



THESE DE DOCTORAT

Spécialité: SCIENCES CHIMIQUES

SYNTHESES, ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET PREFORMULATION D'UN DERIVE PYRIDO[3,2g]QUINOLEINE TRIMETHYLE

Thèse de Djamila ABBAS

Présentée et soutenue publiquement le 10 décembre 2010

DEA: Synthèse et Modélisation de Molécules Bioactives (SM2B)

Pr. J.P. Reynier	Président
Pr. P. Piccerelle	Directeur de thèse
Pr. B. Bataille	Rapporteur
Dr. X. Fernandez	Rapporteur
Dr. J. Kaloustian	Examineur
Dr. A. Nicolay	Examineur

Au Nom de Dieu Miséricordieux
بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Monsieur le *Professeur Jean-Pierre REYNIER*

C'est avec une immense reconnaissance, et avec tous mes remerciements pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe et avoir mis à ma disposition tout le nécessaire pour réaliser mon travail. C'est un grand honneur pour moi de vous avoir en tant que Président de mon jury. Merci pour tout ce que vous avez fait.

Monsieur le *Professeur Philippe PICCERELLE*

Quoique je dise, les mots ne seront jamais à la portée de ce que je ressens.

Monsieur le *Professeur Bernard BATAILLE* de l'université de Montpellier

Merci d'avoir bien voulu être l'un des rapporteurs et membre de mon jury. Soyez assuré de ma reconnaissance pour le temps que vous avez consacré à ce mémoire, malgré vos responsabilités.

Monsieur le *Docteur Xavier FERNANDEZ* de l'université de Nice Sophia Antipolis

Merci d'avoir trouvé le temps de lire et de corriger mon travail de thèse et cela malgré votre emploi du temps chargé. Je vous remercie d'avoir bien voulu être l'un des mes rapporteurs et membre du jury.

Monsieur le *Docteur Alain NICOLAY*

Ton aide, tes conseils, ta gentillesse m'ont été précieux. Je n'ai qu'un mot **Merci**. Merci d'avoir été là, d'avoir su résoudre les problèmes, et d'avoir été toi.

Monsieur le *Docteur Jacques KALOUSTIAN*

Vous avoir consulté pour me conseiller m'a permis de connaître une personne gentille, attentionnée, sachant être à l'écoute quand j'en avais besoin. Je vous remercie pour votre aide, vos conseils et votre totale implication dans mon travail. Encore une fois **Merci**.

A mes parents, ma sœur et mes frères

Que vous dire si ce n'est un grand Merci !

Merci d'avoir supporté ces longues absences et ces brèves vacances.

Merci à maman Et papa d'avoir toujours veillé à mon confort. Je sais que vous vous êtes fait beaucoup de souci et n'y a pas de mots assez forts pour vous exprimer tout mon amour.

Je n'oublie pas mes deux frères et ma sœur pour leur amour. Quand Le courage venait à me manquer, le simple fait de penser à vous trois me remettait du baume au coeur.

Et mes trois petits amours Asma, Ayoub et Keltoum que je n'ai pas vu grandir, mille et un bisous.

A,

Geneviève, Marie-Christine, Daniel, Natacha et Marc, Véro, Jacques-Jacques, Domi, merci de votre soutien moral, encouragements et interdiction d'abandonner la partie au fil des années, de vos invitations à dîner, vos coups de téléphone et autre...Votre amitié est de loin la plus précieuse et j'espère que nous partagerons beaucoup d'autres beaux moments.

et tous mes amis, qui je suis sûre se reconnaîtront sans que j'aie à les citer tous (il faudrait plusieurs pages pour ça), merci pour votre soutien, votre amitié, vos encouragements....

A,

Sosso, Lulu, Patou, Claudette et tout le reste de la famille, merci pour votre affection, vos soins, votre soutien, vous êtes pour moi ma deuxième famille.

AU LABORATOIRE DE PHARMACIE GALENIQUE

A **Mme Mireille Leclère** qui m'a toujours aidé avec gentillesse et a été témoin de bien des étapes de mon doctorat.

A **Caro** grâce à ton aide, la galénique fut une partie de plaisir. Ta gentillesse, ta disponibilité et ton amitié m'ont été précieuses tes explications m'ont éclairées et je suis très heureuse de te compter parmi mes amis.

Et à tous les membres du laboratoire de galénique **Mme Véronique Andrieu, Mme Marie-Pierre Savelli** et tous ceux qui m'ont aidés et qui ne sont pas cités.

AU LABORATOIRE DE CHIMIE ANALYTIQUE

Je remercie **M. J. Kaloustian** d'avoir pris soin de m'expliquer les mystères de la DSC et d'avoir pu réparer les erreurs des autres. J'ai découvert un homme avec un grand cœur et j'espère que l'on restera en contact malgré votre départ à la retraite et la fin de mon cycle universitaire, enfin!

Je n'oublie pas **M. Alain Nicolay**, sans lui l'analyse l'IRTF n'aurait pu se faire. Je te remercie pour ton soutien, ton implication dans mon travail et tu sais de quoi je parle, je n'ai pas les mots et je regrette ton absence le jour de ma soutenance. Je te remercie pour tout ce que tu as fait.

AU LABORATOIRE DE CHIMIE ORGANIQUE

Merci à Monsieur le **Professeur Jacques BARBE** et en particulier à **Mme Galante, M. Brouant**, pour leur soutien et amitié. Je suis contente que vous ayez pu y assister enfin!

A Mme Muriel Costanzo,

Je vous remercie infiniment de vous être rendue disponible pour moi dans tous les moments si difficiles au cours de mon Doctorat. Vous avez su gérer au mieux toutes les contraintes administratives et pas des moindres. Encore un grand Merci.

Sommaire

Introduction générale	Page 1
Chapitre I: la résistance multiple aux médicaments: Aspects biologiques	page 7
I. Introduction	page 8
II. Structure des protéines de transport	page 9
II.1. La Pgp170	page 9
II.2. La MRP1	page 10
III. Les substrats de la MDR	page 11
III.1. Les molécules soumises à la MDR ou substrats	page 11
III.2. Les modulateurs ou chimiosensibilisateurs	page 11
IV. Pgp et MRP1: Mécanismes d'action	page 11
IV.1. Pgp: transporteur spécifique ATP-dépendant	page 12
IV.2. Pgp: une pompe à efflux sélective ATP-dépendante	page 12
IV.2.1. Le modèle des pores aqueux	page 12
IV.2.2. le modèle de la répartition altérée	page 13
IV.2.3. autre hypothèse	page 13
IV.3. Sites actifs	page 13
V. Pgp et MRP1: leurs fonctions physiologiques	page 14
VI. MDR et cancer	page 17
VII. Réversion de la MDR	page 18
VII.1. Contrôle pharmacologique des protéines de transport	page 18
VII.1.1. Chimiothérapie à haute dose	page 18
VII.1.2. Utilisation d'anticancéreux non-substrats de la Pgp	page 18
VII.1.3. Blocage de l'efflux	page 19
VIII. MDR et paludisme	page 23
VIII.1. Introduction	page 23
VIII.2. chloroquinorésistance et protéines de transport	page 23
VIII.3. Réversion de la chloroquinorésistance	page 24
IX. MDR et bactéries	page 25
IX.1. Introduction	page 25
IX.2. Notions sur les bactéries	page 25
IX.3. Notions sur les antibiotiques	page 26
IX.4. Antibiotiques et résistance	page 26
IX.4.1. Mécanismes de résistance	page 27
IX.4.2. Accumulation de mécanismes acquis de résistance: la multi-résistance	page 28
IX.5. Protéines de transport et bactéries	page 28
IX.5.1. Les transporteurs secondaires	page 28
IX.5.2. Les transporteurs ABC	page 30
IX.6. Mécanismes d'action	page 30
X. Conclusion	page 31

Chapitre II: Synthèse chimique du BG 637

Choix du composé à étudier

Chimie

I. Historique des pyridoquinolèines

II. Synthèse des pyridoquinolèines

II.1. Première étape: condensation

II.2. Deuxième étape: cyclisation

II.3. Préparation des pyrido[3,2-g]quinolèine-4,6-dithiones

II.4. Préparation d'éther de la 2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinolèine-4,6-dione

II.5. Préparation des 2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinolèines

II.6. Préparation des 4,6-dialkyaminoalkylamino-2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinolèine

Partie expérimental: modes opératoires

Schéma général de synthèse

III. Conclusion

page 32

page 33

page 34

page 35

page 37

page 37

page 38

page 38

page 38

page 39

page 39

page 41

page 50

page 51

Chapitre III: Etudes des propriétés physico-chimiques du BG 637

Introduction

Aspects bibliographiques

I. Principe actif

II. Les propriétés chimiques

II.1. La nature du principe actif

II.2. L'état de pureté

II.3. La monographie

II.4. Polymorphisme et état cristallin

III. Propriétés physiques

III.1. Le pouvoir de dissolution

III.2. La granulométrie ou taille des particules

III.3. Les densités vraie et apparente

III.4. La porosité

III.5. La surface spécifique

III.6. Le coefficient de partage et le coefficient d'ionisation

III.7. Etude de la stabilité du produit

IV. Conclusion

Propriétés physico-chimiques du BG 637: les résultats

I. Les propriétés chimiques

I.1. La nomenclature

I.2. Structure moléculaire

I.3. Propriétés organoleptiques

I.4. Le point de fusion

I.5. Activité optique

I.6. Analyse Thermique Différentielle (DSC)

I.7. Caractéristiques spectrales

I.7.1. Spectroscopie UV-VIS

page 52

page 53

page 55

page 56

page 56

page 56

page 56

page 57

page 59

page 60

page 60

page 61

page 62

page 62

page 62

page 62

page 64

page 65

page 66

page 67

page 67

page 67

page 67

page 68

page 68

page 68

page 71

page 71

I.7.2. La courbe étalon	page 73
I.7.3. La Résonance Magnétique Nucléaire	page 73
I.7.4. Diffraction aux rayons X	page 75
I.7.5. La spectrométrie de masse	page 77
I.7.6. La spectrométrie Infra Rouge à Transformée de Fourier	page 83
I.8. Les impuretés	page 84
II. Les propriétés physiques	page 85
II.1. La solubilité	page 85
II.1.1. Solubilité en fonction des solvants	page 85
II.1.2. Solubilité en fonction du pH	page 86
II.1.3. Essai de solubilité dans les solutions pH 1,2 et pH 6,8	page 87
II.1.4. La granulométrie ou taille des particules	page 88
II.1.4.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)	page 88
II.1.4.2. Granulométrie laser	page 88
II.1.5. Coefficient de partage et coefficient d'ionisation	page 90
II.1.6. Tests de stabilité selon l'ICH	page 90
III. Conclusion	page 92

Chapitre IV: Interactions principe actif / excipients

page 94

Introduction

page 95

Aspects bibliographiques

page 96

I. Les excipients

page 97

 I.1. Définition

page 97

 I.2. Classification

page 97

 I.2.1. Les diluants

page 98

 I.2.2. Les désagrégants ou délitant

page 98

 I.2.3. Les lubrifiants

page 98

 I.2.4. Les liants ou agglutinants

page 99

 I.2.5. Les adjuvants divers

page 99

II. Etude des interactions physico-chimiques

page 100

 II.1. Définition

page 100

 II.2. Les incompatibilités chimiques principe actif / excipients

page 101

 II.3. Evaluation des interactions physico-chimiques

page 101

Expérimentation

page 103

I. Protocole

page 104

 I.1. Choix des excipients

page 104

 I.1.1. L'hydroxypropylméthylcellulose

page 104

 I.1.2. Le mannitol

page 105

 I.1.3. Le lactose

page 105

 I.1.4. Le stéarate de magnésium

page 105

 I.1.5. Starch ou Glycolate

page 106

 I.1.6. La povidone

page 106

 I.1.7. Le talc

page 106

 I.1.8. La crospovidone

page 106

 I.1.9. La croscarmellose sodique (Ac-di-sol®)

page 107

 I.2. Les mélanges

page 107

 I.3. Analyses des mélanges

page 108

 I.3.1. DSC des mélanges binaires

page 109

 I.3.2. Analyse UV des mélanges binaires

page 113

I.3.3. Discussion	page 115
I.3.4. Analyse des mélanges binaires par IRTF	page 116
I.4. Conclusion	page 118

Chapitre V: Mise en forme galénique orale: le comprimé page 119

Introduction	page 120
Formulation: Aspect bibliographique	page 122
I. Les comprimés	page 123
I.1. Définition	page 123
I.2. Classification	page 123
II. Les facteurs influençant la rhéologie des poudres	page 124
II.1. La densité	page 124
II.2. La structure atomique et la composition chimique	page 124
II.3. La porosité	page 125
II.4. La morphologie	Page 125
II.5. La taille et la granulométrie	page 125
II.6. Humidité	page 125
II.7. Electricité statique	page 125
II.8. Conditions d'écoulement	page 125
II.9. La surface	page 126
III. la fabrication des comprimés	page 126
III.1. La granulation	page 128
III.2. La compression	page 128
III.3. Le temps de délitement ou de désagrégation	page 130
III.4. Le test de dissolution	page 130
III.5. Le contrôle macroscopique	page 132
III.6. La dureté ou la résistance à la rupture	page 133
III.7. La friabilité	page 133
Formulation: Aspect technique	page 134
I. Introduction	page 135
I.1. Rappel	page 136
I.2. Formulation du placebo	page 136
II. Formulation du comprimé avec le principe actif	page 138
II.1. Premier essai: formule 1	page 139
II.2. Deuxième essai: formule 2	page 142
III. Conclusion	page 144

