \pm 10$	$3.9 \pm 0.3$
HPC-g- $(\text{POE})_{20}\text{-C}_{18}$	$3.1 \pm 0.1$	16	$22 \pm 6$	$1.8 \pm 0.4$

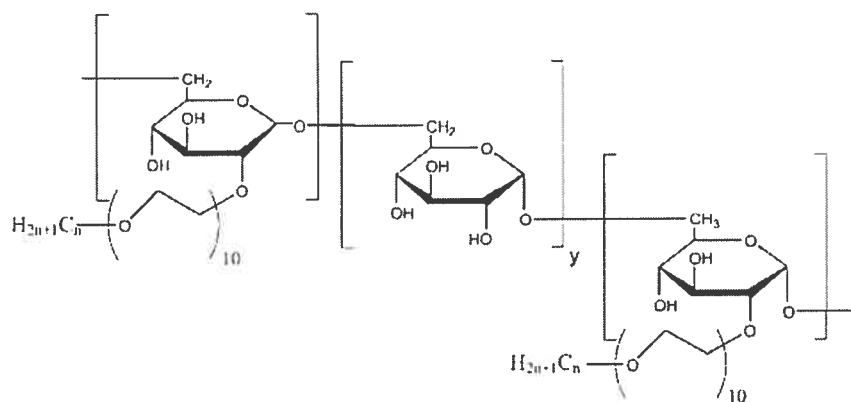
<sup>a</sup> Déterminée par  $^1\text{H-NMR}$  dans  $\text{DMSO-d}_6$

<sup>b</sup> Déterminée par fluorescence (ratio  $I_{336\text{nm}}/I_{333\text{nm}}$ )

<sup>c</sup> cette valeur est la CAC du surfactant  $(\text{POE})_y\text{-C}_n$ .

### 1.3.2.2.3 L'HM-DEX:

a) Structure :



**Figure 1.8:** Structure de l'HM-DEX.

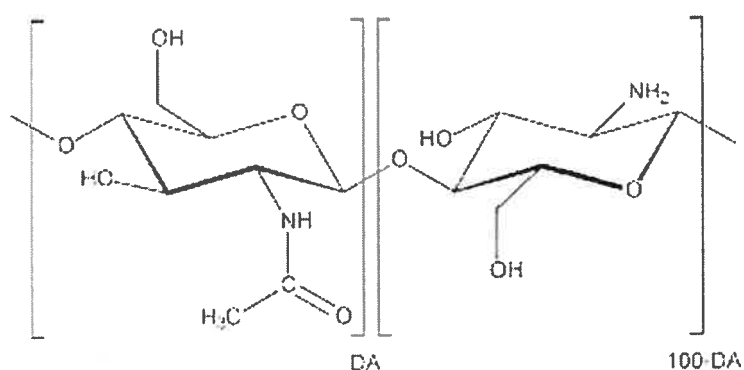
b) Caractéristiques des micelles de l'HM-DEX:

Les micelles de l'HM-DEX greffés à 6% sont celles qui vont être étudiées par la suite. Elles sont caractérisées par leur CAC d'une valeur de 6.5 mg/L et un diamètre hydrodynamique =  $18 \pm 2 \text{ nm}$ <sup>1</sup>.

1.3.2.3 Le chitosan :

Le chitosan, dérivé désacétylé de la chitine, est un copolymère linéaire de deux sucres reliés par une liaison  $\beta$  (1-4) : la N-acétyl D-glucosamine et la D-glucosamine. Il se trouve plus rarement dans la nature : il n'est présent que dans la paroi cellulaire d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes, et chez quelques insectes. La chitine, extraite de la carapace des crustacés, est ainsi la source du chitosan commercial<sup>41,42,43</sup>.

Le chitosan et la chitine sont tous les deux des copolymères de même structure chimique globale et ne se distinguent que par la proportion relative des unités N-acétyl glucosamine et glucosamine les constituant, c'est à dire leur degré d'acétylation (DA) (*Figure 1.9*). Ce paramètre influe sur toutes leurs propriétés physico-chimiques (viscosité, solubilité, etc...). Plusieurs techniques ont été utilisées pour déterminer le DA avec précision<sup>41,44</sup>. Ce paramètre est aussi responsable de la densité des charges du polymère ainsi que de l'équilibre entre les interactions hydrophiles et hydrophobes.



***Figure 1.9***: Structure du Chitosan.

D'autre part, le chitosan est un polymère très utilisé dans le domaine pharmaceutique grâce à sa biocompatibilité, de sa toxicité non significative et à sa biodégradabilité<sup>41,42,45</sup>. Un intérêt considérable est porté sur lui comme mucoadhésif. De nombreuses études ont montré que le chitosan peut adhérer à la surface d'une muqueuse et peut augmenter l'absorption des médicaments incluant les protéines et les peptides<sup>20</sup>.

Les propriétés mucoadhésives du chitosan, plus particulièrement des microsphères de chitosan ont été évaluées *in vitro* par He *et al.*<sup>46</sup> en étudiant l'interaction entre la mucine et le polymère en solution aqueuse par la méthode de turbidimétrie, puis en mesurant la mucine adsorbée sur les microsphères. L'adhésion de ces microsphères au tissu mucosal prélevé de l'intestin d'un rat a aussi été évaluée. Les résultats ont par la suite montrés que le chitosan ainsi que les microsphères de chitosan possédaient d'excellentes propriétés mucoadhésives<sup>46</sup>. Le chitosan comporte, comme la mucine, 2 types de résidus permettant une interaction mucoadhésive potentielle : les groupements amines chargés positivement et les acétyles hydrophobes sur ses résidus non déacétylés<sup>5,14,20</sup>. Les propriétés mucoadhésives du chitosan résultent ainsi de l'interaction électrostatique entre le résidu D-glucosamine chargé positivement et le résidu d'acide sialique de la mucine qui, lui, est chargé négativement<sup>20</sup>. Rossi *et al.* a étudié l'influence de la concentration et du ratio polymère:mucine sur l'interaction entre le chitosan et la mucine par viscosimétrie<sup>47</sup>.

#### ***1.4 Rôle de la bioadhésion dans l'administration orale des médicaments:***

Pendant les dernières années, une attention considérable a été portée sur l'utilisation de polymères mucoadhésifs dans le domaine du relargage des médicaments<sup>19,25,26,48</sup>. L'importance de ces polymères est basée en partie sur leur capacité à adhérer à la mucine et de ce fait à libérer un principe actif à un site spécifique de l'organisme<sup>19</sup>.

Les principaux avantages d'utilisation de polymères bioadhésifs comme système permettant le relargage des médicaments incluent la localisation du polymère à un site spécifique et aussi l'augmentation du temps de relargage. Il s'ensuit une augmentation de la biodisponibilité du médicament<sup>25</sup>. Evidemment, une meilleure compréhension des interactions entre la mucine et les polymères dans un environnement physiologique est essentielle pour une conception raisonnable des systèmes bioadhésifs de relargage<sup>25,30</sup>.

Plusieurs études expérimentales ont été effectuées pour tester les propriétés mucoadhésives de différents polymères.

Dans notre cas, l'étude d'adsorption des polymères sur la mucine utilisera la microbalance à cristal de quartz (QCM), méthode qui n'a pas été beaucoup utilisée jusqu'à présent, et la titration à calorimétrie isothermique (ITC). La résonance plasmons de surface (SPR) sera également utilisée comme méthode complémentaire au QCM.

## **1.5 Méthodes expérimentales :**

### **1.5.1 Microbalance à cristal de quartz (QCM):**

#### **1.5.1.1 Principe de la méthode :**

La microbalance à cristal de quartz est un transducteur piézo-électrique fréquemment utilisé dans le domaine de l'électrochimie. Les premiers essais en milieu liquide remontent au début des années 1980. Elle permet de transformer une variation de fréquence en une variation de masse, sous certaines conditions, facilement mesurables.



Le grand intérêt de ce dispositif repose sur sa grande sensibilité pour étudier in situ et en temps réel un processus électrochimique. Le principe de mesure fait appel à des techniques de type chronométrie : un résonateur, en général un cristal de quartz, est inséré dans un circuit électronique qui délivre un signal très stable dans le temps, l'ensemble formant un oscillateur. Le cristal est excité à sa fréquence de résonance (5MHz) et les mesures sont également enregistrées pour les troisième, cinquième, septième et neuvième harmoniques (15, 25, 35 et 45 MHz respectivement).

Toute perturbation à la surface du cristal se répercute immédiatement sur la fréquence d'oscillation qui est la grandeur mesurée, et il est possible d'établir une relation simple, dite de Sauerbrey, entre la variation de masse et celle de cette fréquence. Cependant, cette relation ne s'applique que pour des films minces et rigides. Avec une microbalance opérant à 6 MHz, une variation de 1 Hz correspond à une variation de masse de 4 ng pour 0.2 cm<sup>2</sup> de surface active, ce qui représente une fraction de monocouche d'oxygène adsorbée<sup>49,50</sup>.

Cet outil très sensible a été perfectionné au laboratoire afin d'obtenir des informations prépondérantes sur les processus électrochimiques : d'une part, au niveau de la cinétique électrochimique en réalisant des mesures de fonction de transfert électrogravimétrique, et d'autre part, au niveau des propriétés mécaniques des films étudiés<sup>51,52,53</sup>.

#### 1.5.1.2 Paramètres étudiés :

Le QCM permet de déterminer des paramètres suivants :

- la masse de la couche adsorbée sur le cristal qui est directement proportionnelle à la fréquence enregistrée.

- le paramètre de dissipation (D), dans le cas de films non rigides, qui renseigne sur les propriétés mécaniques de la couche adsorbée. Cependant, dans le cas de films rigides, ce paramètre n'intervient pas. Seules la fréquence et la masse sont prises en compte.<sup>54</sup>

### 1.5.1.3 Domaines d'application :

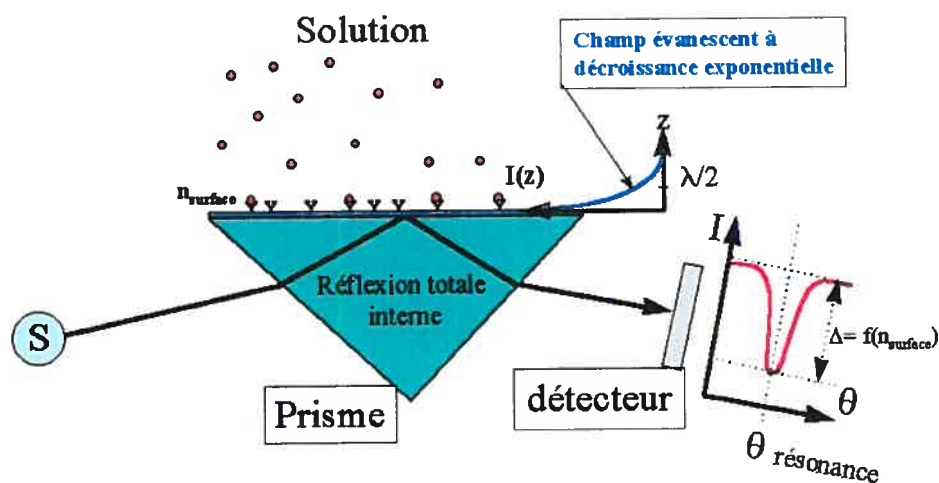
Le QCM est utile pour l'étude de la formation d'un film sur une surface, et pour l'étude de la dynamique et des propriétés de films minces de protéines et de polymères adsorbés sur des surfaces, éventuellement dans un environnement liquide (on est sensible au changement de masse et en conséquence à la quantité absorbée). Cette technique est également sensible aux propriétés viscoélastiques des couches molles. Dans le domaine de la recherche, les applications du QCM les plus communes incluent le suivi du dépôt de métal, des analyses chimiques, les sondes biomédicales et des applications de contrôle de l'environnement, etc. D'autres applications incluent la détection de la masse, de la densité, de la viscosité, de l'adsorption, de la désorption et de la corrosion<sup>49</sup>.

### 1.5.2 Résonance plasmons de surface :

#### 1.5.2.1 Principe de la méthode:

La SPR est une méthode de mesure de la liaison d'un "ligand" sur un "récepteur" adsorbé à la surface d'une couche métallique. Le système de détection est basé sur une variation de l'indice de réfraction de l'interface quand le ligand se fixe aux récepteurs<sup>55,56</sup>.

Cette méthode utilise un prisme recouvert d'une très mince surface métallique (argent ou or). Il existe des plasmons de surface qui sont des ondes oscillantes de densité surfacique de charge qui se déplacent à la surface du métal. Ces plasmons (non radiatifs) sont excités par la lumière atteignant la surface du métal. L'amplitude du champ électromagnétique  $I(z)$  décroît exponentiellement quand on s'éloigne de la surface (en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente). Ils ne peuvent en fait être excités que sous certains angles d'illumination (quand le vecteur d'onde de la lumière à la surface coïncide avec celui des plasmons de surface). Cela conduit à ce que la lumière réfléchie voit son intensité décroître (ayant transféré de l'énergie aux plasmons). Il se forme donc un minimum profond dans l'intensité réfléchie en fonction de l'angle d'incidence  $\theta$ . Cet angle dépend très fortement du profil de l'indice de réfraction de la surface ( $n_{\text{surface}}$ ) dans l'épaisseur du champ évanescent proche de la surface (quelques dizaines de nm). Le changement de la composition (adsorption ou désorption, fixation ou relargage) de l'interface change cet indice, ce qui conduit à un changement de l'angle de résonance<sup>57,58</sup> (*Figure 1.10*). Des considérations théoriques montrent que  $\theta$  est proportionnel à la concentration de macromolécules en surface jusqu'à une concentration surfacique élevée de  $50 \text{ ng}\cdot\text{mm}^{-2}$ .



**Figure 1.10 :** Schéma illustrant le principe de la SPR.

Avec  $I(z)$  : amplitude du champ électromagnétique

$n_{\text{surface}}$  : indice de réfraction de la surface

$\theta$  : angle d'incidence

#### 1.5.2.2 Paramètres étudiés:

Utilisant des principes optiques, la SPR est un instrument qui est complémentaire aux autres techniques de caractérisation de surface pour les biomatériaux.

Elle permet de mesurer quantitativement la fixation de molécules de toute nature, à la surface d'une couche métallique déposée sur un prisme. Cette méthode particulièrement simple, mesure les changements d'épaisseur de l'interface en tout point de la surface.

Bien que sa sensibilité de détection reste très inférieure aux techniques évoquées ci dessus, elle apporte par contre des avantages importants, à savoir:

- 1) la mesure en temps réel de la quantité de molécules fixées sur une surface sans besoin de marquage. Ce point est particulièrement intéressant dans le cas des interactions protéines/protéines car ces molécules sont pour la plupart fragiles et donc susceptibles de perdre leur réactivité lors d'une opération de marquage.
- 2) l'enregistrement simultané de toutes les cinétiques de formation des complexes. C'est à partir de ces relevés que sont déterminées toutes les constantes dynamiques des interactions bio moléculaires (constantes d'association, de dissociation et d'affinité)<sup>59</sup>.

#### 1.5.2.3 Domaines d'application :

Les études utilisant la résonance de plasmons de surface se sont multipliées de plus en plus depuis la commercialisation de plusieurs appareils de SPR. La majorité des études recensées portent sur des molécules biologiques. Cependant, la SPR est aussi appliquée à des systèmes physiques et mise en oeuvre sur des montages non commerciaux. Cette technique apparaît comme l'outil de prédilection dès qu'il y a une variation d'indice de réfraction près d'une surface métallique. La détection par SPR s'applique aussi bien aux phénomènes propres aux interfaces, comme l'adsorption à une interface liquide/solide par exemple, qu'à l'étude de systèmes accrochés. Mais l'accrochage impose de nouvelles contraintes et comporte quelques inconvénients tel que la prise en compte de la diffusion. Dans le cas des protéines ou des cristaux liquides par exemple, la fixation à un support solide impose également une certaine organisation

spatiale. Dans le cas des protéines, il se peut que l'on diminue la quantité d'unités participant effectivement au phénomène observé. Cependant, soulignons les avantages non négligeables qui justifient le recours aux plasmons de surface<sup>58,59,60</sup> :

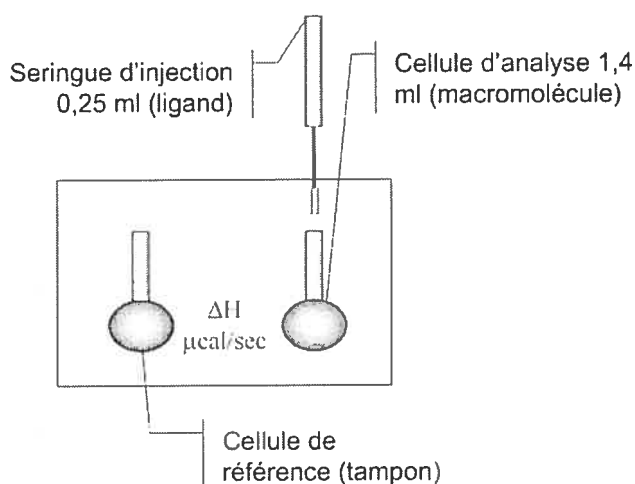
- le champ évanescent permet de faire ressortir ce qui se passe à la surface et d'occulter les effets de volume,
- la très grande sensibilité de la résonance des plasmons aux variations d'indice de réfraction permet la détection d'effets subtils.

### 1.5.3 Titration calorimétrique isothermique:

#### 1.5.3.1 Principe de la méthode :

La titration calorimétrique isothermique (ITC) est une technique permettant l'étude de paramètres thermodynamiques de différentes interactions. Elle se base sur le fait que toute interaction libère ou absorbe une certaine quantité d'énergie.

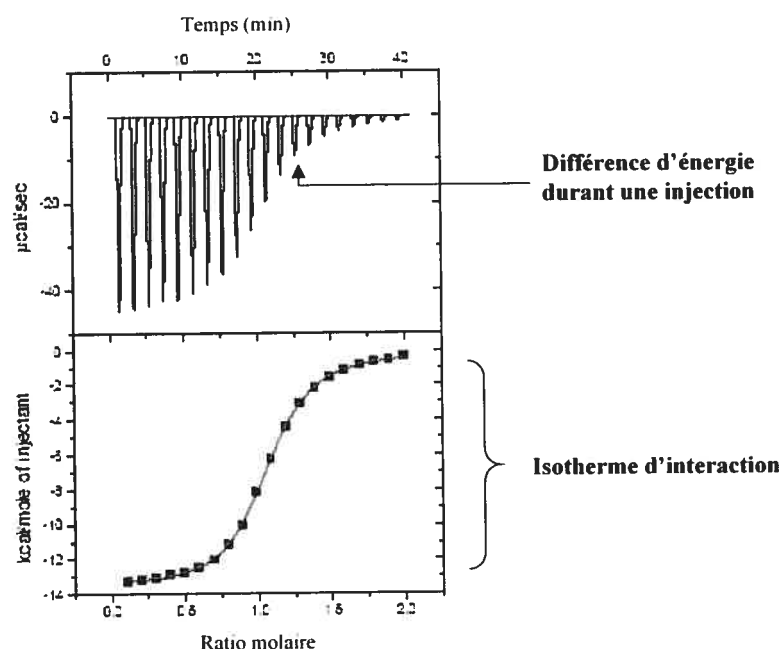
L'enceinte d'un appareil ITC renferme une cellule de référence et une cellule d'analyse (*Figure 1.11*).



**Figure 1.11** : Enceinte d'un appareil d'ITC.

La cellule de référence contient le solvant (par exemple une solution tampon) et la cellule d'analyse contient le composé à l'étude dissout dans le même solvant (tampon). Après avoir équilibré le système à la température de l'étude, le ligand en solution dissous dans le même solvant est injecté dans la cellule d'analyse par petites injections successives. La seringue d'injection est munie d'une pale qui permet une agitation dans la cellule d'analyse. L'agitation sera plus ou moins rapide selon la viscosité et la concentration des solutions. Une agitation trop rapide entraîne une distorsion de la ligne de base.

A chaque injection, la différence d'énergie enregistrée par rapport à la cellule de référence est rapportée sur un thermogramme (*Figure 1.12*). La surface de chacun des pics est intégrée et portée sur le graphique de l'enthalpie en fonction du rapport molaire dans la cellule. Le rapport molaire est défini comme étant égal à la concentration de la molécule (ou un motif de la molécule) dans la seringue sur celle de la molécule (ou un motif de la molécule) qui se trouve dans la cellule.



**Figure 1.12** : Exemple de thermogramme.

L'ensemble des points obtenus est appelé « isotherme d'interaction ». L'ajustement de la meilleure courbe permet à un logiciel de calculer en une seule analyse la constante d'association, la stœchiométrie, l'enthalpie, l'entropie et l'énergie libre d'un système. Bien que le logiciel intègre automatiquement les aires d'injection, il est préférable d'ajuster manuellement la ligne de base et l'intégration pour une meilleure précision. L'énergie de dilution est évaluée en effectuant deux types de blancs consistant à titrer le tampon avec le ligand et à titrer la macromolécule avec le tampon. Lorsqu'ils sont significatifs, les isothermes des blancs doivent être soustraits des isothermes des échantillons. L'énergie de dilution peut être évaluée par les dernières injections effectuées lors d'une analyse, lorsque le ligand est en excès dans la solution par rapport



à la macromolécule et que, en conséquence, aucune interaction intervient autre que la dilution du ligand dans le tampon.

Les concentrations en macromolécule et en ligand, le volume et le nombre d'injections et le temps de repos entre chaque injection sont les paramètres expérimentaux ayant le plus d'impact sur la qualité des résultats. Ces paramètres doivent être ajustés de manière à avoir une interaction libérant suffisamment d'énergie tout en étant dans une zone permettant l'application de modèles mathématiques.

L'étendue de cette zone de validité est déterminée par la valeur sans unité « c »<sup>61</sup>. La valeur c est calculée par l'équation ci-dessous.

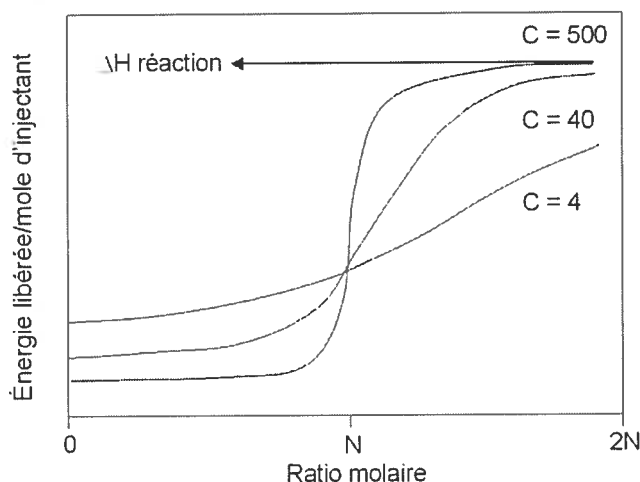
$$c = K \times M_{\text{tot}} \times N$$

Où K : constante d'association ( $M^{-1}$ )

N : paramètre stœchiométrique de l'interaction

$M_{\text{tot}}$  : concentration de la macromolécule dans la cellule d'analyse (M)

Plus la valeur c est grande, plus la courbe de l'isotherme aura une amplitude qui se rapproche du  $\Delta H$  de la réaction (*Figure 1.13*).



**Figure 1.13 :** Energie libérée/mole d'injectant vs le ratio molaire.

La valeur de  $c$  doit être située entre 1 et 1000 et de préférence entre 10 et 100. Lorsque la valeur  $c$  est supérieure à 10, la concentration finale du ligand dans la cellule doit être environ 1,5 fois celle de la macromolécule. Lorsque la valeur  $c$  est inférieure à 10, la concentration finale dans la cellule doit être de 2 à 2,5 fois celle de la macromolécule. Lorsque la constante d'association et la stœchiométrie d'un système sont inconnues, la concentration en macromolécule est choisie de manière à ce qu'une chaleur minimale de 3 à 5  $\mu\text{cal}$  soit dégagée lors de l'injection. La concentration en ligand dans la seringue est généralement de 5 à 20 fois celle de la macromolécule dans la cellule. L'énergie libérée ou absorbée en fin d'analyse doit être nulle ou du moins tendre vers zéro indiquant la saturation de la macromolécule. Un isotherme d'interaction doit avoir au moins 10 injections dont le volume doit permettre une libération d'énergie suffisante. La présence d'un plateau isothermique en début d'analyse facilite l'ajustement de la meilleure courbe. Il indique que la totalité des molécules de ligand injectées sont liées à la macromolécule.

Le temps laissé entre chaque injection doit permettre d'atteindre l'équilibre thermodynamique dans le système. Cet équilibre est atteint lorsque la courbe revient à la ligne de base correspondant à une énergie libérée nulle<sup>62</sup>. La quantité de ligand injectée, la viscosité du mélange, l'agitation et la spontanéité de la réaction sont des facteurs influençant la rapidité de l'équilibre.

#### 1.5.3.2 Paramètres étudiés :

L'utilisation de cette technique couplée à un logiciel adéquat permet de calculer, entre autres, la constante d'association, la stœchiométrie, l'enthalpie et l'entropie de mélange d'un échantillon.

#### 1.5.3.3 Domaines d'application :

L'ITC peut être utilisée pour les études suivantes :

- Interactions protéine-protéine, protéine-lipides, protéine-carbohydrates, protéine-DNA, protéine-ligands, protéine- acide nucléique;
- Interactions entre enzymes et, co-enzymes, inhibiteurs, substrats, médicaments ;
- Interactions biopolymère-biopolymère ou biopolymère-médicaments, biopolymère-ligands ;
- Analyse de l'activité enzymatique ;
- Etudes d'anticorps ;
- Métabolisme des cellules ;
- Polymérisations, surfactants, etc;

- Interactions antigène-anticorps;
- Interactions ADN-médicaments.

## **1.6 Objectifs :**

Durant ces dernières années, un intérêt croissant est porté sur le développement des formes pharmaceutiques pouvant contrôler la libération des médicaments à travers les muqueuses en utilisant des polymères bioadhésifs<sup>48</sup>. Les systèmes bioadhésifs pour le relargage des médicaments ont ainsi eu un gain d'intérêt puisqu'ils peuvent être une solution pour les problèmes de biodisponibilité qui se posent dans ce domaine<sup>63</sup>.

L'objectif de notre recherche est d'étudier les éventuelles interactions entre le mucus, cible primaire dans le domaine du relargage des médicaments, et certains polymères ayant des propriétés bioadhésives. Les polymères choisis pour notre étude sont des polymères qui sont connus pour leurs propriétés bioadhésives:

- l'HPC et l'HM-HPC,
- le Dex et l'HM-DEX
- le Chitosan.

Le but sera d'étudier, par diverses méthodes, l'adsorption de ces polymères sur la mucine qui est le principal composant du mucus; et ceci, en variant plusieurs paramètres du milieu (pH, température et force ionique) et d'étudier la stabilité des films adsorbés.

## 1.7 *Références :*

---

1. M.F. Francis, L. Lavoie, F.M. Winnik, J.C. Leroux. Solubilization of cyclosporin A in dextran-g-polyethyleneglycolalkyl ether polymeric micelles. *European J. of Pharm. and Biopharm.* 56 (2003): 337-346.
2. M.F. Francis, M. Piredda, F.M. Winnik. Solubilization of poorly water soluble drugs in micelles of hydrophobically modified hydroxypropylcellulose copolymers. *J. Control. Release* 93 (2003) : 59-68.
3. G. Ponchel, J.M. Irache. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral drug delivery to the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery* 34 (1998): 191-219.
4. E.C. Lavelle. Targeted delivery of drugs to the gastrointestinal tract. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 18 (2001): 341-386.
5. S.E. Harding. Mucoadhesive interactions. *Biochem. Society transactions.* 31 (2003): 1036-1041.
6. S. Tamburic, D.Q.M. Graig. Thermorheological and thermogravimetric analysis of bioadhesive polymer/mucin mixtures. *Thermochimica Acta* (1997): 99-106.
7. S. Tamburic, D.Q.M. Graig. A comparison of different in vitro methods for measuring mucoadhesive performance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 44 (1997): 159-167.
8. S.A. Mortazavi. An in vitro assessment of mucus/mucoadhesive interactions. *Inter. J. Pharmaceutics* 124 (1995): 173-182.
9. J. Woodley, Bioadhesion: New possibilities for drug administration? *Clinical Pharmacokinetics* (2001), 40(2): 77-84.

- 
10. M.M. Patel, J.D. Smart, T.G. Nevell, R.J. Ewen, P.J. Eaton and J. Tsibouklis. Mucin/Poly(acrylic acid) Interactions: A spectroscopic Investigation of Mucoadhesion, *Biomacromolecules* (2003) 4: 1184-1190.
  11. N.A. Peppas, Y. Huang. Nanoscale technology of mucoadhesive interactions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004): 1675-1687.
  12. S.B. Ho, K. Takamura, R. Anway, L.L. Shekels, N.W. Toribara, H. Ota. The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins. *Dig. Dis. Sci.* (2004), 49(10): 1598-606.
  13. R.G. Riley, J.D. Smart, J. Tsibouklis, et al. An investigation of mucus/polymer rheological synergism using synthesized and characterized poly(acrylic acid)s. *Int. J. Pharm.*, 217 (2001): 87-100.
  14. M.P. Deacon, S.S. Davis, R.J. White, H. Nordman, I. Carlstedt, N. Erington, A.J. Rowe, S.E. Harding. Are chitosan-mucin interactions specific to different regions of the stomach? Velocity ultracentrifugation offers a clue. *Carbohydrate Polym.*(1999) 38: 235-238.
  15. W. Jiang, J.T. Woitach, R.L. Keil and V.P. Bhavanandan. Bovine submaxillary mucin contains multiple domains and tandemly repeated non-identical sequences. *Biochem. J.* (1998) 331: 193-199.
  16. Lei Shi and Karin D. Caldwell. Mucin Adsorption to Hydrophobic Surfaces. *J. of Colloid and Interface Science* (2000) 224 : 372-381.
  17. W. Jiang, J.T. Woitach, D. Gupta, and V.P. Bhavanandan. Sequence of a Second Gene Encoding Bovine Submaxillary Mucin: Implication for Mucin

- 
- Heterogeneity and Cloning. *Biochemical and Biophysical research communications*. 251 (1998): 550-556.
18. X. Zhu, J. Degraaf, F.M. Winnik, and D. Leckband. pH-dependent Mucoadhesion of a Poly(N-isopropylacrylamide) Copolymers Reveals Design Rules for drug delivery. *Langmuir* (2004) 20 : 10648-10656.
- <sup>19</sup> K.M. Tur, H.S. Ch'ng. Evaluation of possible mechanism(s) of bioadhesion. *Int. J. Pharm* (1998) 160: 61-74.
- <sup>20</sup> R.B. Qaqish, M.M. Amiji. Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan-mucin interactions. *Carbohydrate Polymers* (1999) 38: 99-107.
- <sup>21</sup> E. Perez, J.E. Proust, A. Baszkin, M.M. Boissonade. In situ adsorption of bovine submaxillary mucin at the mica/aqueous solution interface. *Colloids and Surfaces* (1984), 9(4): 297-306.
22. S. Tamburic, D.Q.M. Graig. Thermorheological and thermogravimetric analysis of bioadhesive polymer/mucin mixtures. *Thermochimica Acta* (1997): 99-106.
23. S. Rossi, M.C. Bonferoni, G. Lippoli, M. Bertoni, F. Ferrari, C. Caramella, U. Conte. Influence of mucin type on polymer mucin rheological interactions. *Biomaterials* (1995), 16: 1073-1079.
24. E.E Hassan, J.M. Gallo. A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. *Pharm. Res.* (1990) 7: 491-495.
25. N.V. Efremova, Y. Huang, N.A. Peppas, and D.E. Leckband. Direct Measurement of interactions between Tethered Poly(ethylene glycol) Chains and Adsorbed Mucin Layers. *Langmuir* 18 (2002) : 836-845.