Conclusion et Perspectives page 145

Les Annexes page 148

Bibliographie page 152

Publications scientifiques page 184

Liste des figures

Figure 1	Différentes étapes de l'étude d'un principe actif	Page 6
Figure 2	Structure de la Pgp, MRP 4, Mrp 5 et MRP 7	Page 10
Figure 3	Structure des protéines MRP 1,2,3 et 6	Page 10
Figure 4	Pompe "classique": cycle d'absorption et d'excrétion d'un substrat	Page 12
Figure 5	Aspirateur hydrophobe	Page 13
Figure 6	Flippase	Page 13
Figure 7	Représentation du modèle de Stein	Page 13
Figure 8	Représentation schématique des transporteurs secondaires chez les procaryotes	Page 29
Figure 9	Mécanismes de transport des protéines	Page 31
Figure 10	Schéma général des synthèses	Page 50
Figure 11	Spectres DSC du BG 637	Page 70-71
Figure 12	Spectre UV du BG 637 réalisé dans l'éthanol absolu avec une cuve de 1 cm	Page 72
Figure 13	Spectre RMN du proton du BG 637	Page 74
Figure 14	Spectre RMN du carbone 13 du BG 637	Page 75
Figure 15	Cristallographie du BG 637	Page 76
Figure 16	Spectre de diffraction aux rayons X de la poudre	Page 77
Figure 17	Chromatogramme du BG 637 en spectroscopie de masse	Page 79
Figure 18	Spectre de masse du BG 637	Page 80
Figure 19	Agrandissements du spectre de masse du BG 637	Page 81
Figure 20	Principaux fragments du BG 637	Page 82
Figure 21	Spectre IRTF du BG 637 entre 4000 et 500 cm^{-1} (résolution de 4 cm^{-1} , 30 balayages)	Page 84
Figure 22	Image par MEB du BG 637	Page 88
Figure 23	Courbes DSC des excipients	Page 111
Figure 24	Spectre UV du mélange mannitol/BG 637 au cours du temps	Page 114
Figure 25	Du haut vers le bas, spectres IRTF du BG pur et du mélange BG/stéarate de magnésium à l'obscurité et à la lumière	Page 117
Figure 26	Du haut vers le bas spectres du mélange BG lactose à la lumière, du BG 637 seul et du mélange BG lactose à l'obscurité, sans soustraction du spectre de l'excipient.	Page 117

Figure 27	Fabrication des comprimés : différentes possibilités	Page 127
Figure 28	Schéma principal du cycle de compression sur presse alternative	Page 129
Figure 29	Comprimés plat (a), avec chanfrein (b), bombé (c) et sécable (d et e)	Page 130
Figure 30	Appareil de contrôle de dissolution : système à palettes	Page 131
Figure 31	Appareil de détermination de la friabilité des comprimés	Page 133
Figure 32	Courbe de dissolution du BG 637 à pH 1,2	Page 144

Listes des tableaux

Tableau 1	Localisation tissulaire des protéines de transport	Page 16
Tableau 2	Agents reversant de première génération	Page 20
Tableau 3	Agents reversant de deuxième génération	Page 21
Tableau 4	Reversant de la résistance selon leur classe thérapeutique	Page 22
Tableau 5	Familles des transporteurs secondaires chez les eucaryotes et procaryotes	Page 29
Tableau 6	Evaluation de la solubilité d'un produit selon la P.E.	Page 58
Tableau 7	Données DSC du BG 637: températures et valeurs d'enthalpie (Essais réalisés avec le Setaram)	Page 70
Tableau 8	Principaux fragments et leur intensité relative	Page 79
Tableau 9	Bandes infra rouges caractéristiques du BG 637	Page 84
Tableau 10	Solubilité du BG 637 dans différents solvants	Page 85
Tableau 11	Préparation des mélanges de tampons	Page 86
Tableau 12	Solubilité du BG 637 selon le pH	Page 87
Tableau 13	Exemples de propriétés améliorées par les excipients selon la forme galénique	Page 100
Tableau 14	Les excipients choisis pour l'étude des interactions	Page 108
Tableau 15	Données DSC des excipients: températures et valeurs d'enthalpie (Essais réalisés avec le Setaram, température de chauffe 2°C/min)	Page 110
Tableau 16	Données DSC des mélanges BG 637/ excipients: températures et valeurs d'enthalpie Lactose, Microcristalline cellulose, Polyvinylpyrrolidone PVP K30, Croscarmellose sodique et Stéarate de magnésium (Essais réalisés avec le Setaram, vitesse de chauffe 2°/min)	Page 112
Tableau 17	Temps de délitement des comprimés selon leur type	Page 132
Tableau 18	Les différents composants du comprimé	Page 139
Tableau 19	Poids en gramme des différents composants du comprimé pour un poids total de 50g	Page 139

INTRODUCTION GENERALE

Depuis toujours, l'Homme a cherché à se protéger de la souffrance et de la mort. Il a naturellement puisé dans les ressources de la nature avec ses trois règnes : animal, végétal et minéral, afin de trouver ce quelque chose qui l'aiderait à mieux vivre.

Les plantes ont été utilisées sous différentes formes : baumes, onguents, mélanges, décoctions, huiles essentielles, infusions; pour cela la plante était utilisée sèche ou fraîche, entière ou seulement en partie.

Dès la Haute Antiquité, les substances minérales soignaient bien des maux. C'est ainsi que :

- ✎ Le soufre fut utilisé comme purificateur,
- ✎ Le mercure contre les coliques,
- ✎ Les paillettes de cuivre pour les fractures du crâne,
- ✎ L'argile riche en silicate d'aluminium pour lutter contre la peste,
- ✎ L'or, métal à la pureté absolue, avait la vertu de tout guérir.

Le règne animal fut moins utilisé, on est passé de l'utilisation d'animaux, puis d'organes ou de sécrétions animales à l'extraction de principes actifs. A titre d'exemple, citons, entre autres, l'utilisation de la bile de bœuf et des excréments de gazelles.

La fin du XVIII^{ème} et le début du XIX^{ème} siècle furent marqués par la capacité d'isoler les principes actifs chimiquement identifiés. La morphine de l'Opium, la strychnine extraite de la Noix vomique, la quinine du Quinquina et la digitaline de la Digitale furent parmi les premières substances à avoir été isolées.

La chimie étant devenue une science organisée, soumise à des lois définies et répondant à des règles pouvant être reproduites en laboratoire, l'extraction d'un principe actif à partir d'un végétal, d'un minéral ou d'un animal, a permis l'émergence de substances biologiquement actives, mieux caractérisées et donc mieux utilisées.

Ainsi l'iode a été obtenu à partir des cendres des Varechs en 1811, la morphine de l'Opium en 1817 et l'insuline du pancréas animal en 1922.

La chimie du pétrole et de ses dérivés ont été des alliés majeurs pour le pharmacologue. De 1830 à 1890, l'emploi des substances hydrocarbonées allait devenir la voie incontournable de la créativité pharmaceutique.

L'apparition des médicaments tels qu'ils sont actuellement connus, a considérablement changé la vie des hommes. Leur évolution a permis l'amélioration des traitements. La découverte de la pénicilline

(Fleming, 1928) à titre d'exemple, a permis de mettre en échec un certain nombre de maladies infectieuses.

A partir de ces molécules actives, les scientifiques ont mis au point de nouvelles molécules élargissant ainsi le panel des médicaments susceptibles d'améliorer la thérapeutique déjà existante.

Cependant à la fin du XX^e siècle, une situation d'échec aux traitements chimiothérapeutiques s'est installée et s'est étendue à de nombreuses pathologies. Certaines d'entre elles que l'on croyait éradiquées réapparaissent de nouveau, développant un phénomène de résistance aux médicaments initialement actifs. Ce phénomène a été observé aussi bien au niveau des affections cancéreuses, parasitaires que microbiennes ou fongiques. Parmi toutes les formes de résistances décrites actuellement, une des plus répandue est connue sous le nom de **Résistance Multiple aux Médicaments** ou **MultiDrug Resistance (MDR)**.

Le premier cas de résistance à la quinine, médicament antiparasitaire de référence, fut observé au Brésil en 1910¹. Cette situation a amené les scientifiques à s'interroger sur la (ou les) causes et le (ou les) mécanisme(s) d'action entrant en jeu. Pour rester simple, on dira que la responsabilité de cette forme de résistance incombe à deux glycoprotéines transmembranaires qui sont : la **Pgp 170** et la **MRP1**.

Découvrir de nouvelles molécules pouvant annuler cette résistance, afin de disposer à nouveau de traitements efficaces face à toutes ces maladies anciennes et nouvelles est devenu aujourd'hui sinon une nécessité, du moins, une stratégie thérapeutique séduisante.

Partir des objets de la nature est la démarche la plus évidente, la contourner en opérant des synthèses, donc en créant des espèces chimiques inédites qui se révéleront peut-être actives est une révolution. Un des moyens utilisés est de partir d'une tête de série connue et d'essayer d'y greffer de nouveaux groupements fonctionnels afin de lui conférer de nouveau une activité thérapeutique. L'autre moyen consiste à faire un criblage de molécules, soit par des méthodes *in vitro*, soit par la méthode *in silico* (screening virtuel). Cette dernière ne permet que la conception théorique de molécules leaders, molécules susceptibles d'interagir avec la cible potentielle, le but étant d'essayer par la suite de passer à leur synthèse et aux tests biologiques.

Au-delà de cette découverte qui constitue une étape initiale incontournable, il y a l'étude des propriétés physico-chimiques de la substance, dont le but est d'établir sa monographie conformément aux Pharmacopées en usage.

Du chimiste, le relais passe au galéniste qui doit mettre au point un protocole de formulation adéquat au produit étudié.

L'objet de cette thèse est l'étude, dans une première partie, des propriétés physico-chimiques d'un composé choisi, connu, appartenant à la famille des pyrido[3,2-g]quinoléines.

Un des critères du choix du composé repose sur la reproductibilité de sa synthèse chimique qui nécessite peu d'étapes intermédiaires, contrairement à d'autres molécules appartenant à la même famille. Le second critère tient compte de son éventuelle activité biologique².

En effet, des tests préliminaires, effectués *in vitro* sur ce composé, ont montré une activité réversante de la résistance multiple aux médicaments, déclarée par certaines souches cellulaires cancéreuses².

Les études menées, par l'équipe de chimie thérapeutique, le GERCTOP, sur les composés azahétérocycliques, se limitaient à tester leur pouvoir reversant de la MDR, sur des cellules résistantes. Il nous a semblé intéressant, dans une démarche pédagogique, de mener un travail sur le devenir d'un principe actif de sa découverte à sa mise en forme galénique, tout en sachant que plusieurs étapes sont manquantes telles que les essais cliniques, pour ne citer qu'eux.

Après la synthèse du composé et son identification d'un point de vue physico-chimique, nous avons cherché à établir les interactions pouvant se produire entre ce principe actif et les excipients usuellement utilisés en industrie pharmaceutique, qu'elles soient des interactions de « **synergie** » et donc positives ou au contraire des interactions « **d'incompatibilité** » et donc négatives, pouvant aboutir à une rapide dégradation du principe actif par exemple.

« **Toutes ces données constituent l'étape de préformulation** » qui a pour objectif de récolter les informations nécessaires au choix, puis au développement et à la fabrication d'une forme galénique stable.

« **Enfin dans une dernière étape dite de formulation** », nous avons essayé d'obtenir une forme pour la voie orale. Le choix s'est porté sur la forme comprimée dont le type sera déterminé en fonction des caractéristiques du principe actif étudié sans oublier les résultats de ses interactions avec les excipients choisis.

Ainsi, nous allons aborder tout le long de ce travail les chapitres suivants :

- ☒ Chapitre I : résistance multiple aux médicaments : aspects biologiques
- ☒ Chapitre II : synthèse du BG 637.
- ☒ Chapitre III : étude physico-chimique du BG 637.
- ☒ Chapitre IV : interactions principe actif / excipients.
- ☒ Chapitre V : mise en forme galénique orale : le comprimé.

Toutes ces étapes sont schématisées par la figure 1.