- 
26. V.M. Leitner, M.K. Marschütz, A.B. Schnürch. Mucoadhesive and cohesive properties of poly(acrylic acid)-cysteine conjugates with regard to their molecular mass. *Europ J. pharm. sciences* (2003), 18: 89-96.
  27. J. Israelachvili. Intermolecular and surface forces 2nd Edition, Academic Press: London, 1992 : 450 pp.
  28. J.M. Prausnitz, R.N. Lichtenthaler, E.G. de Azevedo. Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria 3rd Edition, Prentice-Hall inc.: New Jersey, 1999 : 9-117, 213-453.
  29. D.E Chickering, E. Mathiowitz. Bioadhesive microspheres: I. A novel electrobalance-based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa. *J. Control. Release* 34 (1995): 251-261.
  30. J. Cleary, L. Bromberg, and E. Magner. Adhesion of Polyether-Modified Poly(acrylic acid) to Mucin. *Langmuir* 20 (2004): 9755-9762.
  31. S. Fortin, G. Charlet. Phase Diagram of Aqueous Solutions of (hydroxypropyl)cellulose. *Macromolecules* 22 (1989): 2286-2292.
  32. E.D. Klug. Some properties of water-soluble hydroxyalkylcelluloses and their derivatives. *J. Polymer Sci.* 36 (1971) : 491-508.
  33. Y. Machida, T. Nagai. *T. Chem. Pharm. Bull.* 22 (1974): 2346-2351.
  34. G.W. Skinner, W.W. Harum, P.E. Barnum, J.H. Guo. The evaluation of fine-particle hydroxypropylcellulose as a roller compaction binder in pharmaceutical applications. *Drug Deliv. Ind. Pharm.* 25 (1999): 1121-1128.
  35. Y. Suzuki, Y.J. Makino. Mucosal drug delivery using cellulose derivatives as a functional polymer. *J. Controlled Rel.* 62 (1999): 101-107.



- 
36. R.S. Werbowyj, D. Gray. Ordered Phase Formation in Concentrated Hydroxypropylcellulose Solutions. *Macromolecules* 13 (1980): 69-73.
  37. G.M. Pavlov, A.E. Grishchenko, E.I. Rjuntsev, N.P. Yevlampieva. Optical properties of dextran in solution and in films. *Carbohydrate Polymers* 38 (1999): 267-271.
  38. Y. Miyazaki, K. Ogihara, S. Yakou, T. Nagai, K. Takayama. In vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate. *Int. J. of Pharm.* 258 (2003) : 21-29.
  39. J. Piehler, A. Brecht, K. Hehl, G. Gaugliz. Protein interactions in covalently attached dextran layers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 13 (1999): 325-336.
  40. *The Merck Index*; Monography no 07659.
  41. C. Schatz, et al. Versatile and Efficient Formation of Colloids of Biopolymer-Based Polyelectrolyte Complexes. *Biomacromolecules* (2004).
  42. S. Ganguly, A.K. Dash. A novel in situ gel for sustained drug delivery and targeting. *Int. J. of Pharm.* 276 (2004): 83-92.
  43. I. Henrisken, K.L. Green, J.D. Smart, G. Smistad, J. Karlsen. Bioadhesion of hydrated chitosans: an in vitro and in vivo study. *Int. J. of Pharm.* 145 (1996): 231-240.
  44. B.Q. Roula et al. Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan-mucin interactions. *Carbohydrate Polymers* 38 (1999): 99-107.

- 
45. G. Sandri, S. Rossi, F. Ferrari et al. Mucoadhesive and penetration enhancement properties of three grades of hyaluronic acid using porcine buccal and vaginal tissue Caco-2 cell lines, and rat jejunum. *J. Pharm. and Pharmacologie* 56 (2004): 1083-1090.
46. P. He, S.S. Davis, L. Illum. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.* 166 (1998) :68-75.
47. S. Rossi, F. Ferrari, M.C. Bonferoni, C. Caramella. Characterization of chitosan hydrochloride-mucin rheological interaction : influence of polymer concentration and polymer:mucin weight ratio. *Europ. J. Pharm. Sc.* 12 (2001) : 479-485.
- <sup>48</sup> H. Blanco-Fuente, S. Anguiano-Igea, F.J. Otero-Espinar, J. Blanco-Méndez. In-vitro bioadhesion of carbopol hydrogels. *Int. J. Pharm.* 142 (1996) :169-174.
49. Y.C. Liu, Wang C.M., K.P. Hsiung. Comparison of Different Protein Immobilization Methods on Quartz Crystal Microbalance Surface in Flow Injection Immunoassay. *Analytical Biochemistry* 299 (2001): 130-135.
50. S.J. Martin, V.E. Granstaff, G.C. Frye. Characterization of a Quartz Crystal Microbalance with Simultaneous Mass and Liquid Loading. *Anal. Chem.* 63 (1991): 2272-2281.
51. C. Gabrielli, M. Keddad, N. Nadi, H. Perrot. a.c. electrogravimetry on conducting polymers. Application to polyaniline. *Electrochim. Acta*, 44 (1999) 2095-2103.
52. C. Gabrielli, M. Keddad, H. Perrot, M.C. Pham et R. Torresi. Separation of ionic and solvent transport during charge compensation processes in

- 
- electroactive polymers by a.c. electrogravimetry. *Electrochim. Acta.*, 44 (1999) 2095-2103.
53. D. Bouché-Pillon. Étude et mise au point de transducteurs ultra-sensibles fonctionnant en milieu liquide. Thèse de Doctorat Paris VI, Novembre 1996.
54. K. Otto, H. Elwing, M. Hermansson. Effect of ionic strength on initial interactions of *Escherichia coli* with surfaces, studied On-line by a novel quartz crystal microbalance technique. *J. of Bacteriology*. 17 (1999) : 5210-5218.
55. C. Nylander, B. Liedberg, T. Lind. Gas detection by means of Surface Plasmon Resonance. *Sensors and Actuators*, 3, 79 (1982).
56. B. Liedberg, C. Nylander, I. Sundstrom. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*, 4, 299 (1983).
57. J. Homola, S.S. Yee, G. Gauglitz. Surface Plasmon Resonance Sensors : Review. *Sensors and Actuators B* 54 (1999): 3-15.
58. J.G. Quinn, S. O'Neill, A. Doyle, C. McAtamney, D. Diamond, B.D. MacCraith, R. O'Kennedy. Development and Application of Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors for the Detection of Cell-Ligand Interactions. *Analytical Biochemistry* 281, 135 (2000).
59. J. Davies, I. Faulkner. Surface Plasmon Surface-Theory and experimental considerations. *Surface Analytical Techniques*. Chapter3 (1996): 67-87.
60. B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom. Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started. *Biosensors and Bioelectronics* 10 (1995): i-ix.

- 
61. T. Wiseman, S. Williston, J.F. Brands, L-N. Lin. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179 (1989): 131-137.
  62. R. O'Brien, J.E. Ladbury, B.Z. Chowdhry. Isothermal titration calorimetry. In *A practical approach to protein-ligand interactions: Hydrodynamics and calorimetry*, IRL Press: Oxford, 2001: 263-286.
  63. B. Kriwet, T. Kissel. Interactions between bioadhesive poly(acrylic acid) and calcium ions. *Int. J. of Pharmaceutics* 127 (1996): 135-145.

---

## **2. Interactions between mucin and bioadhesive polymers.**

# Interactions between mucin and bioadhesive polymers.

Siwar Chayed , Françoise M. Winnik.

Article qui va être soumis à Langmuir.

Faculty of Pharmacy

University of Montreal

C.P. 6128, Succursale Centre-Ville

Montréal, QC, Canada

H3C 3J7

Tel : (514)-340-5179

Fax : (514)-340-3245

Authors email adresses :

[REDACTED]

[REDACTED]

**ABSTRACT.**

This study investigated the mucoadhesive property of non modified and hydrophobically modified hydroxypropyl cellulose and dextran, i.e. HPC, HM-HPC and DEX10, HM-DEX10. Prior studies demonstrated that the neutral polysaccharides such HPC gave virtually no interaction with the mucin. However, this polymer is known to be more bioadhesif than dextran.

Mucin interactions with these polymers were investigated using differents methods: quartz crystal microbalance (QCM), surface plasmon resonance (SPR) and isothermal titration calorimetry (ITC). Mucin and polymer adsorptions were determined as a function of pH, temperature and ionic strength using QCM. This technique enabled us to measure both frequency shifts ( $\Delta f$ ), i.e. the increase in mass on the surface, and simultaneously dissipation shifts ( $\Delta D$ ), i.e., the viscoelastic energy losses on the surface. Changes in the parameters measured by the QCM technique reflect the dynamic character of the adhesion process. We were able to show clear differences in the viscoelastic behavior of modified and non modified polymers attached to the mucin. The addition of hydrophobic groups on HPC and DEX10 increase the adhesion of both polymers onto mucin since the adsorption of these polymers was more important than the adsorption of the non modified ones. All the measurements were performed at acidic pH to be in physiological conditions in the human stomach (pH 3). Our results showed that the adsorption does not change with increasing pH and with increasing temperature from 25°C to 37°C. However, the adsorbed amount is ionic strength dependent, decreasing with increasing monovalent salt concentration. SPR was also used to study

the stability of the bilayer formed by mucin and modified polymer at room temperature (25°C, 0.15 M NaCl). A progressive desorption of the HM-polymer was observed as a function of time with increasing pH.

**KEY WORDS:** bio(muco)adhesion, bovine submaxillary mucin, hydroxypropyl cellulose, HM-HPC, dextran, HM-DEX10, polymeric micelles, quartz crystal microbalance, surface plasmon resonance, isothermal titration calorimetry.



## INTRODUCTION

The use of bioadhesive polymers and copolymers as means of delivering therapeutically active agents, including peptides and proteins, to or via mucous membranes has been the focus of attention in recent years.<sup>1,2,3,4</sup> A mucous layer covers epithelial surfaces throughout the body including the gastrointestinal tract. Generally, mucus provides protection and lubrication of underlying epithelium. On the other hand, it is also the primary target of oral drug delivery. The main nonwater components of the mucous layer are mucins, which are long glycoprotein molecules responsible for the gel nature of the mucous layer.<sup>5</sup>

The field of bioadhesion has received a considerable amount of attention from controlled release researchers.<sup>6</sup> Although the term mucoadhesion is often used as a synonym for bioadhesion, a distinction should be made between the more general concept of bioadhesion and the special case of mucoadhesion. Mucoadhesion, strictly speaking, refers to just one approach of realising bioadhesion, namely through adhesion to the mucus gel layer.<sup>7</sup> Bioadhesion is an interfacial phenomenon between two materials, at least one of which is a biological substrate, such as adhesion between a polymer and a biological membrane. In the case of a polymer attached to the mucin layer of a mucosal tissue, the term “mucoadhesion” is used. The mucosal layer lines a number of regions of the body including the gastrointestinal tract, the urogenital tract, the airways, ears, nose and eyes. These represent potential sites for attachment of bioadhesive systems and hence, the mucoadhesive drug delivery systems should be

designed for buccal,<sup>8</sup> oral, vaginal, rectal, nasal and ocular routes of administration.<sup>9,10,11,12</sup>

Mucoadhesive drug delivery vehicles have been studied extensively during the last 2 decades. They are designed to exploit the attraction between the mucous layer and the polymer carrier of the drug delivery system. Mucoadhesive systems have three distinct advantages when compared to conventional dosage forms: (1) The mucoadhesive systems are readily localized in the region applied to improve and enhance the bioavailability of drugs. (2) These dosage forms facilitate intimate contact of the formulation with underlying absorption surface. This allows modification of tissue permeability for absorption of macromolecules, such as peptides and proteins. (3) Mucoadhesive dosage forms also prolong residence time of the dosage form at the site of application and absorption to permit once or twice a day dosing.<sup>12</sup>

In recent years, considerable interest has been shown in the use of mucoadhesive dosage forms with regard to enhancing the local and systemic administration of poorly absorbed drugs from the gastrointestinal tract.<sup>7</sup> Bioadhesive polymers could provide excellent vehicles for the delivery of pharmaceutical agents to a number of mucosal surfaces in the body, including those found in the respiratory, reproductive and gastrointestinal systems. They can also protect the active compound from enzymatic degradation.<sup>13</sup>

Numerous experimental studies have been performed to test the mucoadhesive properties of various polymers using a variety of techniques.<sup>3,5,6,10,11,13,14,15,16,17,18</sup> The interaction between mucus and mucoadhesive polymers of differing nature (Noveon, Pemulen TR-2, carageenan and sodium carboxymethylcellulose) was studied by *Madsen and al.*<sup>14</sup> using dynamic oscillatory rheology. It was shown that, with the exception of

sodium carboxymethylcellulose, incorporating a mucoadhesive polymer into a mucus gel produces rheological behavior indicative of a weakly cross-linked gel network, which suggested a structure containing physical chain entanglements and non-covalent bonds.

Since mucoadhesion is often described in terms of chain penetration across the polymer/mucosa interface, this mechanism has been elucidated using various methods in vitro, including the Wilhelmy plate method<sup>19</sup> and tensile force measurements which involves the force required to detach two surfaces.<sup>3,18,20</sup> Attempts were made to correlate the rheological interaction between polymer and mucin with the detachment force, measured with tensile testing. The polymers examined included natural gums, semisynthetic derivatives and synthetic products<sup>21</sup>. Another possible approach is to study the process of bioadhesion by the evaluation of the polymer/mucin mixtures. Hassan and Gallo<sup>22</sup> were the first to relate the rheological properties of these mixtures to the bioadhesive bond strength, using a continuous flow method.

Although mechanical testing and rheology have been used to classify polymers as mucoadhesives, spectroscopic techniques may provide further insights into the mechanism of bioadhesion. *Patel et al.*<sup>16</sup> have used infrared (IR), nuclear magnetic resonance (NMR), and X-ray photoelectron (XPS) spectroscopies and differential scanning calorimetry (DSC) to investigate molecular-level interactions between mucin and a pharmaceutically approved poly(acrylic acid), Carbopol 934P. The formation of hydrogen bonds between mucus and poly(acrylic acid) has been shown by the displacement of IR absorption bands and by NMR resonances. Electron microscopy has been used to visualise the mucoadhesive interface.<sup>23</sup> Other macroscopic probes using

mucus, such as flow-through methods (flow rate required to dislodge a mucoadhesive-coated sphere), colloidal gold staining (measurement of the so-called “adhesion number”) and *in vivo* methods (endoscopy and radioisotope imaging), have also proved useful.<sup>24</sup>

Atomic force microscopy has been widely used in investigations of bio- and mucoadhesion. In many cases, this method has been used to examine the amount of material adhering to a surface<sup>25,26</sup>. Another method that has been used in numerous investigations to determine the molecular forces and mechanisms responsible for polymer interactions, is the surface force apparatus (SFA). *Efremova et al.*<sup>5</sup> used this technique to measure the interaction between grafted poly(ethylene glycol) (PEG) chains and adsorbed mucin layers. The SFA studies were complemented by surface plasmon resonance (SPR) measurements of mucin adsorption onto grafted PEG films. Another technique, which has traditionally been used to monitor mass or thickness of thin films deposited on surfaces, is the quartz crystal microbalance (QCM). This technique has been applied in only a few studies on mucoadhesion. However, the QCM offers the possibility of obtaining additional information by the energy dissipation factor,  $D$ , of the oscillator or, equivalently, by the  $Q$ -factor;  $D = 1/Q$ .