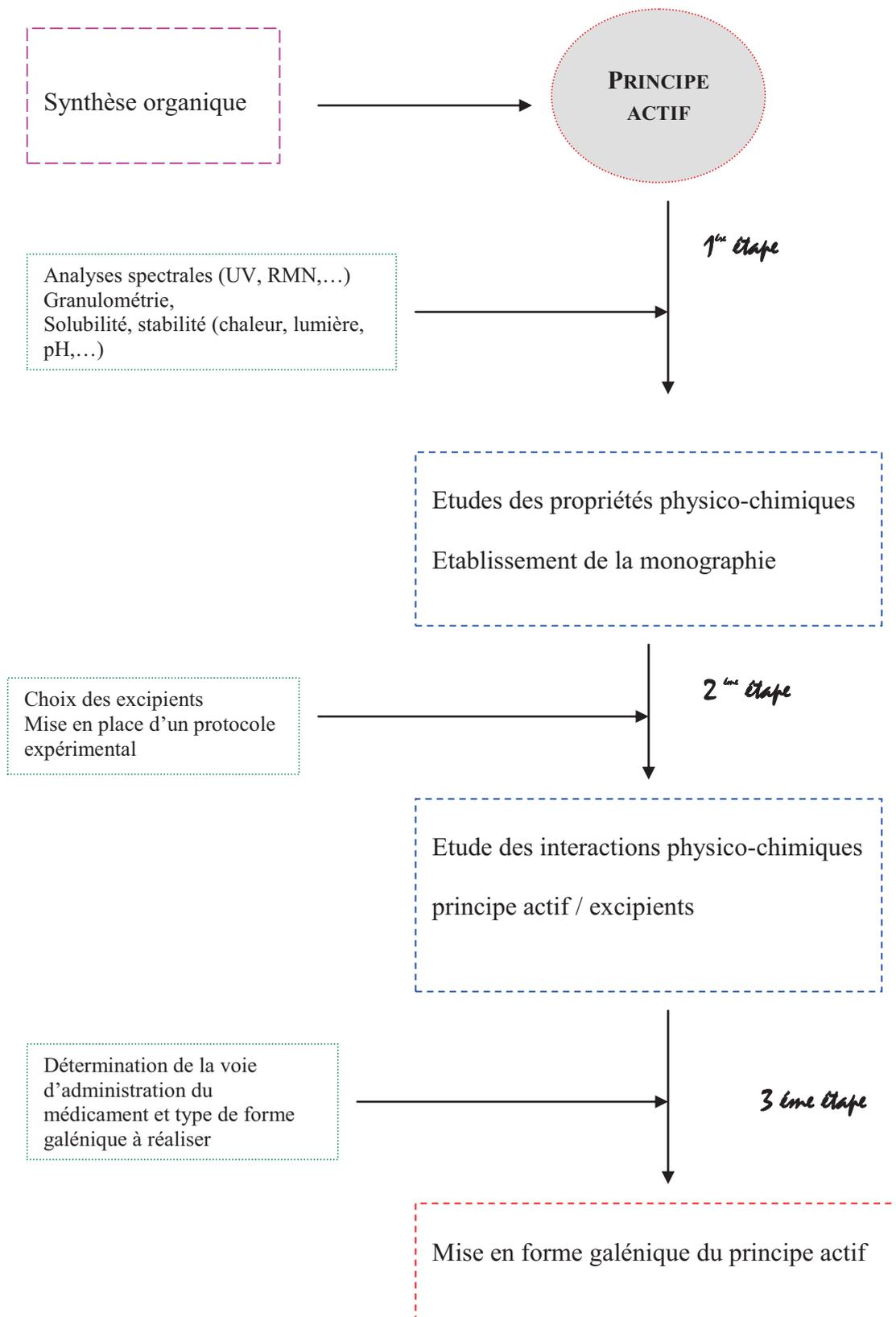


Figure 1 : différentes étapes de l'étude d'un principe actif

Chapitre I

La résistance multiple aux médicaments :

Aspects Biologiques

I. Introduction

La résistance aux médicaments est la principale cause d'échec des traitements anticancéreux, antiparasitaires et anti-infectieux. Au niveau des cellules cancéreuses et des micro-organismes, il a été observé aussi bien *in vitro* que *in vivo* que cette résistance pouvait être d'origine innée (**résistance intrinsèque**) due à une mauvaise réponse des tumeurs ou des micro-organismes vis-à-vis des médicaments ou une **résistance acquise** qui s'observe lorsque le micro-organisme ou la tumeur qui répondaient aux médicaments deviennent résistants à ce même traitement^{3, 4}.

Cette dernière concerne un large éventail de médicaments, de différentes structures et à mécanismes d'action variés.

La résistance multiple aux médicaments ou **Multi Drug Resistance (MDR)** est une forme de résistance acquise.

Les mécanismes induisant cette résistance sont loin d'être tous élucidés. En général, une altération du mécanisme de transport transmembranaire des cellules en est la cause habituellement observée. Cette altération peut, soit diminuer l'entrée des molécules de cytotoxiques dans la cellule, soit en augmenter l'efflux⁵. En ce qui concerne les cellules tumorales par exemple, les cellules ayant déclarées une MDR présentent une faible accumulation intracellulaire du médicament, souvent associée à une augmentation de l'efflux des agents anticancéreux, via un processus énergétique ATP-dépendant⁶.

D'autres mécanismes sont invoqués tels que :

- ⊗ Une perturbation dans l'expression des enzymes cibles ou une altération des cibles elles-mêmes⁷.
- ⊗ Une altération du mécanisme d'activation du médicament ou une dégradation de ce dernier⁸.
- ⊗ Une réparation accrue de l'ADN⁹.
- ⊗ Un problème au niveau de l'apoptose cellulaire^{10, 11}.

Certains de ces mécanismes peuvent coexister, rendant ainsi les traitements qui agissent sur une cible, inefficaces.

Il semblerait que ce phénomène de résistance mette en jeu une série de protéines de transport membranaire telles que : la glycoprotéine transmembranaire, **P-glycoprotéine** ou **Pg-170** ou **Pgp** ou **P-170** responsable de l'efflux des agents antitumoraux hors des cellules^{12 13 14}. D'autres protéines appartenant à la même famille, telles que : la **MRP1**¹⁵ : protéine responsable de la multi drogue résistance, la **LRP** (Lung Resistance Protein)¹⁶ : protéine responsable de la résistance du cancer du

poumon, la **BCRP** (Breast Cancer Resistance Protein)¹⁷ : protéine responsable de la résistance du cancer du sein, ont été identifiées et agissent de la même manière.

Les protéines ayant fait l'objet de nombreuses études et donc les mieux étudiées sont la **Pgp** et la **MRP1**. Elles appartiennent à la superfamille des protéines de transport membranaire énergie dépendant nécessitant l'hydrolyse de l'ATP, pour le passage de divers substrats à travers la membrane plasmique. Il s'agit de la superfamille des protéines **ABC** pour **ATP Binding Cassette**¹⁸.

Les Pgp sont codées par une famille de gènes présents chez de nombreux organismes¹⁹ :

Organismes	Gènes
La souris	mdr1, mdr2, mdr3
Le rat	mdr1, mdr2
Le hamster	pgp1, pgp2, pgp3
L'homme	MDR1, MDR2

Seul le gène **MDR1** est impliqué dans la **résistance**²⁰.

Il existe de nombreuses homologues entre l'homme et les autres animaux, notamment chez les insectes sans oublier les bactéries et les levures.

II. Structure des protéines de transport

II.1. La Pgp 170

L'étude de la structure de la Pgp par microscopie optique et électronique²¹ a montré qu'elle se présente sous forme d'un cylindre de 10 nm de diamètre avec une partie ancrée dans la bicouche lipidique et présentant deux sites de liaison à l'ATP. L'autre partie transmembranaire est constituée de deux motifs identiques et symétriques présentant six segments hydrophobes constitués de 610 acides aminés chacun et d'un domaine cytoplasmique contenant un site de fixation des nucléotides (SFN)²²²³. Ce dernier est formé par deux motifs WALKER A et B caractéristiques des transporteurs ABC.

Un large pore toroïdal central de 5 nm de diamètre environ, permettant le passage des substrats²¹ et entouré par un domaine hexagonal mal défini (MSD), a également été identifié. (**Figure 2**).

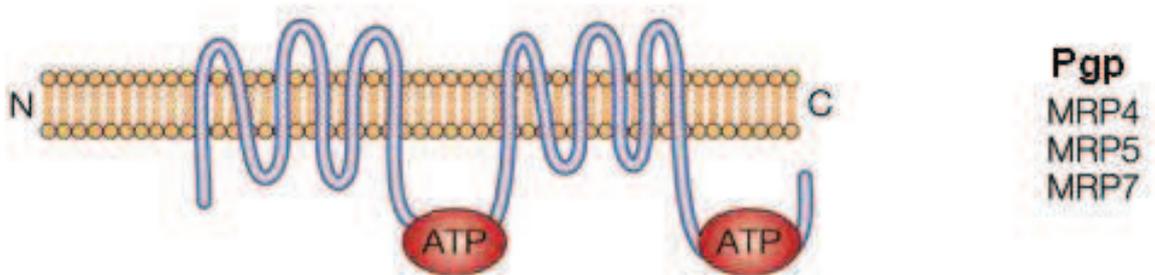


Figure 2 : Structure de la Pgp, MRP4, MRP5 et MRP7 ²⁴

Chez l'homme, la Pgp codée par le gène *mdr1* ou *ABCB1*, est un polypeptide de 1280 acides aminés^{7,25}.

La Pgp est une protéine N-glycosylée, dont le degré de glycosylation dépend des espèces chez qui elle est exprimée. Chez l'homme, il est le plus élevé et son poids moléculaire est de 170 KDa²⁶.

II.2. La MRP1 :

La protéine MRP ou MRP1 a un poids moléculaire de 191 KDa, codée par le gène *mrp*. Elle est constituée par 1531 acides aminés présentant un site de liaison N-glycosylé²⁷ et cinq domaines transmembranaires du côté N terminal. (Figure 3). En général la protéine est localisée au niveau du plasma des cellules résistantes. Ses substrats sont hydrophobes neutres ou anioniques.

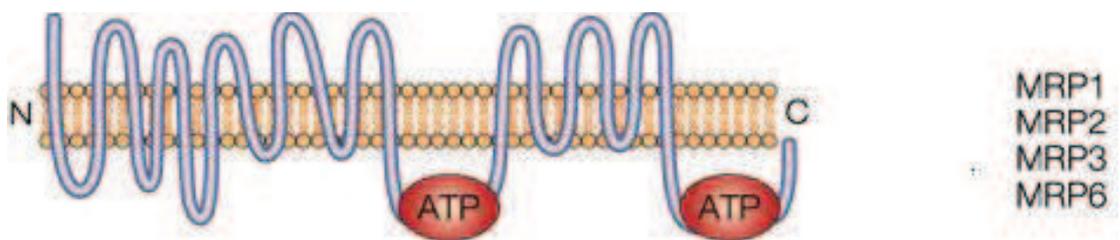


Figure 3: Structure des protéines MRP 1, 2, 3 et 6²⁶

Il existe d'autres protéines identiques chez les eucaryotes et chez l'homme. Elles sont classées en cinq types : MRP2, MRP3, MRP4, MRP5 et MRP6²⁸. Les protéines MRP7, MRP8 et MRP9 ont été identifiées mais non encore caractérisées^{29 30}. Elles peuvent induire, elles aussi, le phénomène de résistance aux médicaments.

III. Les substrats de la MDR

Se répartissant en deux groupes, ils ont la capacité de diffuser à travers la membrane lipidique. On distingue :

III.1. Les molécules soumises à la MDR ou substrats : Ce sont des molécules pour lesquelles les cellules exprimant la Pgp présentent une résistance croisée et dont l'accumulation intracellulaire est diminuée.

III.2. Les modulateurs ou chimiosensibilisateurs : appelés encore reversants. Ce sont des molécules capables de restaurer l'accumulation et la cytotoxicité d'un substrat donné. Ils peuvent être aussi substrats ou non, tout comme certains substrats peuvent se comporter comme des modulateurs par rapport à d'autres substrats. Parmi les chimiosensibilisateurs les plus étudiés, il y a **le Vérapamil** inhibiteur des canaux calciques, **la Trifluoropérazine** inhibiteur de la calmoduline ou encore **la Cyclosporine A**³¹ immunosuppresseur.

IV. Pgp et MRP 1 : Mécanismes d'action

La Pgp a des substrats très différents les uns des autres dont la plupart ont une forte hydrophobicité. Ils peuvent être amphiphiles avec une charge positive ou neutres³².

Des études ont montré que la liaison du substrat à la Pgp ne nécessite pas d'énergie contrairement à son transport³³. Ce sont deux phénomènes indépendants^{34 35}.

Parmi les hypothèses émises vis-à-vis du mécanisme d'action, la Pgp reconnaît uniquement un squelette chimique donné, ce qui expliquerait la variabilité de ses substrats, les groupements lipophiles greffés n'interviennent pas.

Une des hypothèses émise sur le mécanisme d'action de cette protéine est qu'elle fonctionnerait en tant que protéine de transport des médicaments (pompe à efflux). Elle interagirait avec différents substrats en utilisant l'ATP à cet effet. Elle se lierait aux substrats cationiques, impliquant un changement conformationnel de la protéine, permettant ainsi le positionnement du substrat au niveau du site de liaison.

Plusieurs mécanismes, basés sur cette hypothèse, sont proposés, parmi lesquels nous pouvons distinguer :

IV.1. Pgp : transporteur spécifique ATP-dépendant

La Pgp fonctionne comme une pompe à efflux (**Figure 4**). Pour permettre un efflux actif, elle utilise l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP³⁶. Cela induit des changements conformationnels du site de liaison de la protéine permettant ainsi un accès aux seules molécules ayant la bonne conformation et la bonne distribution électronique. Dans ce cas, la Pgp fonctionne comme un transporteur spécifique et régulier de substrat divers et variés.

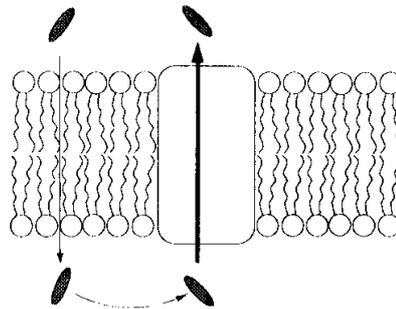


Figure 4 : Pompe « classique » : cycle d'absorption et d'excrétion d'un substrat

IV.2. Pgp : une pompe à efflux sélective ATP-dépendante :

Deux modèles ont été envisagés :

IV.2.1. Le modèle des pores aqueux : il implique la liaison du substrat au(x) site(s) actif(s) de la protéine à partir du cytoplasme, puis une translocation de ce substrat à travers la bicouche lipidique a lieu, suivie de sa libération dans la phase aqueuse en dehors de la membrane. Le site actif est réorienté pour une nouvelle liaison.

La Pgp fonctionnerait comme « un aspirateur hydrophobe » (hydrophobic vacuum cleaner) pour transporter les molécules hydrophobes de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. (**Figure 5**)³⁷

Les protéines MDR fonctionneraient peut-être comme des « flippases » (**Figure 6**)³⁸. Il s'agit d'une variante du modèle de « l'aspirateur hydrophobe ».