In the present work, we have explored the potential of using this extended QCM technique for the study of the bioadhesive properties of non-modified and hydrophobically-modified hydroxypropylcellulose and dextran, i.e. HPC, HM-HPC and DEX10 and HM-DEX10. The preparation of HM-polymers was done in our group.<sup>27,28</sup> Francis M. and co-workers<sup>27,28</sup> synthesized HM-HPC and HM-dextran to exploit the solubilizing potential of HM-HPC or HM-dextran polymeric micelles towards poorly

water soluble drugs in order to improve their oral bioavailability. Polymeric micelles form spontaneously when amphiphilic polymers, containing both hydrophilic and hydrophobic fragments, are dissolved in water<sup>29</sup>. The drug selected was cyclosporin A (CsA), not only because of its clinical importance, but also because it is representative of a number of new, highly water-insoluble drugs in current development. The cytotoxicity of the micelles was also studied using epithelial intestinal cells. The study revealed that HM-HPC<sup>27</sup> and HM-DEX10<sup>28</sup> exhibit no significant cytotoxic effect.

HPC is a non-ionic water-soluble polymer. It is a polymer with many important industrial applications.<sup>30</sup> It is widely used as an excipient in oral solid dosage forms in which it acts as a disintegrant, and as a binder in granulation. It is essentially a non-toxic and non-irritant polysaccharide.<sup>27</sup> HPC is also known to possess bioadhesive properties and was a subject of in vivo and in vitro studies.<sup>31,32,33</sup>

Dextrans, polysaccharides synthesized by microorganismes, are non-toxic water-soluble polymers. They have been frequently used for biomedical and biophysical applications.<sup>34,35</sup> However, few studies have reported the potential of dextrans for delivery of drugs orally. The mucoadhesiveness of dextran derivatives was evaluated by Miyazaki et al.<sup>30,36</sup> Hydrophilic dextran derivatives, i.e. [2-(diethylamino) ethyl] dextran (EA) and dextran sulfate (DS), have good mucoadhesive properties. The objective of their study was to evaluate mucoadhesive properties and gastrointestinal transit of microspheres consisting of dextran sulfate (DS)/[2-(diethylamino) ethyl] dextran (EA) mixture and cellulose acetate butyrate for their mucoadhesive properties, and to investigate their gastrointestinal transit after oral administration to rats. The mixtures of oppositely charged dextran derivatives were found to be useful adhesive agents for

multiple-unit mucoadhesive devices. Microspheres containing 40% of EA/DS mixture showed good mucoadhesive performance in vitro. It also strongly adhered to the gastric mucosa and remained in the stomach after administration to rats.<sup>35</sup>

We set out to investigate the adsorption of the previously mentioned polymers onto mucin using three independent techniques: quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D), surface plasmon resonance (SPR) for the study of the adhesion phenomenon on surfaces and isothermal titration calorimetry (ITC) to study the adhesion in solution. Specifically, we want to establish the relation between factors influencing adsorption behavior (e.g. pH, temperature and ionic strength) and the amount of adsorbed polymers.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** Bovine submaxillary gland mucin (BSM) was purchased from Sigma. HPC ( $M_w$  80 000 Da, molar substitution level (MS): 3.7, where MS is defined as the average number of alkylene oxide per anhydroglucose unit [1] ); polyoxyethylene (10) cetyl ether [(POE)<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> ; C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>OH ; Brij56<sup>®</sup>], Tris buffered saline (50 mM de Tris-HCl and 150mM de NaCl, pH 7.6), hydrogen peroxide, 1-dodecanethiol, sulfuric acid and sodium chloride were purchased from Sigma-Aldrich. Dextran T10 (DEX10;  $M_w$  10 000 Da) was supplied by Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden). Hydrophobically-modified HPC and DEX10, i.e. HM-HPC (HPC-g-(POE)<sub>10</sub>-C<sub>16</sub>) and HM-DEX10 (DEX10-PEG-C<sub>16</sub>), were synthesized as previously described.<sup>27,28</sup> The CMC values of HM-HPC and HM-DEX10 are respectively  $75 \pm 14$

mg/L and 6.5 mg/L. Chitosan ( $M_w$  30 000 Da) was obtained from Wako Chemicals. Deionized water (resistivity 18.2  $M\Omega$  cm) obtained by further purification of reverse-osmosis water with a Milli-Q Gradient System (Millipore, Bedford, MA). Absolute ethanol was purchased from Commercial Alcohols Inc. (Brampton, Ontario).

*Solutions preparation.* Mucin and polymer solutions were prepared by dissolving mucin and polymer into buffers containing 50mM Tris-HCl and 150mM NaCl (pH 7.8), respectively. The solutions were gently stirred and left overnight at 4°C.

The pH of the solutions was adjusted to a specific value with concentrated hydrochloric acid or sodium hydroxide (NaOH, 4M) as needed. For the ionic strength study, the concentration of salt was adjusted by adding a specific amount of sodium chloride to the buffer to obtain the concentration desired. Buffer solutions of pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0 were used in the experiments.

**Quartz Crystal Microbalance.** The measurements were performed using a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-Z500 from KSV Instruments). This technique has been described in detail<sup>37</sup> and will only briefly be summarized. It consists of measuring both changes in frequency ( $\Delta f$ ) and energy dissipation ( $\Delta D$ ) of a quartz crystal when material is absorbed from solution.<sup>38</sup> An AT-cut piezoelectric crystal coated on its two faces with gold electrodes is excited at its fundamental frequency (5MHz), and observation takes place at the first, third, fifth, seventh and ninth overtones (corresponding to 5, 15, 25, 35 and 45 MHz, respectively). When a thin and rigid film of mass  $\Delta m$  is attached to the electrodes, the resulting decrease  $\Delta f$  in frequency is related to  $\Delta m$  according to Sauerbrey equation<sup>39</sup>:

$$\Delta m = - C \Delta f / \nu$$

where  $\nu$  is the overtone number and  $C$  the mass sensitivity constant (for the QCM-Z500  $C \approx 17.7 \text{ ng.cm}^{-2}$  at  $f=5\text{MHz}$  in air) which depends on the properties of the crystal used. The equation holds for measurements in air. In solution, the density, the viscosity of the liquid and the viscoelastic properties of the film influence the frequency shift  $\Delta f$ .<sup>40</sup> The QCM-Z500 instrument and data processing software allow one to simultaneously determine mass and viscoelastic properties of an adsorbed film. However, a decrease in the resonance frequency is usually associated, to a first approximation, to an increase of the mass coupled to the quartz, and our discussion will remain essentially on a qualitative level.

Prior to the experiments, the gold surface of the crystal was cleaned with hot Piranha solution (i.e. the mixture of sulfuric acid and hydrogen peroxide 3/1 v/v) for 2 min followed by rinsing with pure water and drying with nitrogen.<sup>41</sup> *Caution: Piranha solution is very oxidative and dangerous, and direct contact should be avoided.* Thereafter the crystal was stored in ethanol solution of 1mM of 1-dodecanethiol in a sealed container. Before use, the crystal was cleaned by ethanol and water. The crystal was then dried under filtered nitrogen gas in a laminar flow cabinet before being mounted in the cell. The experiment was initiated by exposing the cleaned crystal-coated quartz oscillator to an aqueous solution of Tris buffered saline, thus establishing a baseline for the frequency and energy dissipation. In the case of these experiments, the frequency and dissipation results are reported as changes from the measured baselines rather than



actual magnitudes, since it is these variations that contain the required information. After stabilization of the signals, a solution at 0.5 g/L of mucin in Tris buffered saline was introduced in the measurement chamber, left for 20 min and then rinsed at this time and after 5 min with the Tris buffered saline solution. During these time periods, the shifts in  $\Delta f$  are continuously recorded. The same procedure is used for the deposition of modified and non-modified HPC and DEX10 by introducing 2mL of the studied polymer solution at a concentration 0.5 g/L in Tris buffered saline. In this case, the first rinse was after 30 min of the deposition and the second after 75 min. The frequency changes were monitored as a function of time. The measurements were done from pH 2 to pH 7.8. At pH 3, the influence of the temperature (25° and 37°C) and ionic strength ([NaCl] = 0.15 M, 0.5M and 1M) were studied.

**Surface Plasmon Resonance (SPR) Spectroscopy.** *Apparatus.* SPR Spectroscopy makes use of resonant coupling between evanescent photons and surface plasmons to sense refractive index changes at a metal/liquid interface due to the adsorption or desorption of material.<sup>42,43</sup>

SPR measurements were carried out with a computer-controlled, scanning angle instrument (Resonant Probes GmbH, Goslar, Germany). Surface plasmons were excited at the metal/solution interface in the Kretschmann configuration using the p-polarized output from a HeNe laser (5mW, 632.8 nm) and a right angle LaSFN9 glass prism ( $n = 1.845$ , Hellma Optik). An optical chopper (Perkin Elmer) was used to modulate the laser signal at a frequency of 1 kHz, which was then correlated with detection through the lock-in-amplifier. The light reflected from the metal/prism interface was focussed onto a

silicone photodiode detector. The photodiode signal was measured with a lock-in-amplifier (EG&G PAR) inphase with the excitation source. A stepper motor driven  $\theta/2\theta$  goniometer (Huber) and motor control unit allowed the incidence angle to be varied in increments  $\geq 0.01^\circ$ . The goniometer and data acquisition were controlled through an IEEE interface board (Keithley model KPC-488.2) and software provided by Resonant Probes.

*In-situ Measurements.* Mucin and polymer adsorptions were monitored using both the angular reflectivity and kinetic modes. Angular reflectivity curves were obtained by measuring the reflected light intensity ( $R$ ) as a function of the incident laser beam angle ( $\Theta$ ). The minimum of each curve corresponds to the resonance angle. Kinetic adsorption data ( $\Theta_m$ - $t$ ) was obtained by tracking the angle of minimum reflectivity at three points close to the overall reflectance minimum and fitting these to a parabola, the apex of which was taken as  $\Theta_m$ . The shift in  $\Theta_m$  is proportional to the amount of material adsorbed on the surface.<sup>42,43</sup>

*SPR Sample Cell and Substrate Preparation.* A thin gold layer ( $\sim 48$  nm) was thermally evaporated onto LaSFN9 glass slides at a rate of  $\sim 0.1$  nm/s and base pressure of  $\sim 1 \times 10^{-7}$  Torr using a VE-90 thermal evaporator equipped with a quartz crystal deposition monitor (Thermionics Vacuum Products, Port Townsend, WA). A self-assembled monolayer of 1-dodecanethiol was prepared by incubating the gold-coated slides into a 1-dodecanethiol solution in ethanol (1mM) for at least 12 h. The backside of a 1-dodecanethiol-functionalized Au substrate was optically coupled to the base of a LaSFN9 prism using a Cargille Series B liquid ( $n = 1.700$ ). The prism/Au substrate assembly was then fixed on one side of a custom-built Teflon liquid cell (1 mL

capacity) fitted with Kalrez O-rings so that the thiol-Au surface faced the inside of the cell. The other side of the liquid cell was pressed against a microscope glass slide. The prism/Au substrate/liquid cell assembly was mounted onto the goniometer stage so that the center of the Au/glass substrate was at the axis of rotation. The goniometer position at which the back reflected beam overlapped with the incident beam was used to define the angle of incidence of  $45^\circ$  with an accuracy of  $\pm 0.01^\circ$ .

*Adsorption studies.* Addition of buffer or polymer solution into the SPR liquid cell was performed by manual injection. The deposition of polymer was monitored under non-flow conditions. The cell was first flushed with 10 mL (10x cell volume) of Tris buffered saline (pH 3) to clean the surface. Mucin and polymer (solutions of 0.5 g/L in buffer; pH 3) were then deposited on the 1-dodecanethiol/Au surface, beginning with mucin. After 15 min, the polymer solution was added to the mucin. The film surfaces were rinsed with buffer solution (pH 3) between each adsorption step. All experiments were done at room temperature.

*Film Thickness Calculations.* Using the Fresnel modeling software provided by resonant probes, angular reflectivity curves were analysed by a five layer model (glass prism/gold-thiol/mucin layer/polymer film/aqueous solution) to extract the total film thickness ( $d_{\text{film}}$ ) following the alternate adsorption of mucin and polymer film. First, the critical angle position of the R- $\Theta$  scan for the 1-dodecanethiol modified Au film was fitted, using the known dielectric constant of the LaSFN9 prism ( $\epsilon = 3.4036$ ), to obtain the dielectric constant of the Tris buffered saline (pH3) solution ( $\epsilon = 1.7857$ ). Using this value for the dielectric constant of the buffer solution, the entire R- $\Theta$  scan was then

fitted to obtain the complex dielectric constant,  $-12.5 + 1.3i$  and thickness, 46.2 nm, for the thiol-modified Au film.

It is generally impossible to determine both  $\epsilon_{\text{film}}$  and  $d_{\text{film}}$  for an adsorbed, thin organic film from a single SPR curve ; any number of different combinations of  $\epsilon_{\text{film}}$  and  $d_{\text{film}}$  can produce an angular reflectivity scan with the same  $\Theta_{\text{min}}$  as the measured curve.<sup>44</sup> To obtain film thicknesses from R- $\Theta$  scans acquired within the range of the plasmon wave decay, the film dielectric constant must be known. Angular reflectivity scans recorded for each film adsorbed were used to obtain values for  $\epsilon_{\text{HM-HPC}}$  and  $\epsilon_{\text{HM-DEX10}}$  and  $\epsilon=2.25$  was used for mucin layer.

*Stability of the layers.* Surface plasmon resonance was also used to study the stability of the bilayer formed by mucin and modified polymer. After each film deposition / buffer rinse step, the stability was studied by rinsing the bilayer formed at pH 2 with buffer solution at increasing pH (pH 3, 4, 5, 6, 7 and 8).

**ITC Measurements.** The microcalorimetric study was carried out using a VP-ITC titration microcalorimeter (MicroCal Inc.). The sample cell had a volume of 1.43 mL. Before titration, all the samples were degassed by use of MicroCal Thermo-Vac for 5 min. During the titration, the injection volume was 10  $\mu\text{L}$ . A total of 28 consecutive injections were performed. The delay time between two consecutive injections was 300 s. All measurements were carried out at 25 °C. Also, the pH was fixed at 3 and salt concentration at 0.15 M. The titration was carried out by injecting the mucin solution from a 250  $\mu\text{L}$  injection syringe into the sample cell filled with 0.1 g/L modified-polymer solution. The syringe is tailormade such that the tip acts as a blade-type stirrer

to ensure an optimum mixing efficiency at 400 rpm. The heat evolved or adsorbed by each injection in the course of titration is directly measured by the ITC unit, producing the raw heat signal, also known as cell feedback (CFB). Integration of each CFD gives the differential enthalpy curve for the titration.

*ITC Data Analysis.* Data were analysed using the Microcal ORIGIN software. The energy associated with the interaction between mucin and polymer is calculated by discounting the heats of dilution of glycoprotein and polymer, which were determined by the titration of a glycoprotein solution into buffer and of buffer into polymer solutions, respectively.

Results were expressed as enthalpy of transfer, by dividing the heat exchanged by the number of moles of glycoprotein added. The results are presented in terms of the enthalpy evolved per mole of injectant (mucin) as a function of the total injectant concentration. The principles and basic thermodynamic conventions of ITC were recently discussed by *Jelesarov and Bosshard*.<sup>45</sup>

## **RESULTS AND DISCUSSION.**

**QCM Measurements of Mucin Adsorption onto Hydrophobically Modified Gold Surface.** The QCM is a versatile method for in situ quantification of protein and polymer adsorption on functionalized surfaces. A prerequisite for the investigation of polymer adsorption is a complete surface coverage with mucin serving as the receptor matrix. Mucin contains hydrophobic groups and can therefore be readily immobilized

on hydrophobic surfaces. To realize immobilization of mucin, we chose 1-dodecanethiol monolayers self-assembled on gold surfaces.

Figure 1 shows the QCM frequency and dissipation responses measured during deposition of mucin onto the QCM gold crystal. A decrease of the frequency shift ( $\Delta f_{\max} = (150 \pm 5)$  Hz) after exposing the resonator to a mucin solution with a final concentration of 0.5 g/L was detected. The frequency shift is indicative of a mucin monolayer and essentially identical to the resonator's response upon adsorption of mucin monolayer on a hydrophobically-modified gold surface. We know that in QCM, the frequency variance of quartz crystal resonance is directly correlated to mass changes on the modified gold surface of the crystal so it follows that the mass of mucin adsorbed was 3 nm. The mass uptake is accompanied by an increase in D. Adding more mucin did not alter the frequency, indicating that the surface is covered at its maximum. After incubation for 20 min, which is the time needed to stabilize the signal, the quartz surface was rinsed thoroughly 2 times to remove nonbound and loosely attached mucin before starting the experiment on polymer adhesion.

*Influence of pH on Mucin Adsorption.* To examine the effect of pH on the adsorption of mucin onto the modified gold surface, QCM measurements were carried out in Tris buffered saline (containing 0.15 M NaCl) over the pH range from 2.0 to 6.0. The mucin concentration used was 0.5 g/L. This is below the mucin physiological concentration of 2 mg/mL.<sup>17</sup> Our results show that the mass of mucin deposited on the QCM crystal was the same at all pH values investigated. The  $\Delta M/A$  was  $\sim 300$  ng/cm<sup>2</sup> which corresponds to a thickness of 3 nm.

*Influence of Ionic Strength on Mucin Adsorption.* The adsorption of mucin was examined as a function of ionic strength by varying the NaCl concentration in the buffer solution (Figure 4). These measurements were carried out at acidic pH (pH 3) to be in the same physiological conditions as in the stomach. The adsorption was initiated by injecting a 0.5 g/L mucin solution. At this pH, mucin adsorption experiments show that, at the same pH and mucin concentration, the adsorbed amount of mucin does not vary with the ionic strength.

*Influence of Temperature on Mucin Adsorption.* To study the effect of temperature on the adsorption of mucin, the same experiments with the same conditions (pH 3, 0.15M NaCl) were performed at the physiological temperature (37°C). The shift of QCM parameters is identical for conditions when it was done at room temperature indicating that undisturbed adhesion of mucin was observed (data not shown).

**QCM Measurements of Polymers Adsorption onto Mucin Layer.** Non-modified or HM-polymer was added to the adsorbed mucin with a final concentration of 0.5 g/L (Figure 2). We used this concentration, which is above the critical association concentration (CAC) of HM-HPC and HM-DEX10, to study the adsorption of the polymer micelles formed in solution. The CAC values of these two modified polymers are shown in Table 1.<sup>27,28</sup>

*Non Modified Polymers Adsorption Studies.* Figure 2a shows the adsorption of both non modified HPC and DEX10 onto the mucin. These experiments were performed at pH 3.0. In the case of non-modified HPC, a small change in resonance frequency and energy dissipation was detected after the injection of the polymer. However, the signal

went back to the level observed before the addition of the polymer after washing with buffer. In order to check whether the change of signal is due to the desorption of HPC only, the polymer was deposited directly on the QCM crystal and, after washing, its almost complete removal was observed similarly as when it was deposited onto the mucin layer (data not shown). This corresponds to what some researchers at the Universities of Saarbrücken and Ghent found using a tensiometry method. They coated one surface with mucus and the other with a selection of candidate mucoadhesive polysaccharides.<sup>46</sup> In this way, they were able to show that neutral polysaccharides, such as HPC, and polyanionic polysaccharides, such as carboxymethylcellulose, give virtually no interaction.<sup>3</sup>

On the other hand, the response from deposition of DEX10 under analogous conditions as above shows no changes in frequency and in dissipation. The fact that there is essentially no detectable changes in these two parameters suggests that DEX10 does not bind to the mucin film.

*Adsorption of HM-polymers.* The QCM frequency and dissipation responses measured during deposition of HM-polymers onto mucin film are shown in Figure 2b.

A large decrease in resonance frequency was observed upon addition of HM-HPC with a maximum frequency shift of  $\Delta f = (480 \pm 20)$  Hz. Rinsing with buffer did not alter the resonance frequency considerably. As was said previously, the frequency variance of quartz crystal resonance is measured in relation to mass changes on the modified gold surface of the crystal. It follows that the mass of HM-HPC adsorbed onto mucin is higher than the one of non-modified HPC adsorbed. The deposited mass value was 11 nm for HM-HPC. There is also a concerted increase of energy dissipation, showing that



there are viscoelastic energy losses due to the deposition. However, the addition of hydrophobic groups significantly increase the mucoadhesion of the polymer. As mentioned in the literature, mucin presents two types of residues for potential mucoadhesive interaction (the charged acidic groups on sialic acid and any sulphonated residues, and the hydrophobic methyl groups on fucose residues).<sup>3</sup> This can indicate the existence of significant hydrophobic types of interaction between mucin and HM-HPC. In the case of HM-DEX10, the same behavior was observed showing a higher adsorption of this polymer onto mucin than the non modified DEX10. However, the maximum frequency shift upon addition of HM-DEX10 and after rinsing steps was ( $100 \pm 10$ ) Hz which corresponds to an adsorbed mass of  $\sim 3$  nm. A significant difference between the adsorption of the two HM-polymers onto mucin is noticed (11 nm vs 3 nm). By combined measurements of frequency shifts, and dissipation shift, we were able to show clear differences in the viscoelastic behavior of the two HM-polymers attached to the mucin. The percentage of grafted PEG-C<sub>16</sub> on dextran is 7 % and the mean diameter of polymer micelles formed in solution from this polymer is  $9 \pm 0.3$  nm, we can expect that these micelles are monomolecular micelles and that the hydrophobic part form the core of the micelle so the interaction between the HM-DEX10 and the hydrophobic part of the mucin is less important. In contrast, for HM-HPC, where the percentage of (POE)<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> grafted is 0.9 % and the mean diameter of its polymer micelles is  $85 \pm 2$  nm, we can expect the presence of multichain micelles with a loose core of hydrophobic groups which can be accessible for the interactions with mucin.

*Effect of pH on the adsorption of HM-polymers.* To examine the effect of pH on the mucoadhesion of hydrophobically modified polymers,  $\Delta M/A$  / pH measurements

were carried out in Tris buffered saline (containing 0.15 M NaCl) over the pH range from 2.0 to 6.0 using QCM (Figure 3). Chitosan has also been studied as a reference because, recently, this polymer has been demonstrated to possess mucoadhesive properties, presumably due to the formation, depending on environmental pH, of either secondary chemical bonds, such as hydrogen bonds, or ionic interactions between positively charged amino groups of chitosan and the negatively charged sialic acid residues of mucus glycoproteins or mucins.<sup>47,48,49</sup> The experiments were performed at room temperature. Chitosan and modified polymers concentrations used in the adsorption studies were 0.5 g/L. After the injection of chitosan, the mass deposited onto mucin increased significantly, from 125 at pH 3 to 1150 ng/cm<sup>2</sup> at pH 6 whereas, after the addition of HM-polymer solutions at different pH, the measured surface coverage did not change significantly, it was from ~1100 at pH 2 to ~1000 ng/cm<sup>2</sup> at pH 6 for HM-HPC and from ~200 at pH 2 to 400 ng/cm<sup>2</sup> at pH 6 for HM-DEX10 (Figure 3).

*Effect of ionic strength on the adsorption of HM-polymers.* The adsorption of HM-polymers to the mucin was examined as a function of ionic strength by varying the NaCl concentration in the buffer solution (Figure 4). These measurements were carried out at acidic pH (pH 3). The frequency shift, after the addition of HM-HPC micelles onto mucin, decreased from ~ 600 Hz in 0.15 M NaCl to ~ 400 Hz in 1.0 M NaCl. Even in 1.0 M NaCl, however, there is still significant mucoadhesion that may be due to hydrogen bonding which has been shown to be important in the mucoadhesion of HM-polymer. The salt molecules, which prefer to hydrate with water molecules in the solution system, cause different binding behaviors between proteins and adsorbents. In other words, the increase of salt concentration reduces the polarity of the solution and

also partially decreases the number of water molecules on the surface of the adsorbents and protein. Thus, the salt molecules in the solution contribute to the change in the binding affinity between the mucin and the adsorbent and provide the energy required for the dehydration.

The influence of ionic strength on the adsorption of chitosan onto mucin was also studied (Figure 5). This experiment has been performed at pH 4 to be in a condition where chitosan and mucin are oppositely charged. This figure shows that chitosan adsorption was higher at low ionic strength with a frequency shift of 200 Hz at 0.15M NaCl. However, it decreased when the concentration of NaCl increased to 1M. We can expect that the additional ions in the solution screen a small decrease in electrostatic interactions between the polymer and the mucin molecules. The fact that it was still possible to measure significant adsorption at high salt concentration such as 1.0 M suggests either that the mode of attachment constrained the ability of the mucin layer to change its conformation or that hydrophobic interactions between the hydrophobic methyl groups on the fucose residue on the mucin and the hydrophobic acetyls on non-deacetylated residues on chitosan make a significant contribution to the adsorption phenomenon.

*Effect of temperature on the adsorption of HM-polymers.* The study showing the effect of temperature on the mucoadhesion of HM-polymers revealed that the shift of QCM parameters is identical for conditions when it was done at room temperature indicating that undisturbed adhesion of these polymers onto mucin was observed (data not shown).

**SPR measurements.** Two approaches were taken to monitor the mucin and the polymer adhesion via SPR. First, the mucin adsorption kinetics were followed by tracking the change in the SPR angle with time; mucin adsorption and film growth giving rise to positive shifts in this angle. In this mode, one can assess: (1) the time required to reach saturation coverage upon injection of a mucin solution and (2) the changes in the adsorbed film thickness upon rinsing the newly deposited polymer layer with buffer. Second, after each film deposition / buffer rinse step, angular reflectivity curves ( $R-\Theta_m$ ) were recorded and fit to a Fresnel model to obtain the optical film thickness.

*Kinetics studies.* Figure 6 illustrates an adsorption profile for solutions of mucin and HM-polymers at acidic pH (pH 2) passing over the SPR surface plotting the change in the SPR angle as a function of time. Kinetic curves were recorded after each injection step. The experiment begins with the buffer in contact with the surface. Then, the mucin solution was injected and reached the surface generally by diffusion. It induced a rapid increase in the SPR angle which reached a constant value after 25 min. The increase in the SPR angle is known to be proportional to the refractive index and the thickness (or surface coverage) of the adsorbed layer. It means that an increase in this angle after adding the mucin corresponds to the adsorption of mucin onto the SPR cell. The second step was the injection of a solution of HM-HPC or HM-DEX10 to study the adsorption of these polymers onto mucin. The SPR results show an increase in the SPR angle which is more important for HM-HPC which corresponds to a better adsorption of this polymer to the mucin. Flushing the SPR cell with buffer solution after each injection resulted in a small decrease in recorded angle, attributable to desorption of some mucin

or polymer from the surface. However, the small difference of the signal between the two HM-polymers is not as significant as this find by QCM (Figure 6).

*Film Thicknesses.* SPR scans collected for the mucoadhesion of HM-polymers were analyzed using the five layer optical model described in the experimental section. To calculate the thicknesses, we used  $\epsilon_{\text{HM-HPC}} = \epsilon_{\text{HM-DEX10}} = 1.8496$ .

After the addition of the mucin solution onto the modified gold surface, the thickness of mucin adsorbed registered was  $\sim 2\text{nm}$  which is relatively close to the result found by QCM (3nm). Then, after the injection of HM-polymer onto the mucin, the adsorbed film increased by  $\sim 7.8\text{ nm}$  for HM-HPC (vs 11 nm by QCM) and 2 nm for HM-DEX10 (vs 3nm by QCM).

The weak disagreement between the QCM and SPR results may in fact be only apparent. It is well recognized that for non-rigid films, a significant part of the QCM response is related to the viscoelastic properties of the coating.<sup>50</sup> QCM and SPR data may be reconciled if one assumes that the frequency shift monitored by QCM does not solely depend on the deposited mass, but is also influenced by the rheological properties of the films.

*Stability of the films.* To study the stability of the films previously formed at pH 2 by mucin and HM-polymer, successive rinsing steps at different pH's have been done. The signal found showed that some desorption of the HM-polymer appears progressively with increasing pH. However, the film did not desorb completely for either HM-HPC or HM-DEX10 (data not shown).

**ITC measurements.** ITC measurements were conducted in order to determine the enthalpy of binding between the mucin and the micelles formed by HM-HPC and dextran in solution, at 25°C and pH 3. Initially, we measured enthalpy changes associated with injection of 0.5 g/l mucin into the ITC reaction cell when it contained either buffer solution or 0.1 g/l of polymer in buffer solution. This concentration of polymer was above the CAC of each polymer studied (see below), which means that the polymer was injected into the reaction cell primarily in the form of micelles.

Figure 7a shows a 400 min ITC profile. An exothermic heat pulse was observed after each injection of mucin into HM-HPC. The magnitude of each peak decreased gradually with each new injection, and a small peak was still observed at [mucin] = 0.05 g/L. The area of the small peak was equal to the heat of dilution measured in a separate experiment by injecting mucin into the same buffer (data not shown). The area under each peak was integrated, and the heat of dilution of mucin was subtracted from the integrated values. The corrected heat was divided by the number of moles injected, and the resulting values were plotted as a function of the molar ratio of [mucin] / [HM-HPC] as shown in figure 7b. The resulting titration plot was fitted to a sigmoidal curve by using a nonlinear least-squares method. The binding constant ( $K_a$ ) and the enthalpy change ( $\Delta H$ ) were obtained from the fitted curve.<sup>51,52</sup> The Gibbs free energy change ( $\Delta G$ ) and the entropy change ( $\Delta S$ ) can be calculated from the equation  $\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S$ .

Figure 7 and 8 show that there is a significant interaction between the mucin and the micelles formed by HM-HPC. The heat released after adding mucin to the micelles of modified HPC was higher than the one released by the interaction between mucin and

modified dextran's micelles (respectively 180 and 22 kcal/mole of mucin). These results correlate to those found by QCM and SPR.

## CONCLUSION

These measurements demonstrate directly, by using three different methods, that HM-HPC exhibits mucoadhesive properties that may be directly relevant to oral drug delivery. The data show that HPC weakly adheres to adsorbed mucin films whereas, DEX10, under the same conditions, show no adhesion response. However, the addition of hydrophobic groups increases both the mass of HPC and DEX10 adsorbed onto mucin and their viscoelastic properties at acidic pH. It was also shown that HM-HPC was more bioadhesive than HM-DEX10 towards the SBM because it adheres to both soluble mucin and adsorbed mucin films.