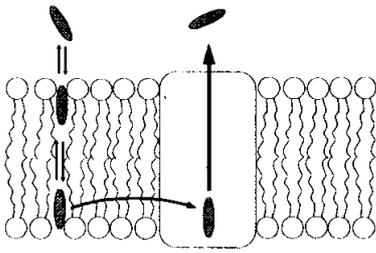


Figure 5 : Aspirateur hydrophobe³⁷

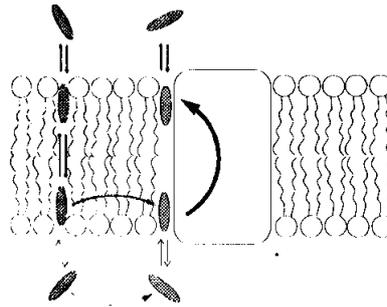


Figure 6 : Flippase³⁸

En 1997, Stein³⁹ propose une structure tertiaire de la Pgp. Cette dernière posséderait une cavité aqueuse dans laquelle les substrats seraient libérés suite à un changement conformationnel, avant de diffuser vers le milieu externe (**Figure 7**).

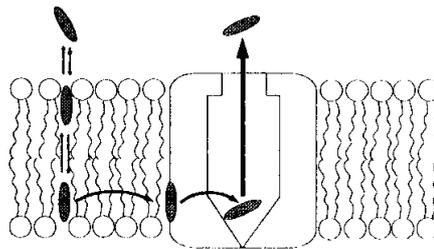


Figure 7 : Représentation du modèle de Stein

IV.2.2. Le modèle de la répartition altérée (« altered partitioning models ») : suppose que les protéines de la MDR ne transportant que les substances thérapeutiques, induisent une augmentation du pH intracellulaire et une diminution du potentiel membranaire^{40 41}, ce qui expliquerait que les composés hydrophobes tels que les anticancéreux cytostatiques ou les reversants de la résistance multidrogue (lipophiles, cationiques) sont retenus indifféremment par la Pgp.

IV.2.3. Autre hypothèse : un autre mécanisme suggère que la Pgp agit en tant que canal ATP ouvert sur l'extérieur, générant ainsi un gradient électrochimique qui provoquerait l'efflux des médicaments à travers la membrane plasmique vers l'extérieur^{42 43}.

IV.3. Sites actifs : Etant donné qu'une interaction directe entre molécules et protéines de transport ne semble pas nécessaire dans les modèles décrits, ces derniers peuvent expliquer la capacité des Pgp à

interagir avec un grand nombre de substrats variables, possédant au moins deux caractéristiques communes : un haut degré d'hydrophobicité et la présence d'une charge positive à pH neutre.

Toutefois, les données expérimentales montrent une implication directe de la Pgp et de ses analogues dans les interactions et le transport de nombreuses substances.

Il semblerait qu'il existe au moins deux sites actifs de liaison non compétitifs au niveau de la Pgp, ce qui expliquerait le large éventail de substrats^{44 45}. La photo-affinité d'analogues de substrats de la Pgp a été utilisée pour caractériser ces sites actifs. Le premier se situe du côté amino-terminal intracellulaire et le second du côté carboxy-terminal intracellulaire⁴⁶.

Pour qu'il y ait interaction, il semblerait que la présence de deux ou trois groupements donneurs d'électrons avec une conformation spatiale toujours identique soient nécessaires. Ces groupements forment les éléments de reconnaissance. Ils ont été mis en évidence au niveau des séquences transmembranaires N et C terminales de la protéine. La force de liaison augmente en fonction de leur nombre et de leur force en tant que donneurs d'électrons ou d'accepteur de liaisons hydrogènes^{47 48}.

Le transport des substances hydrophobes contre le gradient de concentration se fait grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Le mécanisme couplant cette hydrolyse à l'efflux des différents substrats reste inconnu^{24 49}.

Au final, la Pgp est phosphorylée par une protéine kinase C (PKC), c'est l'étape d'activation du mécanisme de transport de la protéine. Les inhibiteurs de cette PKC induisent une réduction du degré de phosphorylation de la Pgp, augmentant ainsi la concentration intracellulaire des médicaments. Ces derniers interagissent donc directement avec le mécanisme de transport^{50 51}.

V. Pgp et MRP 1 : leurs fonctions physiologiques

La Pgp et la MRP1 ont été mises en évidence au niveau des cellules saines et elles joueraient donc un rôle physiologique au niveau de l'organisme.

Chez l'homme, la Pgp se situerait au niveau des cellules épithéliales de l'intestin grêle et du gros intestin, ainsi que la membrane du canal biliaire, les cellules épithéliales du pancréas, les cellules endothéliales des capillaires sanguins du cerveau, et dans de nombreux autres tissus⁵². Cette distribution suggère un rôle dans la détoxification cellulaire des toxines ingérées avec les aliments en activant leur élimination par le foie, l'intestin et les reins. Leur présence au niveau de la muqueuse

épithéliale intestinale contribue à l'élimination des composés transportés directement dans la lumière intestinale.

La Pgp est également impliquée dans le transport de neurotransmetteurs tels que les β -endorphines, le glutamate, directement du cerveau vers le sang, ce qui impliquerait une fonction dans la régulation du système nerveux périphérique^{53 54}. Elle est également exprimée au niveau du placenta et serait responsable du transfert des substances de la mère vers le fœtus et protégerait le fœtus des toxines⁵⁵.

Ces propriétés d'extrusion de la Pgp pourraient avoir des conséquences sur l'absorption, la distribution, la clairance et tous autres paramètres pharmacocinétiques des molécules utilisées dans les traitements chimiothérapeutiques.

L'absence de certains de ces substrats peut être à l'origine de maladies telles que : l'altération du transport intracellulaire des stéroïdes entre autre.

Les localisations de la Pgp et ses analogues sont présentés dans le **tableau 1** :

Tableau 1 : localisation tissulaire des protéines de transport

Nom commun	Localisation tissulaire	Substrats naturels	Substrats chimiothérapeutiques
Pgp / MDR1	Intestin, foie, reins, placenta, la barrière hématoencéphalique	Neutres, Cationiques Composés organiques et les médicaments	Doxorubicine, daunorubicine, vincristine, vinblastine, actinomycine-D, paclitaxel, docetaxel, etoposide, teniposide, bisantrene, homoharringtonine (STI-571)
MDR2	Foie	Phosphatidylcholine, quelques médicaments hydrophobes	Paclitaxel, vinblastine
MRP1	Tous les tissus	Gluthation et autres, organiques anions, leukotriène C4	Doxorubicine, etoposide, vincristine, méthotrexate, epirubicine
MRP2 cMOAT	Intestin, foie, reins	Identiques à MRP1, les sels anioniques organiques non biliaires	Doxorubicine, etoposide, vincristine, méthotrexate, cisplatine, teniposide
MRP3	Intestin, foie, reins, pancréas, glandes surrénales		
MRP4	Prostate, testicules, ovaires, Intestin, pancrès, poumons		
MRP5	La plupart des tissus		
MRP6	Foie, reins		
MXR BCRP ABC-P	Placenta, intestin, foie, seins		
BSEP SPGP	Foie		
ABCA2	Cerveau		

VI. MDR et le cancer

Le mot «cancer» vient du grec «**karkinos**» qui signifie «crabe» ou «pince» et d'où dérive le nom de «carcinome». Hippocrate (460-377 av. J.-C.), qui donna son nom à la maladie, l'explique par un déséquilibre entre les quatre substances de l'organisme : la lymphe (ou phlegme), le sang, la bile jaune produite par le foie et la bile noire, supposée être produite par la rate.

Aucun progrès réel ne fut constaté entre l'antiquité et la fin du XIX^{ème} siècle à partir duquel de nombreuses découvertes se succédèrent et permirent de rapides avancées.

La découverte des rayons X (**Wilhelm Conrad Roentgen 1895**) et du radium (**Pierre et Marie Curie 1898**) permirent la mise en place d'un des procédés utilisés jusqu'à nos jours pour combattre le cancer : la radiothérapie, en plus de la chimiothérapie et de la chirurgie.

La résistance aux traitements anticancéreux dépend de nombreux facteurs tels que :

- ⊗ La sensibilité individuelle du patient aux cytostatiques,
- ⊗ L'existence d'une résistance intrinsèque de la cellule tumorale due à une altération génétique, cas des cancers métastasés résistants d'origine.
- ⊗ La diminution de la libération des médicaments au niveau de la tumeur,

Mais la raison majeure reste :

- ⊗ L'expression de la protéine de transport énergie dépendant, **la Pgp 170**, laquelle détecte et rejette les cytostatiques en dehors de la cellule, d'où augmentation de l'efflux via un mécanisme ATP dépendant. Cette corrélation a été cliniquement démontrée^{36 56}.

Le mécanisme de détoxification cellulaire impliquant les cytochromes P450 et l'insensibilité aux médicaments induisant l'apoptose cellulaire joueraient également un rôle dans ce mécanisme de résistance aux anticancéreux, sans oublier les mécanismes de réparation de l'ADN qui pourraient également y être impliqués^{57 58}.

Les médicaments concernés par la résistance induite par une diminution de la concentration intracellulaire des cytostatiques du à l'augmentation de l'efflux, comprennent :

- ⊗ **Les vinca alkaloides** : vinblastine et vincristine
- ⊗ **Les anthracyclines** : doxorubicine et daunorubicine
- ⊗ **Les inhibiteurs de la transcription de l'ARN** : actinomycine D
- ⊗ **Les agents stabilisateurs des microtubules** : paclitaxel (taxol®)

Ceux concernés par la résistance induite par une faible accumulation des cytostatiques sans augmentation de l'efflux sont :

✎ **Les antifolates** : méthotrexate,

✎ **Les analogues des nucléotides** : 5-fluorouracil, le 8-azaguanine et cisplatine.

L'implication de la Pgp dans l'apparition de cette résistance repose sur plusieurs données observées telles que :

✎ L'expression du gène *mdr1* dans les lignées résistantes est proportionnelle au degré de résistance; elle est souvent associée, chez l'homme, à l'échec des traitements de certains cancers^{59 60}.

✎ La transfection de cellules sensibles par le gène *mdr1* confère le phénotype de multirésistance avec expression de la Pgp⁵.

VII. Réversion de la MDR

Un modulateur doit être un mauvais substrat, dénué de toute activité pharmacologique et ayant une faible toxicité.

Il existe plusieurs niveaux desquels les modulateurs peuvent intervenir :

VII.1. Contrôle pharmacologique des protéines de transport

Des stratégies biochimiques, pharmacologiques et cliniques ont été mises au point pour essayer de contrer ce problème. Il existe des protocoles alternatifs de chimiothérapies à hautes doses, l'utilisation d'une combinaison de plusieurs agents ou la recherche d'analogues des agents anticancéreux non soumis à la résistance. Mais, on peut aussi envisager l'inhibition de la Pgp et / ou la restauration de l'accumulation de l'anticancéreux par sa vectorisation via des liposomes ou des nanoparticules, par l'immunothérapies (ou thérapie anti-sens), ou encore par chimiosensibilisateurs (utilisation de modulateurs).

VII.1.1. Chimiothérapie à hautes doses :

Elle consiste en l'utilisation de grandes concentrations de drogues cytotoxiques pour surmonter les effets de l'extrusion cellulaire. Le problème évident est celui des effets secondaires dus à ces fortes doses.

VII.1.2. Utilisation d'anticancéreux non-substrats de la Pgp

Une autre approche consiste en l'utilisation de médicaments qui ne sont pas de bons substrats de la Pgp ou de la MRP1. Il existe des molécules qui ne sont pas transportées par ces protéines comme les

cyclophosphamides et les cis platinoïdes. Des résultats intéressants ont également été obtenus avec les anthracyclines⁶¹. Ainsi l'utilisation d'un analogue peptidique de la doxorubicine, à titre d'exemple, permet d'éliminer le problème de l'extrusion⁶².

VII.1.3. Blocage de l'efflux

Un moyen pour résoudre le problème de la MDR est de bloquer l'efflux des cytotoxiques par l'inhibition des fonctions des transporteurs.^{63 64}

Comme la Pgp possède plusieurs substrats, essentiellement hydrophobes, il a été assez facile de découvrir des inhibiteurs potentiels³¹. Nous nous intéresserons qu'à ceux à partir desquelles de nouvelles molécules, ayant un pouvoir reversant la MDR, ont pu être obtenues. Elles peuvent être classées selon deux catégories : la première et la seconde génération de réversants. Toutes ces molécules ont été obtenues après diverses manipulations.

On distingue :

☞ **Les chimiosensibilisateurs de 1^{ère} génération** : sont les composés ayant subi des essais cliniques. A titre d'exemple nous citerons (**tableaux 2 à 4**) :

a) Les inhibiteurs calciques dont vérapamil premier composé réversant proposé par Tsuruo^{63 65}

b) Les immunosuppresseurs dont la cyclosporine A⁶⁶

c) la quinine et ses analogues

d) Les inhibiteurs de la calmoduline⁶⁷

e) Les anthracyclines non cytotoxiques et analogues des vinca-alcaloïdes⁶⁸

f) Les stéroïdes et analogues hormonaux⁶⁹

g) les taxanes, telle que la taxinine A⁷⁰, produites par un arbre japonais le *Taxus cuspidata*, ont mis en évidence une augmentation de l'accumulation intracellulaire de la vincristine dans les cellules tumorales présentant un phénomène de MDR.

☞ **Les chimiosensibilisateurs de seconde génération** : sont des composés obtenus par synthèse organique à partir des réversants de première génération. Citons à titre d'exemple LY335979⁷¹ dérivé de la quinine et GF120918⁷² dérivé de l'acridine (**tableau 3**).

Toutes ces molécules sont lipophiles, amphiphiles et hétérocycliques^{73 74 75 76}. Elles sont respectivement représentées dans les **tableaux 2 et 3**.

Ces inhibiteurs de la MDR possèdent des activités propres. Leur utilisation en tant que réversants laissait espérer une administration moins massive des médicaments induisant ainsi une diminution de

la cytotoxicité, mais certains ont provoqué une augmentation de la létalité, soulevant des questions sur le mécanisme d'action et les protéines entrant en jeu dans le métabolisme des médicaments.