**BIBLIOGRAPHY**

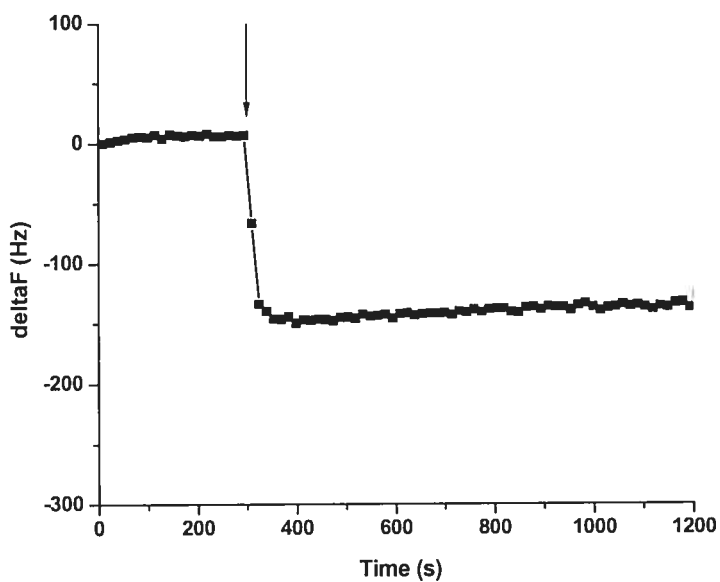
- 
1. Gu, J.M.; Robinson, J.R.; Leung, S.S. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems*, **1988**, 5, 21.
  2. Junginger, H.E. *Pharm. Ind.* **1991**, 53, 1056.
  3. Harding, S.E. Mucoadhesive interactions. *Biochem. Society transactions*, **2003**, 31, 1036.
  4. Ponchel, G.; Irache, J.M. *Advanced Drug Delivery*, **1998**, 34, 191.
  5. Efremova, N.V.; Huang, Y.; Peppas, N.A. and Leckband, D.E. *Langmuir*, **2002**, 18, 836.
  6. Chickering, D.E.; Mathiowitz, E. *J. Control. Release*, **1995**, 34, 251.
  7. Halner, E.; Easson, J.H.; Lehr, C.-M. *Europ. J. of Pharm. and Biopharm.* **1997**, 44, 3.
  8. Bodde, H.E. ; de Vries, M.E.; Junginger, H.E. *J. Control. Rel.* **1990**, 13, 225.
  9. Mortazavi, S.A. *Inter. J. Pharmaceutics*, **1995**, 124, 173.
  10. Tur, K.M.; Ch'ng, H.S. *Int. J. Pharm.* **1998**, 160, 61.
  11. Bomberg, L.; Temchenko, M.; Alakhov, V.; Hatton, T.A. *Int. J. Of Pharm.* **2004**, 282, 45.
  12. Chowdary, K.P.R.; Srinivasa Rao, Y. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, 27, 1717.
  13. Cleary, J.; Bromberg, L. and Magner, E. *Langmuir*, **2004**, 20, 9755.
  14. Madsen, F.; Eberth, K.; Smart, J.D. *Biomaterials*, **1998**, 19, 1083.
  15. Kiu, H.; Bruce, P.L.; Ingram, D.R.; Messersmith, P.B. *Biomacromolecules*, **2002**, 3, 397.



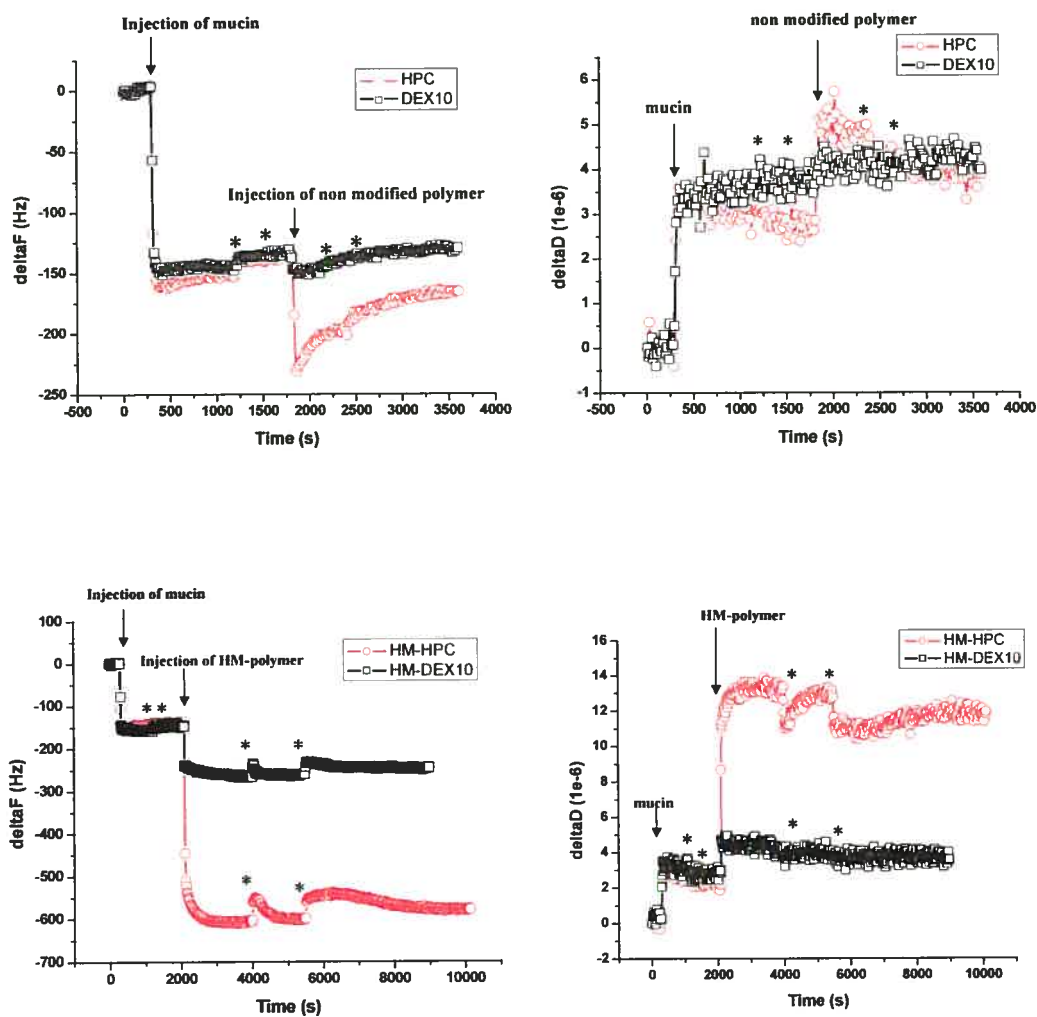
- 
16. Patel, M.M.; Smart, J.D.; Nevell, T.G.; Ewen, R.J.; Eaton, P.J.; Tsibouklis, J. *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 1184.
  17. Zhu, X.; Degraaf, J.; Winnik, F.M.; and Leckband, D. *Langmuir*, **2004**, 20, 10648.
  18. Leitner, V.M.; Marschütz, M.K.; Bernkop-Schnürch, A. *European J. of Pharm. Sciences*, **2003**, 18, 89.
  19. Smart, J.D.; Kellaway, I.W.; Worthington, H.E.C. *J. Pharm. Pharmacol.* **1984**, 36, 295.
  20. Gurny, R.; Meyer, J.M.; Peppas, N.A. *Biomaterials*, **1984**, 5, 336.
  21. Rossi, S; Bonferoni, M.C.; Ferrari, F.; Bertoni, M.; Caramella, C. *Europ. J. of Pharm. Sc.* **1996**, 4, 189.
  22. Hassan, E.E. ; Gallo, J.M. *Pharm. Res.* **1990**, 7, 491.
  23. Lehr, C.-M.; Bouwstra, J.A.; Spies, F. ; Onderwater, J.; van het Noordeinde, J.; Vermeij-Keers, C.; van Munsteren, C.J.; Junginger, H.E. *J. Contr. Rel.* **1992**, 18, 249.
  24. Harding, S.E.; Deacon, M.P.; Fiebrig, I.; Davis, S.S. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* **1999**, 16, 41.
  25. Patel, D.; Smith, J.R.; Smith, A.W.; Grist, N.; Barnett, P.; Smart, J.D. *Int. J. Pharm.* **2000**, 200, 271.
  26. Deacon, M.P.; McGurk, S.; Roberts, C.J.; Williams, P.M.; Tendler, S.J.B.; Davies, M.C.; Davis, S.S.; Harding, S.E. *Biochem. J.* **2000**, 348, 557.
  27. Francis, M.F.; Piredda, M.; Winnik, F.M. *J. Control. Release.* **2003**, 93, 59.

- 
28. Francis, M.F.; Lavoie, L.; Winnik, F.M.; Leroux, J.C. *European J. of Pharm. and Biopharm.* **2003**, 56, 337.
  29. Jones, M.C.; Leroux, J. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1999**, 48, 101.
  30. Winnik, F.M.; Winnik, M.A.; Tazuke, S. *Macromolecules*, **1987**, 20, 38.
  31. Repka, M.A.; McGinty, J.W. *J. Controlled Rel.* **2001**, 70, 341.
  32. Repka, M.A.; McGinty, J.W. *Biomaterials*, **2000**, 21, 1509.
  33. Esposito, P.; Colombo, I.; Lovrecich, M. *Biomaterials*, **1994**, 15, 177.
  34. Pavlov, G.M.; Grishchenko, A.E.; Rjuntsev, E.I.; Yevlampieva, N.P. *Carbohydrate Polymers*, **1999**, 38, 267.
  35. Piehler, J.; Brecht, A.; Hehl, K.; Gaugliz, G. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **1999**, 13, 325.
  36. Miyazaki, Y.; Kanako, O.; Shigeru, Y.; Tsuneji, N.; Kozo, T. *Int. J. of Pharmaceutics*, **2003**, 258, 21.
  37. Rodahl, M.; Kasemo, B. *Sensors Actuat. A.* **1996**, 54: 448.
  38. Höök, F.; Rodahl, M.; Brzezinski, P.; Kasemo, B. *Langmuir*, **1998**, 14, 729.
  39. Sauerbrey, G.Z. *Phys.* **1959**, 155, 206.
  40. Caruso, F.; Rinia, H.A.; Furlong, D.N. *Langmuir*, **1996**, 12, 2145.
  41. Caruso, F.; Serizawa, T.; Furlong D.N. and Okahata Y. *Langmuir*, **1995**, 11, 1546.
  42. Davies, J.; Faulkner, I. *In Surface Analytical Techniques for Probing Biomaterial Processes*; Davies, J., Ed.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, **1996**, 67.
  43. Knoll, W. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, 49, 569.
  44. Chinowsky, T.M. ; Yee, S.S. *Sensors actuators B.* **1998**, 51, 321.

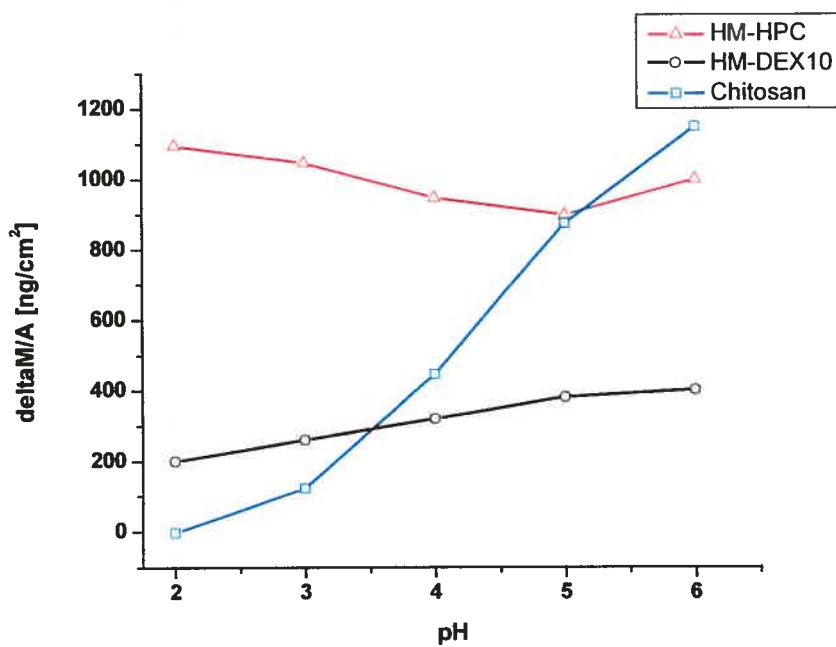
- 
45. Jelesarov, I.; Bosshard, H. R. *J. Mol. Recognit.* **1999**, 12, 3.
  46. Lehr, C.-M.; Bouwstra, J.A.; Schacht, E.H.; Junginger, H.E. *Int. J. Pharmaceut.* **1992**, 78, 43.
  47. Rossi, S.; Ferrari, F.; Bonferoni, M.C.; Caramella, C. *European J. of Pharm. Sc.* **2001**, 12, 479.
  48. He, P.; Davis, S.S.; Illum, L. *Int. J. of Pharmaceutics*, **1998**, 166, 75.
  49. Qaqish, R.B. ; Amiji, M.M. *Carbohydrate Polymers*, **1999**, 38, 99.
  50. Vogt, B.D ; Lin, E.K. ; Wu, W. ; White, C.C. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 12685.
  51. Wiseman, T. ; Williston, S. ; Brandts, J.F.; and Lin, L.-N. *Anal. Biochem.* **1989**, 179, 131.
  52. Kamiya, M. ; Torigoe, H. ; Shindo, H. ; and Sarai, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4532.