Quelques exemples de réversants de la MDR, classés par familles thérapeutiques, sont donnés dans le **tableau 4** :

Tableau 2 : Agents réversants de première génération

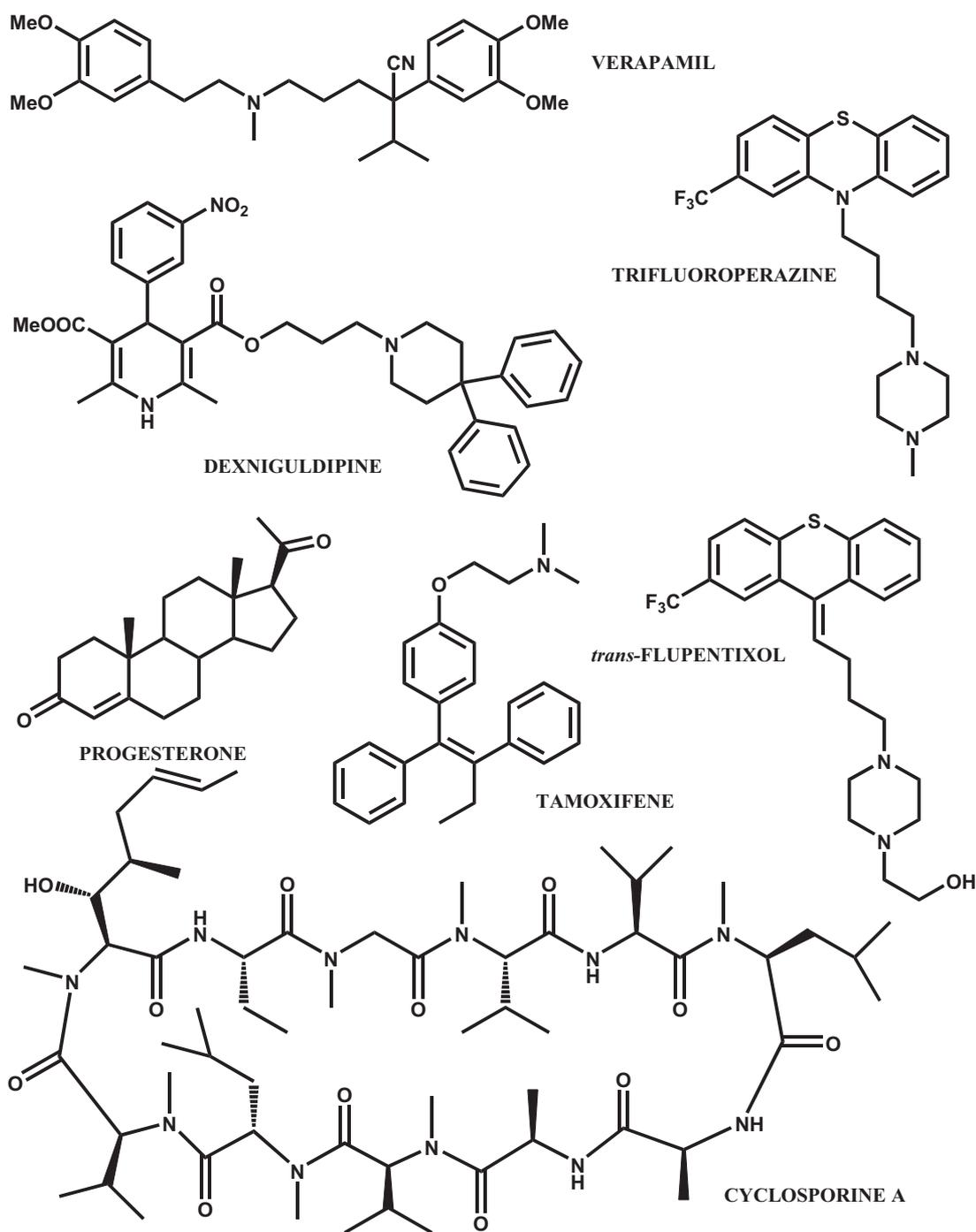


Tableau 3 : Agents réversants de deuxième génération

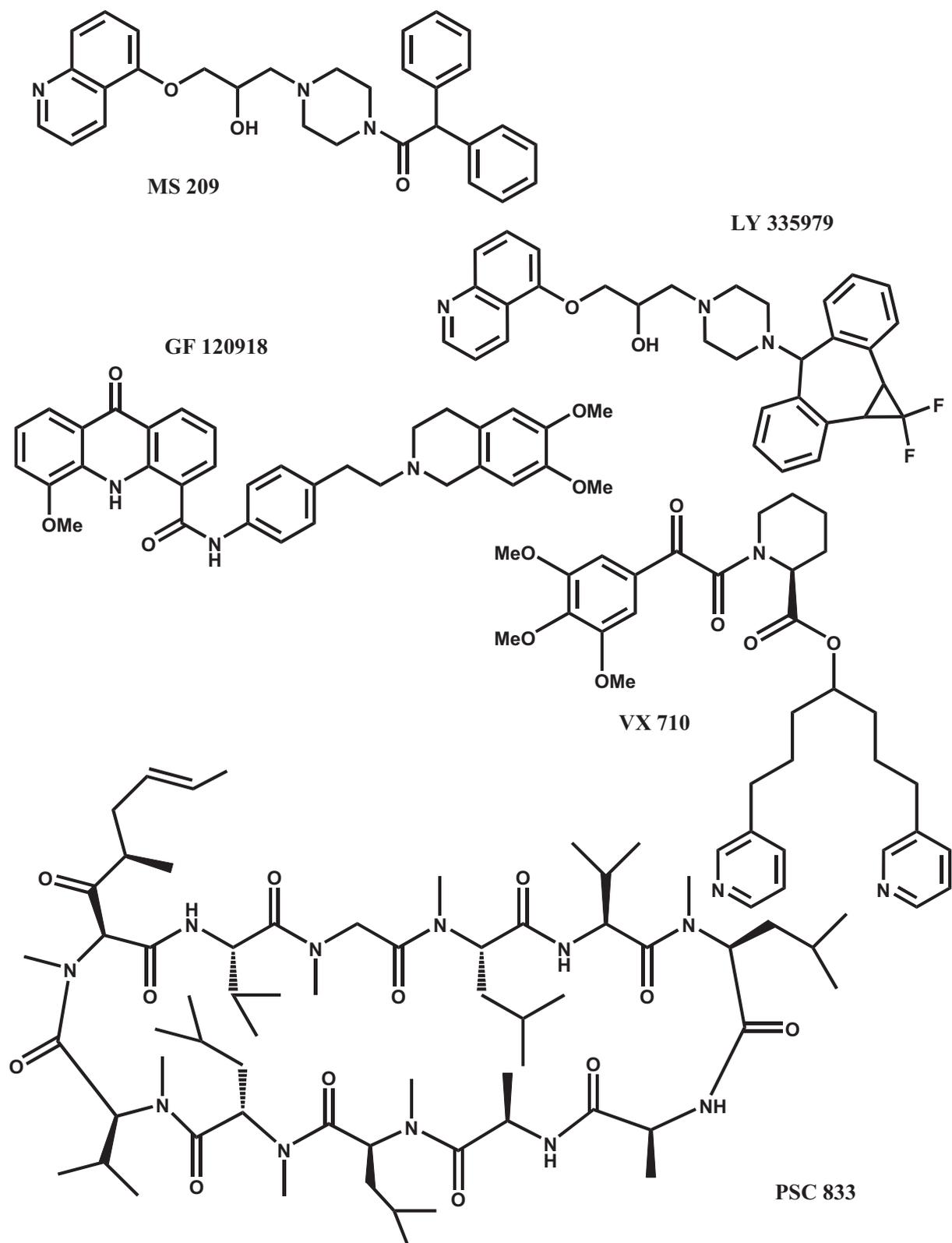


Tableau 4 : réversants de la résistance selon leur classe thérapeutique

composés	Classe thérapeutique	Protéine cible
tétracycline	antibiotique	Pgp
rifampicine	antibiotique	MRP
érythromycine	antibiotique	Pgp
astemizole	antihistaminique	Pgp
benzoperimidine	anticancéreux	Pgp, MRP
colchicine	alcaloïde	Pgp
quinine	alcaloïde	Pgp, MRP
bepiridile	anticalcique	Pgp
flunarazine	anticalcique	Pgp
méfloquine	antimalarique	Pgp
primaquine	antimalarique	Pgp, MRP
trazodone	antidépresseur	Pgp
progestérone	Stéroïde	Pgp
Acétate de megestrole	stéroïde	Pgp
halopéridole	antipsychotique	Pgp
réserpine	antihypertenseur	Pgp

Ce phénomène de résistance fortement étudié dans les maladies cancéreuses, concerne également les maladies parasitaires, et celle plus particulièrement répandue et mortelle : **le paludisme**, et également les maladies infectieuses résistantes aux antibiotiques, qui peuvent aller du cas le plus bénin au plus compliqué.

VIII. MDR et paludisme

VIII.1. Introduction

Le paludisme est une affection due à la présence dans le sang d'un parasite unicellulaire, un protozoaire, du genre *Plasmodium*.

La chloroquine est le médicament de référence. Son action s'exerce sur trois niveaux :

- Par son interaction avec l'ADN,
- Par l'inhibition de la dégradation de l'hémoglobine^{77 78 79 80}
- Par son action sur le pH de la vacuole digestive du *Plasmodium*^{81 82}.

La chloroquine va s'accumuler à l'intérieur de la vacuole de *Plasmodium*, provoquant ainsi une interaction avec la cible et donc sa destruction.

Si l'activité de la chloroquine a été attribuée à son accumulation sélective dans les hématies parasitées par rapport aux non parasitées, la chloroquinorésistance a été étroitement liée à une forte diminution de cette accumulation chez les souches résistantes^{83 84}

L'apparition de ce phénomène peut être expliquer par :

- ☞ Une augmentation de l'expression de la cible,
- ☞ Une augmentation du catabolisme du médicament,
- ☞ Une altération de l'affinité de la chloroquine pour sa cible, pouvant être du à une altération du transport cellulaire de la chloroquine. Cette altération induit une réduction de la liaison de la chloroquine à l'hème ainsi qu'une diminution de son accumulation.

Après une étude sur la cinétique de passage de la chloroquine radiomarquée chez *Plasmodium falciparum* tant sensible que résistant, une sortie rapide de la chloroquine chez la souche résistante, contre une lente chez la souche sensible, a été mise en évidence^{85 86}.

VIII.2. Chloroquinorésistance et protéines de transport

Par analogie avec la résistance des cellules cancéreuses, plusieurs hypothèses ont suggéré que l'efflux de la chloroquine était assuré par un ou plusieurs transporteurs. Il semblerait que des protéines analogues aux protéines ABC soient exprimées chez *P falciparum*.

La chloroquino-résistance chez *P. falciparum* étant diminuée par le vérapamil⁸⁷, cela a permis la localisation d'une protéine, **Pgh-1 (la P-glycoprotéine homologue-1)**, au niveau de la membrane de la vacuole digestive du parasite. Cette protéine est analogue à la Pgp surexprimée chez les cellules cancéreuses⁸⁸. La Pgh1 est codée par le gène *pfmdr1*, homologue du gène *mdr1* humain.

Cependant la chloroquino-résistance ne résulte pas uniquement du fait de la surexpression ou de la mutation du gène *pfmdr1*, mais d'autres événements génétiques entrent en jeu.^{89 90} des mutations du **gène *Pfpg2*** codant pour une protéine transmembranaire de 330 kDa, membre de la famille des transporteurs ABC, localisée dans la membrane de la vacuole digestive⁹¹. (*P. falciparum* et *P. chabaudi*) seraient associées à la chloroquino-résistance⁹².

Des travaux plus récents ont mis en évidence le rôle d'une autre protéine la **PFCRT (*Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter)** dans la chloroquinorésistance. Elle est située aussi au niveau de la membrane de la vacuole digestive du parasite, codée par le gène *Pfcr1*^{93 94 95}.

Ainsi les mutations des gènes codant pour les protéines de transport analogues à la Pgp et les modifications du gradient de pH jouent un rôle important dans l'accumulation et la concentration de la chloroquine au niveau de la vacuole digestive parasitaire, et seraient impliqués dans le mécanisme de la chloroquinorésistance.

VIII.3. Réversion de la chloroquino-résistance.

Parce que le premier mécanisme mis en évidence pour expliquer la résistance à la chloroquine est son efflux actif vers le milieu extracellulaire, et par analogie à la résistance aux anticancéreux, la restauration de la sensibilité des plasmodies résistants à la chloroquine par des réversants de la MDR des cellules cancéreuses a été testée.

Ainsi, Martin et collaborateurs ont démontré, *in vitro*, que la chloroquino-résistance était réversible si on associait le vérapamil (1µM) au traitement par la chloroquine⁹³. Ceci a été confirmée par d'autres études^{96 97 98}.

D'autres produits, appartenant à des familles chimiquement et thérapeutiquement très différentes, ont été testés par la suite et ont montré leur pouvoir de réversion en augmentant l'accumulation de la chloroquine chez des souches de *Plasmodium* résistantes. Citons à titre d'exemples l'utilisation d'antidépresseurs tricycliques^{99 100}, d'antipsychotiques¹⁰¹, d'antihistaminiques^{102 103 104} et d'anticancéreux¹⁰⁵.

En général ces substances sont :

- ☞ Des molécules hétérocycliques portant au moins un azote protonable,
- ☞ Hydrophobes, amphipathiques, légèrement basiques et donc lysosomotropes,
- ☞ Polycycliques avec au moins un noyau aromatique¹⁰⁵.

IX. MDR et bactéries

IX.1. Introduction

Le phénomène de résistance multiple aux médicaments s'étend également au monde des micro-organismes. En effet certaines maladies dues à des bactéries, après avoir été éradiquées, sont réapparues dans les pays développés. Citons à titre d'exemple la tuberculose.

Si au tout début, seule la molécule de pénicilline était à disposition, la variabilité inter espèce, mais surtout la réplication du monde bactérien, nous a obligé à synthétiser diverses molécules de différentes familles d'antibiotiques.

En 1950, seulement cinq molécules d'antibiotiques sont commercialisées, en 1970, nous disposons du double et en 2002 plus de 150 molécules sont disponibles dans le commerce.

Les premières manifestations de la résistance sont apparues dès les années 60, depuis ce phénomène s'est étendu à de nombreuses maladies et la commercialisation de nouveaux antibiotiques plus puissants n'y a rien changé. Cette ampleur est due à¹⁰⁶ :

- ☞ L'augmentation du nombre d'espèces résistantes,
- ☞ Les mécanismes de résistance nombreux et variés.

IX.2. Notions sur les bactéries

Les bactéries sont classées en deux catégories : les Gram positifs et les Gram négatifs. Elles sont différenciées grâce à la coloration de leur paroi bactérienne. Cette dernière recouvre la membrane cytoplasmique et constitue l'enveloppe externe de la cellule. Elle a pour rôle de protéger la bactérie contre les agents externes, en plus de maintenir la pression osmotique intracellulaire élevée de l'ordre de 10 à 20 atmosphères grâce à une substance présente au niveau de la paroi bactérienne qui lui confère sa rigidité et sa résistance physique : **le peptidoglycane**¹⁰⁷.

Les antibiotiques vont agir à différents niveaux de la biosynthèse du peptidoglycane, soit en inhibant l'une des étapes clés de sa synthèse, soit en inhibant la biosynthèse elle-même, en agissant au niveau membranaire¹⁰⁸.

IX.3. Notion sur les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict du terme, sont des agents antibactériens naturels, d'origine biologique élaborés par des champignons et/ou diverses bactéries. Cependant, quelques uns sont produits par synthèse, et beaucoup sont des dérivés hémi-synthétiques préparés par modifications chimiques de produits naturels. Certains peuvent agir sur la majorité des espèces pathogènes à Gram positif et à Gram négatif, ils sont dits « **à large spectre** », d'autres ont une action plus limitée (antibiotiques des bactéries à Gram positif ou des bactéries à Gram négatif), voire un **spectre très étroit** (antistaphylococciques, antituberculeux).

Les antibiotiques ont l'avantage, en atteignant leur cible, de détruire une structure qui est spécifiquement bactérienne en agissant à différents niveaux de cette structure.

Les antibiotiques ayant une structure chimique de base identique qui leur confère un même mécanisme d'action antibactérienne, se classent dans une même famille, mais ils peuvent se différencier par leur spectre d'activité.

⊗ Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane, exemples :les différentes sous-classes des β -lactamines,

⊗ Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires tels que les gramicidines,

⊗ Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques : comme la rifamycines et les quinolones,

⊗ Antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques : comme les tétracyclines,

⊗ Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates : exemples des sulfamidés et des 2-4-diaminopyrimidines.

Les antibiotiques n'ont pas de ce fait d'impact sur les cellules eucaryotes telles que les cellules hôtes. L'effet peut être simplement **bactériostatique** (ralentissement ou arrêt de la croissance bactérienne) ou **bactéricide** (mort bactérienne).

IX.4. Antibiotiques et résistance

On distingue deux types de résistance, la première est une **résistance naturelle** due à un gène présent à l'état naturel chez l'espèce, qu'il soit sauvage ou muté. Cette résistance est stable et est transmise à la descendance de la cellule bactérienne (**transmission verticale**), mais par contre, peu ou pas transférable d'une bactérie à une autre (**transmission horizontale**).

Les mécanismes impliqués dans cette forme de résistance, sont le plus souvent un défaut de pénétration intrabactérienne.

La seconde est une **résistance acquise** ayant comme support génétique un élément mobile, acquis, transmissible à la descendance de la cellule bactérienne, mais a tendance à être instable en absence du facteur de sélection représenté par le ou les antibiotiques concernés. Ce type de résistance est transférable d'une bactérie à une autre, parfois appartenant à des espèces différentes (**transmission horizontale**), ce qui explique leur propagation parfois impressionnante dans le monde bactérien (épidémie de plasmides ou de transposons).

Les mécanismes impliqués dans la résistance acquise sont mieux connus que ceux impliqués dans la résistance naturelle. Le plus souvent, il s'agit de mutations affectant des gènes naturellement présents sur la bactérie. Le mécanisme le plus souvent rencontré est une modification de la cible de l'antibiotique dont l'affinité est alors diminuée, ou plus rarement, une diminution de la pénétration intrabactérienne ou l'inactivation de l'antibiotique.

IX.4.1. Mécanismes de résistance :

Bien que plusieurs mécanismes soient souvent impliqués simultanément dans la résistance aux antibiotiques, il est très commode de les classer en trois catégories :

1. Défaut de pénétration de l'antibiotique dans la bactérie : qui peut être dû à :

- ✘ Soit à un phénomène d'imperméabilité observé chez les bactéries gram négatif¹⁰⁹.
- ✘ Soit par une augmentation de l'efflux, observée par exemple vis-à-vis des cyclines¹¹⁰.
- ✘ Soit à la perte d'une ou plusieurs porines (résistance acquise) entraînant ce phénomène^{111 112}.

2. Inactivation ou excrétion de l'antibiotique par des systèmes enzymatiques bactériens, par des protéines qui induisent une résistance naturelle vis-à-vis des antibiotiques¹¹³. Dans le cas de la résistance acquise, l'inactivation enzymatique est le mécanisme le plus fréquent¹¹⁴,

3. défaut d'affinité entre la cible bactérienne et l'antibiotique¹¹⁵ : résultant d'une modification de la cible. Le site d'action de l'antibiotique est alors modifié et de ce fait son l'affinité pour la cible aussi^{116 117}. Les mutations dans les gènes codant pour la cible de l'antibiotique, jouent un rôle essentiel dans la résistance acquise aux antibiotiques chez les mycobactéries¹¹⁸.

IX.4.2. Accumulation de mécanismes acquis de résistance : la multi-résistance

En dehors des mécanismes de multi-résistance par efflux, la multi-résistance aux antibiotiques résulte en général de l'accumulation de différents mécanismes de résistance indépendants. Il en résulte

une résistance de la bactérie vis-à-vis d'antibiotiques de différentes familles (au moins deux) auxquelles la bactérie sauvage est sensible.

Deux niveau de contrôle sont alors exercés, le premier se situe au niveau de la paroi bactérienne qui devient imperméable et le second au niveau du système d'efflux qui est activé afin d'expulser le médicaments à l'extérieur de la cellule.

Cette tendance à l'accumulation de mécanismes acquis de résistance indépendants, est probablement le résultat des pressions de sélection successivement exercées par les antibiotiques sur les flores bactériennes au fur et à mesure de leur introduction dans les hôpitaux.

IX.5. Protéines de transport et bactéries

Comme chez l'Homme, chez les microorganismes, les protéines de transport entrent en jeu et contribuent à l'installation du phénomène de résistance et notamment celui de multi-résistance. Ces protéines possèdent des substrats très différents les uns des autres et activent le système d'efflux des médicaments. Elles peuvent être divisées en deux catégories :

IX .5.1. Les transporteurs secondaires qui impliquent un échange d'ions pour le transport des médicaments en dehors de la cellule¹¹⁹. Présents aussi bien chez les eucaryotes que les procaryotes, leur nombre est élevé. Cette classe de transporteurs se divise en trois catégories :

1. Les Majors Facilitator Superfamily (**MFS**)¹²⁰.
2. Les Resistance-Nodulation-Cell Division (**RND**)¹²¹.
3. Les Small Multidrug Resistance (**SMR**)¹²².

Quelques exemples de protéines sont résumés dans le **tableau 5** ci-dessous

Tableau 5 : familles des transporteurs secondaires chez les eucaryotes et procaryotes.

Famille de transporteurs	Protéines associées	Localisation
MFS	OCT1	Cellules rénales du rat ¹²³
	VMAT1	Vésicules synaptiques et présynaptiques, chez l'homme ¹²⁴
	LmrP	<i>Lactococcus lactis</i>
RND	AcrB	<i>Echerichia coli</i>
	MexB, MexD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	MtrD	<i>Neisseria goorrhoeae</i>
SMR	QacC	<i>Staphylococcus aureus</i> ^{125 126}
	QacE	<i>Klebsiella aerogenes</i>
	EmrE	<i>Echerichia coli</i> ^{127 128}

Ces transporteurs secondaires sont localisés dans la membrane cytoplasmique où la concentration en protons est plus élevée à l'extérieur qu'à l'intérieur de la membrane. Ainsi l'énergie générée par ce gradient de proton (force proton motrice membranaire), peut être utilisée pour le transport des molécules. L'extrusion de la molécule en dehors de la cellule est couplée à un échange d'ions (**figure 8**)¹²⁷.

Ce type de transport a été mis en évidence chez les bactéries gram négatif telle que *E. coli* pour le transport des tétracyclines par les protéines TetA (B) (MFS), ainsi que pour *L lactis*.

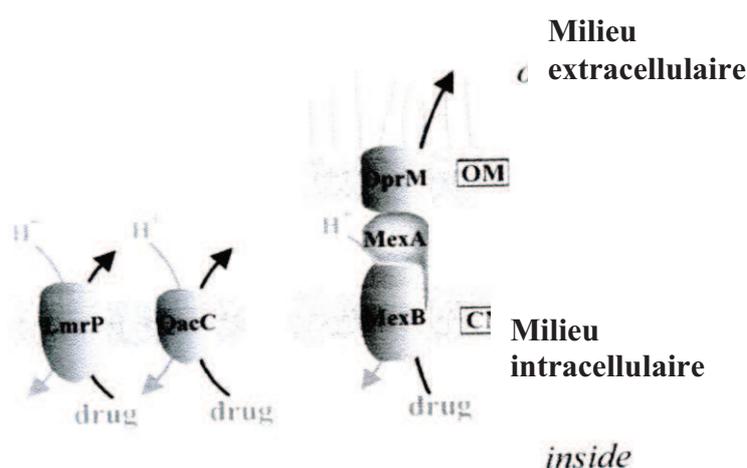


Figure 8 : représentation schématique des transporteurs secondaires chez les procaryotes¹²⁹

XI.5.2. Les transporteurs ABC impliquant l'hydrolyse de l'ATP pour le transport des médicaments en dehors de la cellule. Les transporteurs appartenant à la super famille ABC sont présents aussi bien chez les procaryotes que les eucaryotes, et concernent une grande diversité d'agents cytotoxiques. Chez l'homme, les plus connues des ces protéines sont la MDR1 et la Pgp (**voir chapitre I, section MDR et cancer**). Nous pouvons ainsi parler de deux groupes : le groupe des Pgp et le groupe des MDR.

I.5.2.1. Le groupe des Pgp :

Les protéines appartenant à ce groupe jouent un rôle important dans la résistance microbienne vis-à-vis des composés amphiphiles, neutres ou cationiques. A titre d'exemple, chez les individus immunodéficiences, le germe *Candida albicans* exprimant la protéine Cdr1P confère le phénotype résistant vis-à-vis des antifongiques¹³⁰. Ces protéines sont exprimées aussi bien chez les germes pathogènes que les non pathogènes tel que *Saccharomyces cerevisiae* qui exprime les protéines de transport Pdr5P¹³¹ et Snq2P¹³².

Une séquence spécifique à la Pgp a été mise en évidence chez *Lactococcus lactis* exprimant la protéine LmrA. Elle est impliquée dans la reconnaissance et la liaison du médicament à la protéine¹³³. Comme la Pgp, ces protéines sont sous forme d'un polypeptide présentant deux motifs symétriques, l'un ayant un ou des domaines ABC et l'autre présentant des domaines membranaires ayant en général six segments transmembranaires en α hélice.

XI.5.2.2. le groupe des MRP

Ces protéines présentent un coté N-terminal avec cinq segments transmembranaires en α hélice suivi de deux motifs identiques ayant chacun six segments transmembranaires en α hélice et un domaine ABC¹³⁴. Comme la MRP, ses homologues chez les microorganismes favorisent l'extrusion d'une large variété de composés organiques, anioniques. A titre d'exemple citons la protéine Yor1 chez *Saccharomyces cerevisiae*¹³⁵, et la 2',7'-bis(2-carboxyéthyl)-5(et 6)-carboxyfluoresceine (BCECF) chez *Lactococcus lactis*¹³⁶

IX.6. Mécanismes d'action

Différentes hypothèses ont été émises concernant les mécanismes d'action de ses protéines, telles que **l'hypothèse de la flippase** qui transporte le médicament de l'intérieur vers l'extérieur du feuillet de la bicouche de phospholipides, celle de **l'un aspirateur hydrophobe (hydrophobic vacuum cleaner)** qui transporte médicament de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane, ou encore celle **du**

pore aqueux qui implique une expulsion du médicament dans la phase aqueuse, du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire (**figure 9**). Ces différentes hypothèses ont été décrites dans **le chapitre I, section Cancer et MDR**.