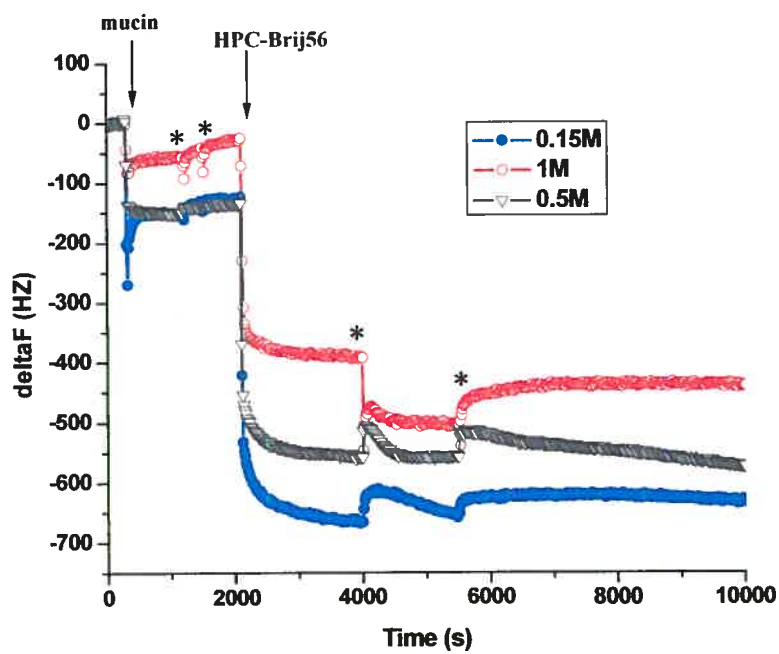
**Figure 1: Representative time-dependent frequency trace showing the adsorption of mucin to a 1-dodecanethiol monolayer chemisorbed on gold. The arrow indicates the injection time of the mucin solution (0.5 g/L). The experiment was performed at 25°C in a buffer composed of 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.6.**



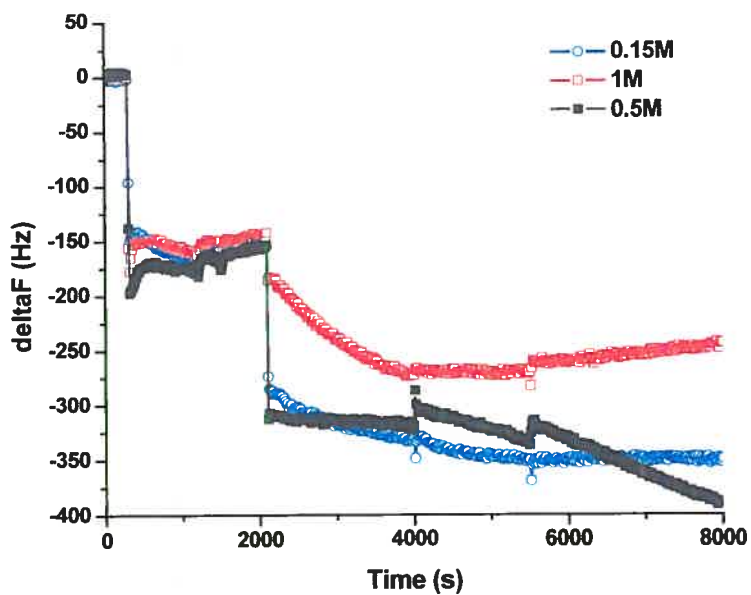
**Figure 2: Frequency and dissipation shifts as a function of time after cell injection of (a) non-modified polymers, (b) HM-polymers responding to additions of 0.5 g/L aqueous solution of specified polymer onto mucin. The (\*) indicates the postadsorption rinsing with 2 mL of buffer (containing 50 mM Tris-HCl, 150mM NaCl at pH 7.6). Measurements were performed at pH= 3, [NaCl] = 150mM, temperature = 25°C.**



**Figure 3: Effect of pH on the adsorption of different polymers on mucin. [NaCl] = 0.15M, temperature = 25°C, mucin and polymers concentrations = 0.5 g/L.**

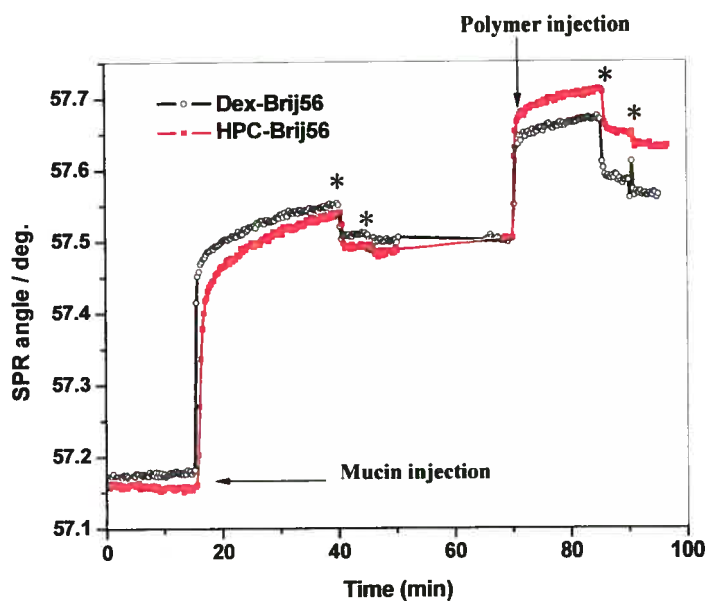


**Figure 4: Effect of ionic strength on the adsorption of mucin/polymer system on an hydrophobically modified gold surface. pH = 3, temperature = 25°C, mucin and polymers concentrations = 0.5 g/L.**

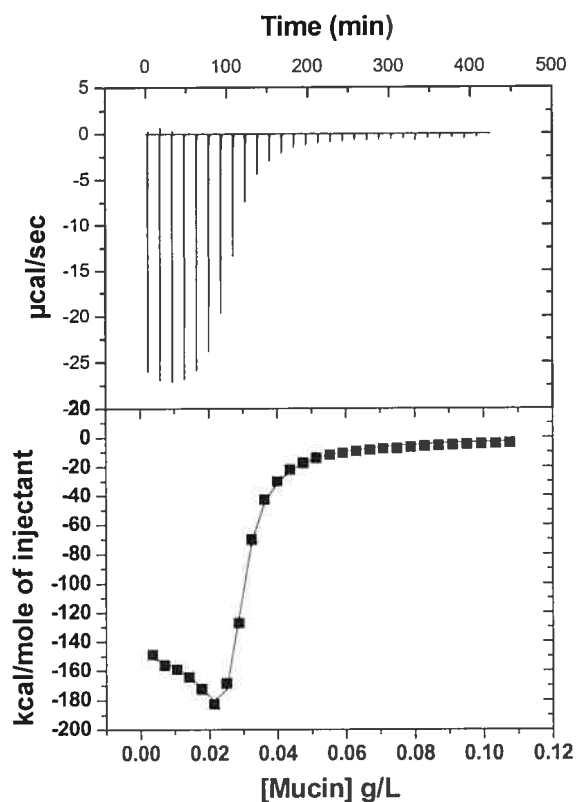


**Figure 5: Effect of ionic strength on the adsorption of mucin/chitosan system on an hydrophobically modified gold surface. pH = 4, temperature = 25°C, mucin and chitosan concentrations = 0.5 g/L.**

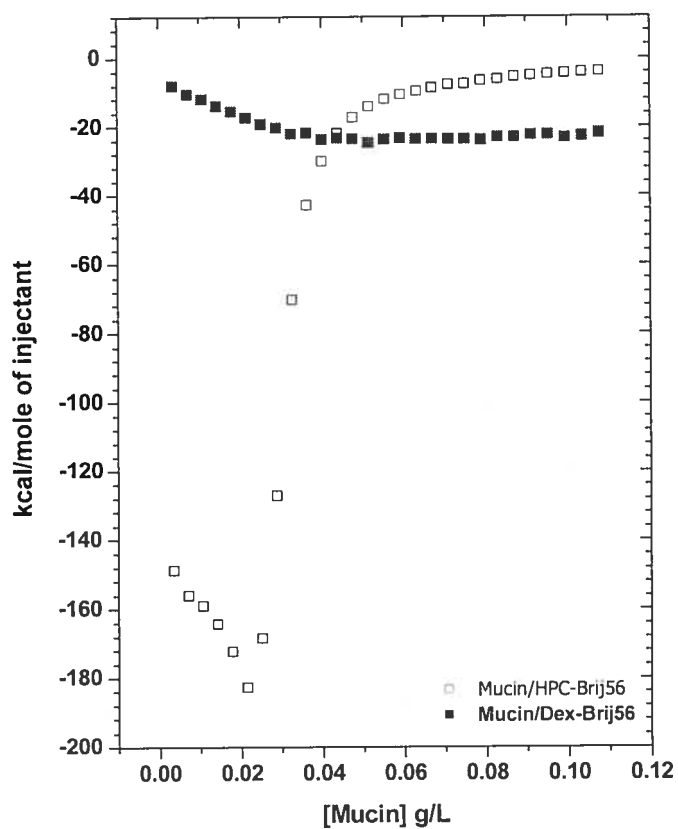




**Figure 6: SPR measurements of adsorption of mucin/polymer system on an hydrophobically modified gold surface. The time course was measured by SPR. The (\*) indicates the postadsorption rinsing with 2 mL of buffer and the arrows show the time of injection of mucin and polymer. The buffer contained 50mM Tris-HCl and 150mM NaCl at pH 7.6 and 25°C. The experiments were performed at pH 2, 25°C.**



**Figure 7: Calorimetric titration of HM- HPC with mucin (0.5g/L) in Tris buffered saline containing 50mM Tris-HCl and 150mM NaCl at pH 7.6 and 25°C. The experiment was performed at pH 3. *The upper panels show heat released per the addition of 5µL of HPC-Brij56 sample from the syringe. The integration of the peaks in the upper panels yielded a  $\Delta H^0$  per injection (lower panels) and the solid lines show the best fit obtained by least squares regression using a one-site model.***



**Figure 8: Differential enthalpic curves for titration of 0.1 g/L HM-HPC (□) or HM-DEX10 (■) onto mucin solution (0.5g/L). pH 3, temperature = 25°C and [NaCl] = 150mM.**

**Table 1: Characteristics of the hydrophobically modified polymers.**

	HPC-g-(POE) <sub>10</sub> -C <sub>16</sub> <sup>1</sup>	DEX10-g-PEG-C <sub>16</sub> <sup>2</sup>
Mw (Da)	80 000	10 000
Graft (POE) <sub>10</sub> -C <sub>16</sub> (mol %)	0.9 ± 0.1	7.0
CAC (mg/l)	75 ± 14	6.5
Mean diameter of polymeric micelles (nm)	85 ± 2	9 ± 0.3

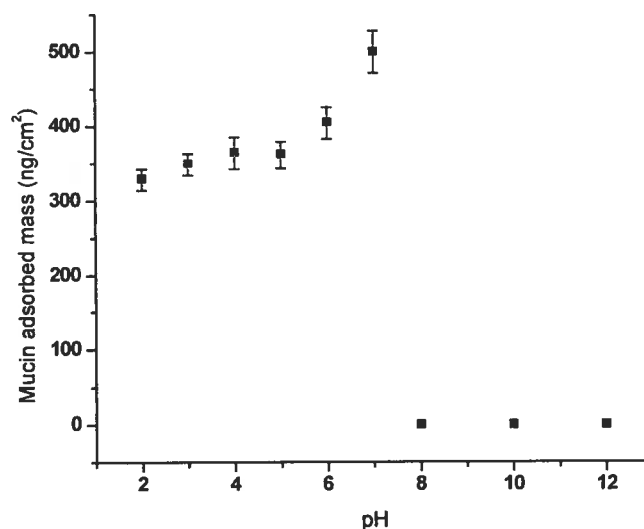
<sup>1</sup> Francis, M.F. and al. *J. Control. Release*, **2003**, 98, 59.

<sup>2</sup> Francis, M.F. and al. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, **2003**, 56, 337.

### 3. Résultats et Discussion

Les résultats mentionnés auparavant montrent une bonne adsorption de la mucine sur une surface modifiée par des groupements hydrophobes, que ce soit par QCM ou par SPR. Cette adsorption est indépendante de la température ainsi que de la valeur de la force ionique du moment où, pour le même pH et la même concentration en solution, la quantité de mucine adsorbée reste constante malgré l'augmentation de la température (de 25° à 37°C) ou de la concentration de sel (de 0.15 M à 1 M). Cependant, le fait qu'il soit possible de mesurer une assez importante adsorption à haute concentration de NaCl (1 M) suggère que l'adsorption de la mucine est contrôlée surtout par des interactions hydrophobes non ioniques entre la mucine et la partie hydrophobe sur la surface d'or utilisée.

D'autre part, l'étude de l'effet du pH sur l'adsorption de la mucine utilisant des valeurs allant de 2 à 12 a été effectuée (*Figure 3.1*). Les résultats observés montrent une augmentation progressive de la masse de mucine adsorbée de pH 2 atteignant un maximum à pH 7. Cependant, à pH basique (8, 10 et 12), l'adsorption de cette dernière est nulle.



**Figure 3.1 :** Masse de mucine adsorbée (en ng/cm<sup>2</sup>) sur la surface modifiée du cristal d'or en fonction du pH du milieu.

Après adsorption de la mucine sur la surface hydrophobe du cristal, l'étude des propriétés mucoadhésives des polymères utilisés, modifiés ou non, a montré qu'en comparant le pouvoir d'adsorption de l'HPC et du DEX10, une faible différence est notée laissant supposer que l'HPC est plus mucoadhésif que le DEX10. Cependant, cette différence n'est pas très significative. Cette étude a donc été complétée par celle de la mucoadhésion de ces mêmes polymères modifiés hydrophobiquement (HM-HPC, HM-DEX10). Ces derniers sont des polymères amphiphiles synthétisés au sein de notre laboratoire. En solution et à une concentration donnée (CAC), ces polymères vont former ce que l'on appelle des micelles polymères très utilisées dans le domaine de relargage de médicaments. Francis M. et al.<sup>1,2</sup>, après études des différentes

caractéristiques de ces micelles, les ont utilisés pour l'incorporation et le relargage d'un médicament peu soluble dans l'eau; la cyclosporine A. En résumé, il a été démontré que ces micelles entraînent une augmentation de la solubilité de ce médicament lipophile ce qui devrait améliorer sa biodisponibilité. Ces micelles ont aussi fait l'objet d'études de cytotoxicité envers les cellules épithéliales de l'intestin. Aucune toxicité n'a été décelé. Le nouveau concept a été d'étudier les propriétés mucoadhésives de ces micelles.

### 3.1 Étude de mucoadhésion des micelles d'HM-HPC et d'HM-DEX10 :

Cette étude a été effectuée en utilisant trois méthodes différentes à savoir le QCM, la SPR et l'ITC. Les résultats vus précédemment ont montrés que l'ajout des micelles d'HM-HPC ou de HM-DEX10 sur la couche de mucine entraîne un plus grand changement du signal enregistré par QCM par rapport à celui observé après ajout des polymères non modifiés. La présence de groupements hydrophobes augmente amplement la mucoadhésion de ces polymères et induit également l'augmentation de la viscoélasticité des couches suite à l'augmentation du paramètre de dissipation D. Ce phénomène peut être expliquer par le fait que la mucine comporte deux types de groupements permettant d'induire une interaction mucoadhésive potentielle, à savoir la présence de fonction acide chargée sur l'acide sialique et autres résidus sulfonaté ainsi que celle de groupement méthyle hydrophobe sur les résidus fucose.<sup>3</sup> Ceci indique l'existence d'interactions hydrophobes entre la mucine et les polymères modifiés. Cette mucoadhésion est toutefois indépendante du pH (de pH 2 à 6 en utilisant le

chitosan comme référence) et de la température (25° et 37°C). En comparant les deux polymères modifiés entre eux, que ce soit par QCM ou par ITC, l'adsorption de l'HM-HPC sur la mucine s'avère meilleure que celle de l'HM-DEX10 du moment où, d'une part, le QCM montre une augmentation de l'épaisseur de la couche de 11 nm pour l'HM-HPC tandis qu'elle n'est que de 3 nm pour l'HM-DEX10. D'autre part, la chaleur dégagée enregistrée par ITC suite à l'interaction entre la mucine et l'HM-HPC montre que les micelles d'HM-HPC interagissent d'une manière considérable avec la mucine (190 kcal/mole de mucine vs 25 kcal/mole pour l'HM-DEX10). Une corrélation entre ces résultats et ceux trouvés par QCM et SPR peut être notée. Cependant, la différence du signal observée par SPR n'est pas aussi significative que celle obtenue par QCM, probablement due au fait que pour la SPR, le signal n'est pas directement proportionnel à l'épaisseur de la couche adsorbée mais dépend également de l'indice de réfraction des polymères. L'épaisseur de chacune des couches adsorbées déterminée à l'aide d'un logiciel approprié a montré une valeur de 2 nm pour la couche de mucine et des valeurs de 7.8 nm pour la couche d'HM-HPC et 2 nm pour celle de l'HM-DEX10.

En combinant les shift de fréquence et de dissipation enregistrés lors des expériences effectuées, une large différence est notée concernant l'adsorption et les propriétés viscoélastiques de ces deux polymères une fois attachés à la mucine. Sachant que le pourcentage de groupements hydrophobes greffés sur le DEX10 utilisé est de 7% et que la taille des micelles de l'HM-DEX10 en solution est de  $9 \pm 0.3$  nm, on peut supposer que les micelles d'HM-DEX10 formées sont monomoléculaires et que la partie hydrophobe forme le corps de la micelle. Par conséquent, l'interaction entre



l'HM-DEX10 et la partie hydrophobe de la mucine est moins importante. Au contraire, dans le cas de l'HM-HPC où le pourcentage de groupements hydrophobes greffés est de 0.9% et la taille des micelles en solution est de  $85 \pm 2$  nm, on peut penser à la présence de micelles multichaînes avec des groupements hydrophobes à la surface pouvant être accessible pour les interactions avec la mucine.