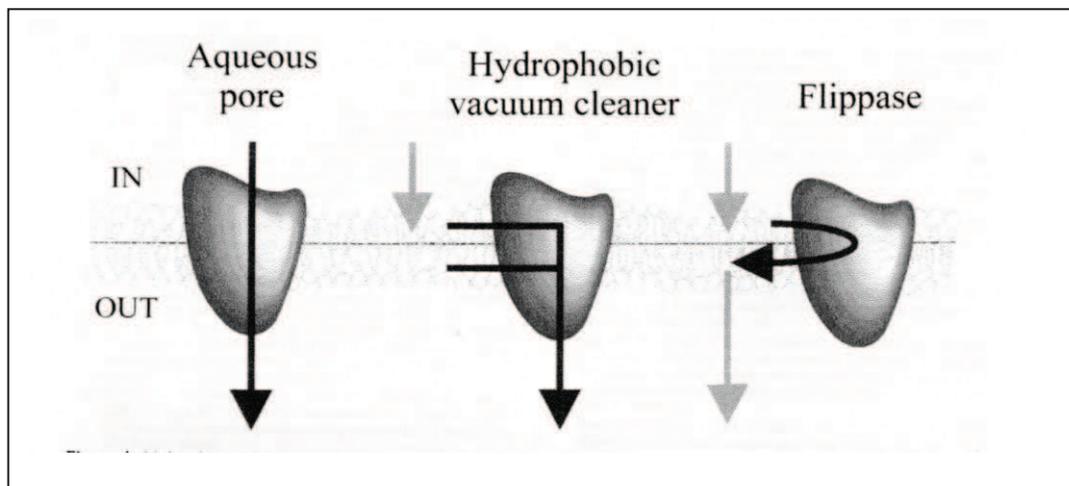


Figure 9 : mécanismes de transport des protéines (van veen)¹²⁹

Selon des études menées sur les protéines, l'hypothèse de l'aspirateur hydrophobe semble la plus probable^{137 138}.

X. CONCLUSION

La résistance multiple aux médicaments est un phénomène majeur responsable de nombreux échecs thérapeutiques et dont les mécanismes d'action divers et variés sont loin d'être tous élucidés.

D'après des études menées, il en résulte des similitudes entre le processus de résistance chez les parasites, les cellules cancéreuses et chez certaines bactéries, à savoir :

- ⊗ Une altération des échanges d'ions,
- ⊗ Une réduction des interactions intracellulaires entre les médicaments et leurs cibles potentielles.

Si l'on rajoute une modification des protéines de transport aux deux composantes citées plus haut, nous obtenons de manière générale les principales causes d'apparition de la résistance.

Les protéines de transport sont présentes au niveau tous les êtres vivants. La compréhension de leurs mécanismes d'action est cruciale pour la mise au point de nouvelles molécules biologiquement actives, capables de restaurer la sensibilité aux médicaments.

Chapitre II
Synthèse chimique du BG637

Choix du composé à étudier

Depuis plusieurs années le GERCTOP (Groupe d'Enseignements et de Recherche en Chimie Thérapeutique, Organique et Physique) concentre ses efforts sur la recherche de molécules à pouvoir réversant la résistance multiple aux médicaments.

Ces études ont concerné différentes familles de molécules à savoir les naphthyridines¹³⁹, les quinoléines, les acridines^{140 141} et les pyridoquinoléines¹⁴². Ces molécules présentent les mêmes propriétés que les agents réversant la MDR, ce qui a motivé notre choix.

L'étude *in vitro* de l'activité thérapeutique des pyridoquinoléines a montré un pouvoir réversant cette résistance, notamment sur des cellules cancéreuses et sur le paludisme. Certains de ces composés présentent une activité à des concentrations moins élevées que le produit de référence.

Nous nous sommes intéressés pour notre part à un dérivé de la famille des pyridoquinoléines triméthylées portant une chaîne latérale de type alkoxy. Ce produit est appelé BG 637². Sa cytotoxicité supérieure à celle du produit de référence le Nifurtimox, et sa capacité à inverser l'effet MDR sont meilleures que celles du vérapamil, qui rappelons le, a été le premier produit connu pour l'effet inhibant la MDR.

Il nous a semblé intéressant de procéder à l'étude de ce produit du point de vue physico-chimique et de démontrer la démarche à suivre par les scientifiques lors de la découverte d'un nouveau produit potentiellement actif.

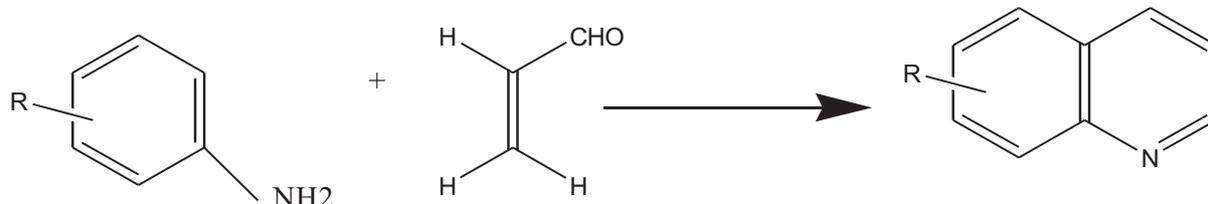
Cependant nous ne disposons pas de certaines données indispensables telles que la dose thérapeutique, c'est pourquoi notre étude reste dans le domaine de la démonstration, à savoir suivre le cheminement d'un produit biologique de sa conception jusqu'à sa formulation pour devenir un médicament vendu en officine.

Chimie

I. Historique des pyridoquinoléines

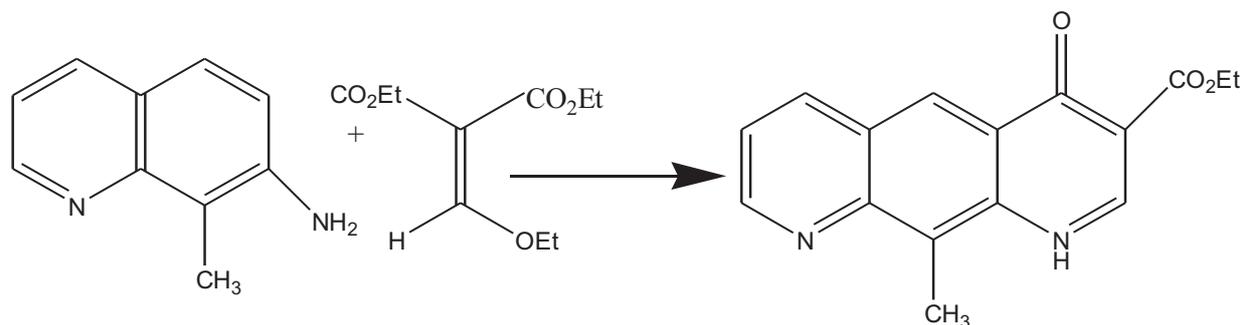
La synthèse des pyridoquinoléines a fait l'objet de nombreux travaux^{143 144 145 146}.

Elle est généralement réalisée par une double réaction de Skraup¹⁴⁷, Mlochowicz¹⁴⁸, qui est une addition 1,4 de l'aniline sur l'acroléine pour former la quinoléine.

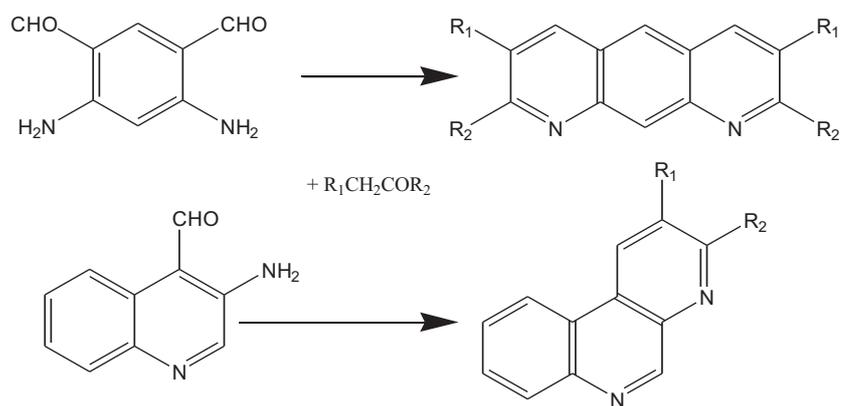


D'autres méthodes qui dérivent de celle de Skraup ont également été souvent utilisées.

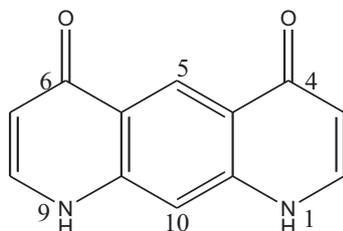
Ainsi, Jordis a préparé des pyrido[3,2-g]quinoléines par la méthode de Gould-Jacob qui est une réaction entre les amines aromatiques et l'éthoxyméthylènemalonate d'éthyle.



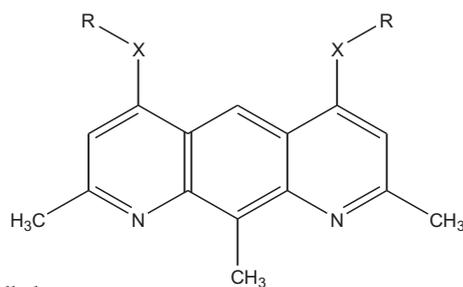
Godard¹⁴⁹ et Quast¹⁵⁰ ont synthétisé des pyridoquinoléines par une autre variante de la réaction de Skraup qui met en jeu une réaction entre des o-aminoformylaldehydes et des cétones ou des aldéhydes.



Pour notre part, nous nous sommes particulièrement intéressé à la préparation de la pyrido[3,2-g]quinoléine-4,6-dione.



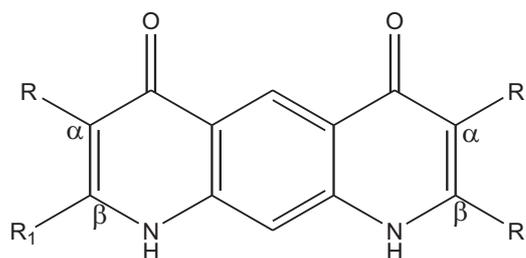
Cette molécule est le principal intermédiaire dans notre synthèse des dérivés de la 2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinoléine.



R = Alkylaminoalkyle
X = O, S, NH

Une synthèse de la pyrido[3,2-g]quinoléine-4,6-dione, en quatre étapes, a été décrite par Snyder (1946)¹⁵¹, puis plus tard par Molock (1983)¹⁵² ainsi que par Croisy-Delecy¹⁵³ et Antenello¹⁵⁴ (1977, 1983), à partir de la phénylènediamine et de l'éthoxyméthylènemalonate et par Hall et coll.¹⁵⁵ à partir de la m-phénylènediamine et d'un diester acétylénique.

Toutes ces méthodes ont l'inconvénient d'aboutir à des molécules substituées par des fonctions esters en α ou en β des fonctions cétones.



ou



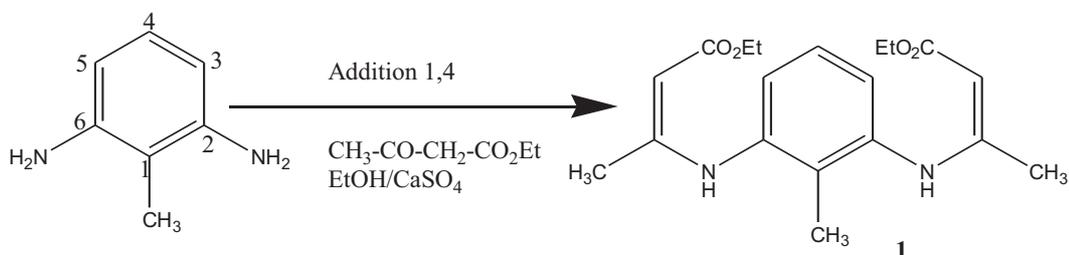
Elles nécessitent alors, en fin de réaction une saponification ou une hydrolyse suivie d'une décarboxylation à température élevée pour l'obtention du système pyrido[3,2-g]quinoléine-4,6-dione. Pour l'élaboration des pyrido[3,2-g]quinoléine-4,6-diones, nous avons simplifié les méthodes évoquées précédemment en supprimant l'hydrolyse et la décarboxylation et avons ainsi préparé ces composés en deux étapes : condensation et cyclisation thermique.

II. Synthèse des pyridoquinoléines

II.1. La première étape : condensation

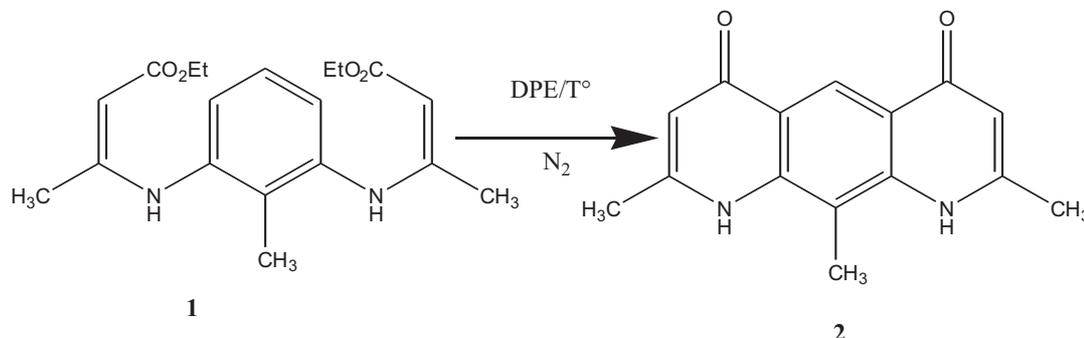
C'est une double addition nucléophile 1,4 appelée addition de Mickael.

Le 2,6-bis(carboéthoxyméthylvinyl)toluène (**1**) est obtenu par une double condensation dans l'éthanol absolu du 2,6-diaminotoluène avec l'acétoacétate d'éthyle. Cette réaction s'effectue en présence de sulfate de calcium (CaSO_4), agent déshydratant afin d'éliminer les molécules d'eau formées lors de l'attaque nucléophile des amines sur les carbonyles de l'acétoacétate d'éthyle.