En étudiant l'effet de la force ionique sur la mucoadhésion des polymères par QCM, les résultats montrent que, pour le même pH et la même concentration en solution, la quantité de polymère adsorbée diminue avec l'augmentation de la concentration en NaCl; les valeurs enregistrées variant d' $\sim 600$  Hz pour 0.15 M de NaCl à  $\sim 400$  Hz pour 1.0 M. Le même comportement a été observé dans le cas de l'HM-DEX10. Il y a, cependant, un signal assez important qui persiste malgré la présence d'une forte concentration de sel ce qui révèle une mucoadhésion assez significative pouvant être due à des liaisons hydrogènes connues comme étant important dans le phénomène de mucoadhésion des polymères modifiés. Ce phénomène de « salting-out » peut être probablement lié à une faible diminution de la solubilité des groupements hydrophobes attachés au polymère. Les chaînes de polymère vont alors avoir tendance à former des agrégats entre elles ce qui va rendre les groupements hydrophobes moins accessibles et diminuer le phénomène de mucoadhésion.

Un autre point intéressant a été d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne hydrophobe ou du pourcentage de groupements hydrophobes greffés sur l'adsorption des polymères.

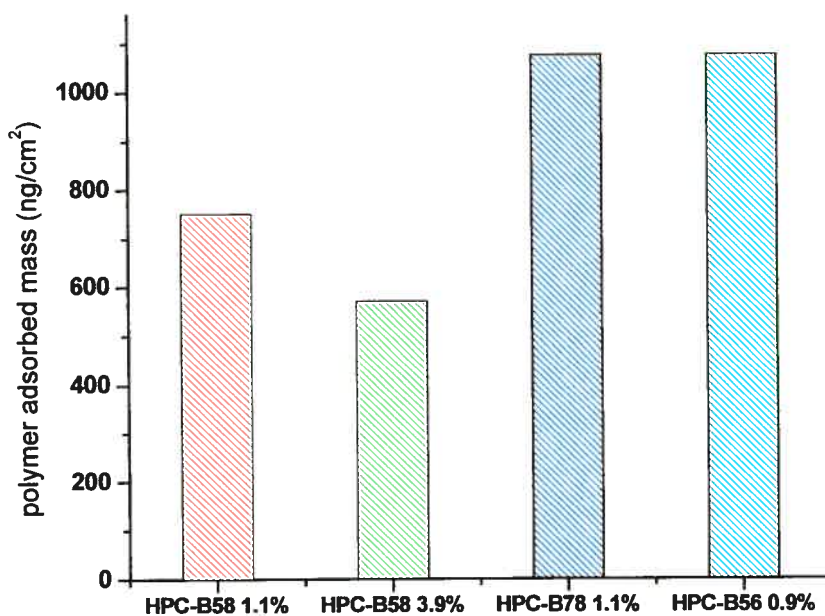
### 3.2 Étude par QCM de la mucoadhésion de HM-HPC et HM-Dex avec différents groupements hydrophobes:

Afin d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne hydrophobe et du pourcentage de groupements hydrophobes greffés sur l'adsorption de l'HPC et du DEX10, une série d'expériences a été effectuée par QCM en utilisant les mêmes conditions que précédemment ( $\text{pH} = 3$ ,  $[\text{NaCl}] = 0.15 \text{ M}$ ,  $[\text{polymère}] = 0.5 \text{ g/L}$  et  $T = 25^\circ\text{C}$ ). Les polymères étudiés sont représentés dans le tableau ci-dessous (*Tableau 3.1*).

**Tableau 3.1** : Propriétés des différents polymères étudiés.

polymères	% greffage	CAC (mg/L)	Diamètre des micelles (nm)
HPC-B56 (POE <sub>10</sub> -C <sub>16</sub> )	0.9	75±14	85±2
HPC-B78 (POE <sub>20</sub> -C <sub>18</sub> )	1.1	135±10	85±1
HPC-B58 (POE <sub>20</sub> -C <sub>16</sub> )	3.9	15±5	78±1
HPC-B58 (POE <sub>20</sub> -C <sub>16</sub> )	1.1	65±12	90±1
DEX-B56	6	6.5	28
DEX-B56	9	4.3	102
DEX-B56	15	2.86	82

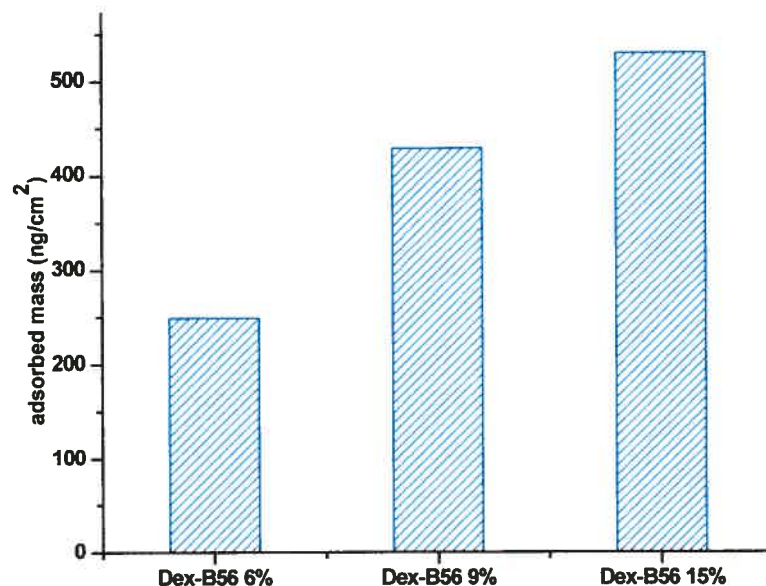
## 3.2.1 Études d'HM-HPC :



*Figure 3.2* : Étude de la mucoadhésion de différents HM-HPC.

La figure 3.2 montre l'adsorption de chacun des HM-HPC, cités dans le tableau 3.1, sur la couche de mucine préalablement adsorbée. En allant par ordre d'hydrophobicité croissante (de HPC-B58 1.1% qui est supposé contenir la chaîne la moins hydrophobe à HPC-B56 0.9% qui est considérée comme la partie la plus hydrophobe), on constate que la masse de polymère adsorbée pour l'HPC-B58 diminue de 100 ng/cm<sup>2</sup> lorsque le pourcentage de greffage passe de 1.1 à 3.9 %.

### 3.2.2 Études d'HM-DEX10 :



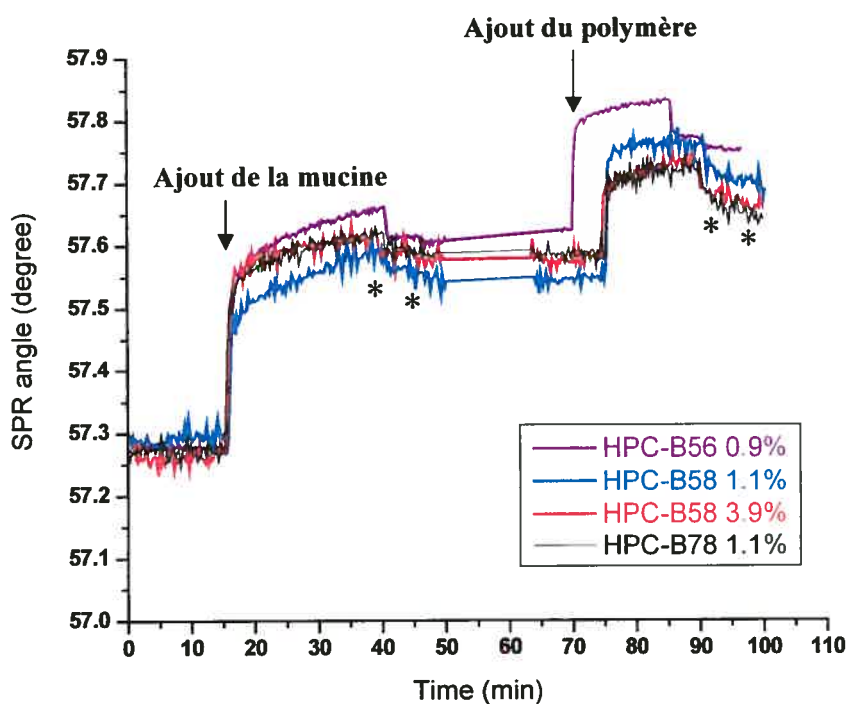
*Figure 3.3* : Étude de mucoadhésion du Dex-B56 à différents pourcentages de greffage.

La figure ci-dessus montre une augmentation croissante de la masse de Dex-B56 adsorbée sur la mucine au fur et à mesure que la partie hydrophobe greffées sur le polymère est plus importante. Les valeurs augmentent de 250 ng/cm<sup>2</sup> pour le Dex-B56 greffé à 6% à 530 ng/cm<sup>2</sup> pour un greffage de 15%. Ceci peut être expliquer par le fait que plus il y a de groupements hydrophobes sur le polymère, plus ces groupements auront tendance à former des liaisons hydrogènes ce qui implique une mucoadhésion plus importante.

### 3.3 Étude par SPR de la mucoadhésion de HM-HPC et HM-Dex avec différents groupements hydrophobes :

Après l'étude faite par QCM, il a été intéressant de voir si les mêmes résultats seront obtenus par SPR et ceci en utilisant des conditions identiques que précédemment.

#### 3.3.1 Études d'HM-HPC :

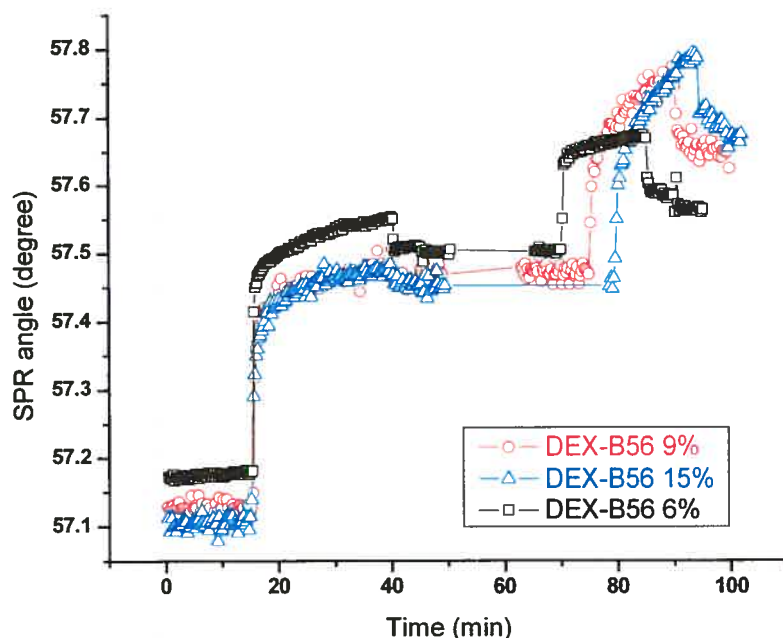


*Figure 3.4:* Étude d'adsorption du système mucine/HM-HPC sur la surface d'or modifiée utilisant la SPR. Les (\*) indiquent les étapes de rinçage avec 2 mL de solution tampon et les flèches montrent le temps d'injection de la mucine et des polymères.

La figure ci-dessus montre le profil d'adsorption après ajout des solutions de mucine puis des différents HM-HPC sur la surface du prisme de SPR à pH acide. Une courbe de cinétique est enregistrée après chaque étape d'injection en traçant la variation de l'angle de résonance en fonction du temps.

Après ajout des polymères sur la couche de mucine pré-adsorbée, il en résulte une augmentation de l'angle de résonance qui s'avère un peu plus importante pour l'HPC-B56 (0.9%) témoignant de la meilleure adsorption de ce dernier sur la mucine. Cependant, pour les autres polymères, à savoir, HPC-B58 1.1%, HPC-B58 3.9% et HPC-B78 1.1%, la différence du signal n'est pas aussi significative que celle observée en utilisant le QCM, probablement due au fait que pour la SPR, comme mentionné précédemment, le signal n'est pas directement proportionnel à l'épaisseur de la couche adsorbée mais dépend également de l'indice de réfraction des polymères. Les rinçages avec la solution tampon après chaque étape d'injection n'ont entraîné qu'une faible diminution de l'angle enregistrée correspondant à une faible désorption des polymères.

## 3.3.2 Études d'HM-DEX10 :



*Figure 3.5:* Étude d'adsorption du système mucine/HM-DEX10 sur la surface d'or modifiée utilisant la SPR. Les (\*) indiquent les étapes de rinçage avec 2 mL de solution tampon et les flèches montrent le temps d'injection de la mucine et des polymères.

La figure 3.5 montre une augmentation croissante de la masse de Dex-B56 adsorbée sur la mucine au fur et à mesure que la partie hydrophobe greffée sur le polymère est plus importante. Ceci concorde avec les résultats obtenus par QCM. Les rinçages avec la solution tampon après chaque étape d'injection n'ont entraîné qu'une faible diminution de l'angle enregistrée correspondant à une faible désorption des polymères.

## 3.4 Références :

- 
1. Francis, M.F.; Piredda, M.; Winnik, F.M. *J. Control. Release.* **2003**, *93*, 59.
  2. Francis, M.F.; Lavoie, L.; Winnik, F.M.; Leroux, J.C. *European J. of Pharm. and Biopharm.* **2003**, *56*, 337.
  3. Harding, S.E. Mucoadhesive interactions. *Biochem. Society transactions*, **2003**, *31*, 1036.



#### 4. Conclusions générales.

Le but de ce travail était d'étudier, par différentes méthodes, les éventuelles interactions entre la mucine et certains polymères connus pour leurs propriétés bio(muco)adhésives. En d'autres termes, il s'agissait d'étudier les propriétés mucoadhésives de l'hydroxypropylcellulose et du dextran, modifiés par des groupements hydrophobes ou non. Le chitosan, connu comme adhérent à la mucine via des interactions électrostatiques et hydrophobes et ayant fait l'objet de plusieurs recherches antérieures, a été choisi comme référence.

L'adsorption de la mucine et de chacun des polymères cités précédemment fut étudiée par trois méthodes différentes à savoir le QCM, la SPR et l'ITC. Il fut démontré dans un premier temps que la mucine, qui est une glycoprotéine possédant des groupements hydrophobes importants pour le phénomène de bioadhésion, adhère de façon significative à la surface utilisée, surface d'or qui a été modifiée hydrophobiquement et ceci, indépendamment du pH, de la force ionique et de la température. Cette adhésion est donc probablement due aux interactions hydrophobes résultantes entre les groupements hydrophobes de la mucine et ceux de la surface.

Les mesures d'adsorption des polymères, quant à elles, montrent directement que l'HM-HPC possède des propriétés mucoadhésives pouvant être assez pertinentes dans le domaine de relargage de médicaments par voie orale. D'autre part, les données obtenues montrent que l'HPC adhère faiblement à la couche de mucine préalablement adsorbée tandis que le DEX10, dans les mêmes conditions, ne génère aucune variation du signal enregistré. Cependant, l'addition de groupements hydrophobes augmente à la fois la masse d'HPC et de DEX10 adsorbée à la mucine ainsi que leurs propriétés

viscoélastiques à pH acide. Il a aussi été démontré que l'HM-HPC était plus bioadhésif que l'HM-DEX10 vis-à-vis de la mucine du moment où ce polymère adhère à la fois à la mucine soluble et à la couche de mucine adsorbée. Les résultats obtenus ont également montré que plus la partie hydrophobe du polymère modifiés est importante, plus la mucoadhésion de ces derniers est meilleure.