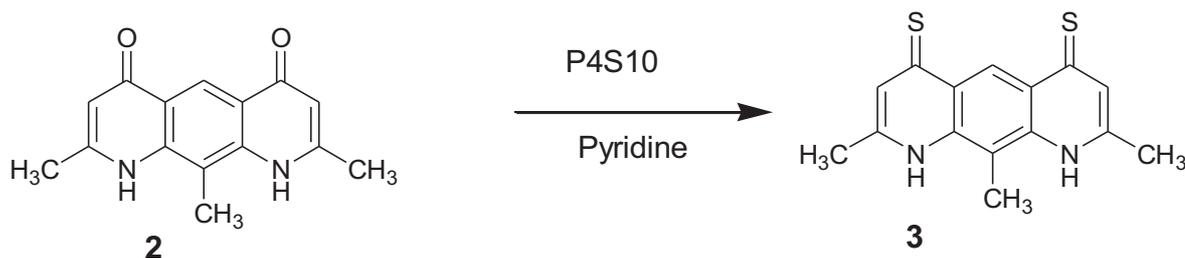
II.2. La deuxième étape : cyclisation

Il s'agit d'une cyclisation thermique du composé **1** effectuée sous courant d'azote dans un solvant à haut point d'ébullition: le diphenyléther (DPE). Nous obtenons ainsi la dione correspondante : le 2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinoléine-4,6-dione **2**.



II.3. Préparation des pyrido[3,2-g]quinoléine-4,6-dithiones **3** :

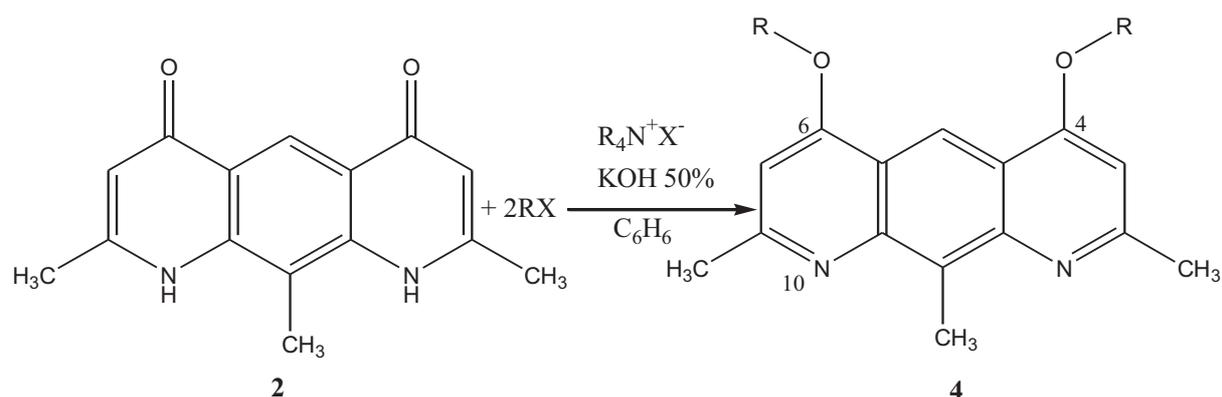
La thiation de la pyridoquinoléine **2** a été effectuée par action du décaulfure de tétraphosphore (P_4S_{10}) dans de la pyridine anhydre pour l'obtention de la pyrido[3,2-g]quinoléine-4,6-dithione **3**¹⁵⁶



II.4. Préparation d'éthers de la 2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinoline-4,6-dione (**4a** et **4b**):

L'alkylation de la dione **2** par catalyse par transfert de phase, en présence d'un agent dispersant: le bromure de tétrabutylammonium (TBAB), un léger excès d'agent alkylant (RX)^{157 158}, avec une solution d'hydroxyde de potassium à 50% comme base (phase aqueuse), et du toluène comme solvant organique Nous permet d'obtenir le 4,6-Bis[2'-(diméthylamino)éthoxy]-2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinoléine (**4a**) et le 4,6-Bis[2'-(diéthylamino)éthoxy]-2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinoline (**4b**).

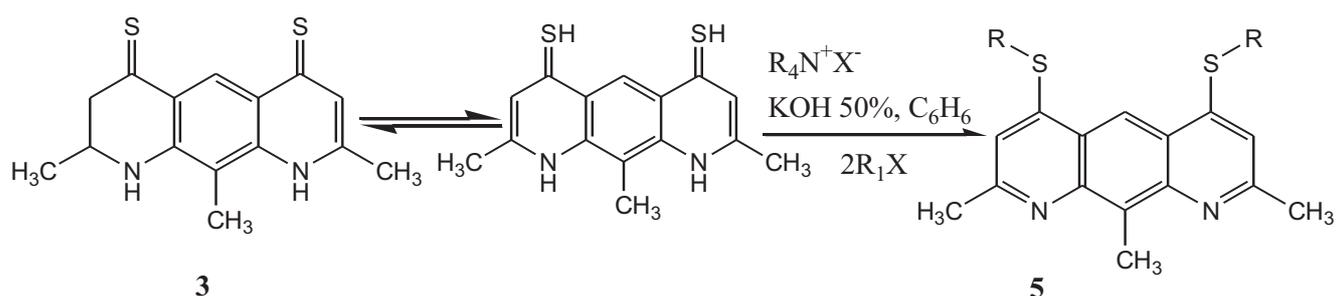
R pouvant être un méthyle (CH_3) ou un éthyle (C_2H_5)



II.5. Préparation des 4,6-Bis[2'-(diméthylamino)éthylthio]-2,8,10-triméthylpyrido

[3,2-g]quinoléine 5 :

Comme pour les dérivés alkoxy 4, nous avons pu obtenir la 4,6-Bis[2'-(diméthylamino)éthylthio] 2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinoléine 5 par catalyse par transfert de phase du composé 3 en présence d'un agent alkylant (RX), ou R est un méthyle (CH₃).

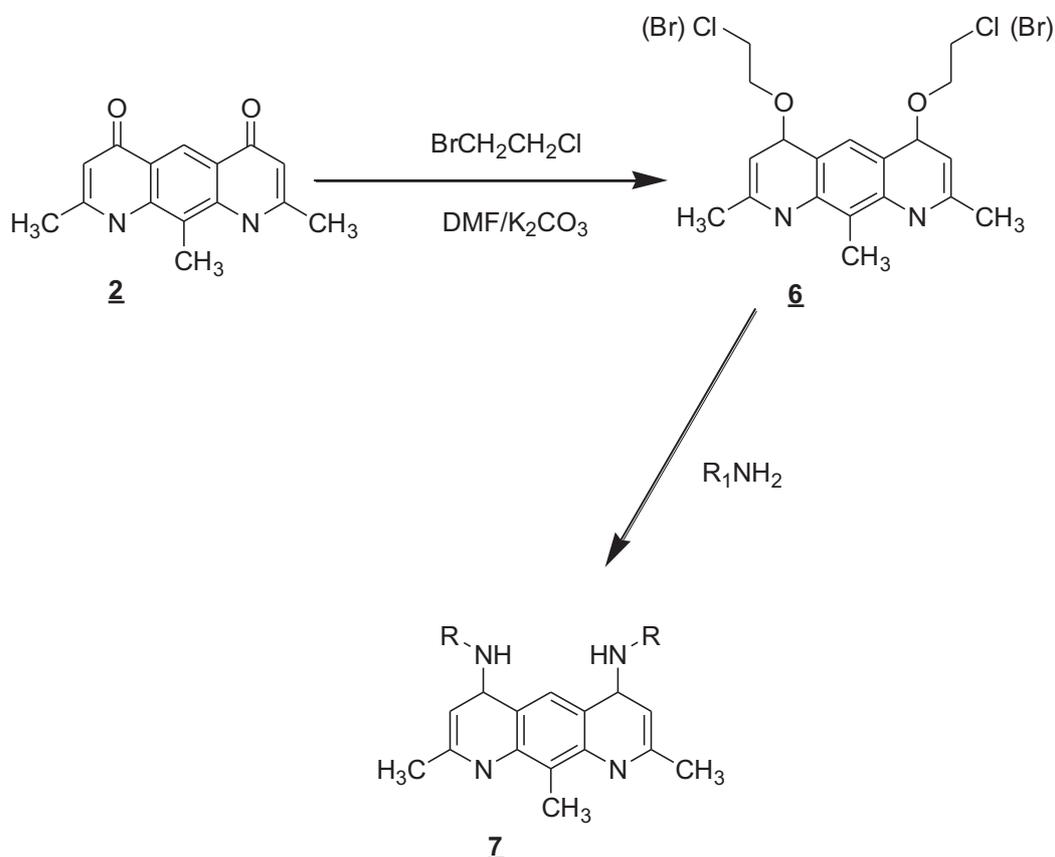


II.6. Préparation des 4,6-dialkyaminoalkylamino- 2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinoléines 7:

Nous avons synthétisé ces produits 7 à partir de dérivés intermédiaires 6 substitués par deux groupements 2'-halogéno-éthoxy. Ces produits sont obtenus par l'action du 1-bromo-2-chloro-éthane sur la dione 2 dans le diméthylformamide (DMF) en présence de carbonate de potassium (K₂CO₃)¹⁵⁹,

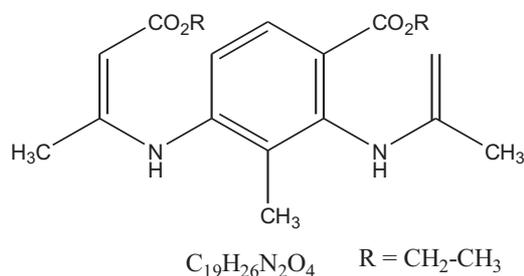
Pour les dérivés **6**, les spectres RMN du ^1H et du ^{13}C montrent la présence de deux signaux bien distincts pour les méthylènes O-CH_2 d'une part et $\text{CH}_2\text{-Cl}$ d'autre part. Ceci n'exclut pas, si l'on considère que le brome et le chlore sont des groupements libérables, la présence d'un mélange des composés 4,6-dibromoéthoxy, le 4,6-dichloroéthoxy et 4-chloroéthoxy-6-bromoéthoxypyrido[3,2-g]quinoléine.

Ces composés sont utilisés tels quel pour l'étape suivante. En effet, par action d'une amine secondaire, la diéthylaminoéthylméthylamine, sur ces composés, une substitution nucléophile du chlore (ou du brome) conduit aux dérivés **7** voulus. La structure a été confirmée par RMN.



PARTIE EXPERIMENTALE: LES MODES OPERATOIRES

I. Préparation du 2,6-Bis(carboéthoxyméthylvinyl)toluène (1)



Dans un ballon de 250 ml équipé d'un réfrigérant, sont introduits 6,1 g (50 mmol) de 2,6-diaminotoluène, 14,8 g (108 mmol) d'acétylacétate d'éthyle, 20 g (116 mmol) de sulfate de calcium ($CaSO_4$), 60 ml d'éthanol absolu et 8 gouttes d'acide acétique.

Le mélange réactionnel est porté à 80°C pendant 5 heures sous agitation magnétique. Le milieu réactionnel est filtré afin d'éliminer le sulfate de calcium, lavé à l'éther. Le filtrat est récupéré, filtré de nouveau puis concentré par évaporation. Nous laissons reposer entre 0°C-4°C pendant 24 heures, des cristaux se forment et sont récupérés et lavés à l'éthanol absolu froid.

Nous obtenons une poudre blanche, cristalline dont les caractéristiques sont :

Rendement : 84%

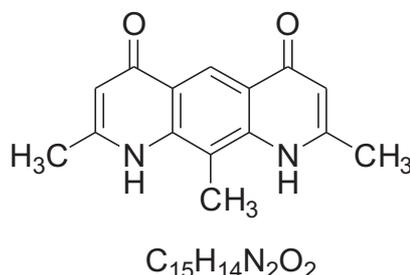
Point de fusion : 110°C-112°C

MM : 346

RMN 1H ($CDCl_3$): 1,25(t, 6H, $J = 7,1Hz$, CH_3); 1,85(s, 6H, CH_3); 2,20(s, 3H, CH_3); 4,15(q, 4H, $J = 7,1Hz$, CH_2); 4,70(s, 2H, CH_2); 6,95(d, 2H, $J = 7,8Hz$, H Ar); 7,10(t, 1H, $J = 7,8Hz$, H Ar); 10,10(s, 2H, NH).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): 13,00(10- CH_3); 14,50(CH_3); 20,0(2,8- CH_3); 58,80(O- CH_2); 87,30(CH); 124,70(C-3, C-5); 125,95(C-1); 127,80(C-4); 139,00(C-2, C-6); 159,65(NH-CH); 170,65(C=O).

II. Préparation du 2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinoléine-4,6-dione (2)



Dans un tricol de 250 ml équipé d'un réfrigérant, d'un thermomètre et d'une entrée d'azote, nous portons entre 100°C-120°C, 125 ml de diphenyléther (DPE) puis nous introduisons 5,19 g (16 mmol) du produit **1** et quelques grains de pierre ponce. Ce mélange est porté à 240°-250°C pendant une heure. Nous laissons le mélange se refroidir à 80°-70°C, puis il est additionné de 300 ml d'éther de pétrole sous agitation. Le précipité jaune obtenu est filtré, lavé à l'éther de pétrole et au méthanol puis séché.

Nous obtenons une poudre jaune dont les caractéristiques sont :

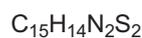
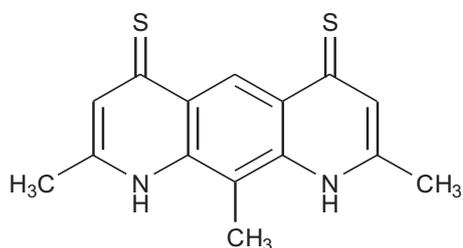
Rendement : 95%

Point de fusion : 454°C (déterminé par DSC)

MM : 254

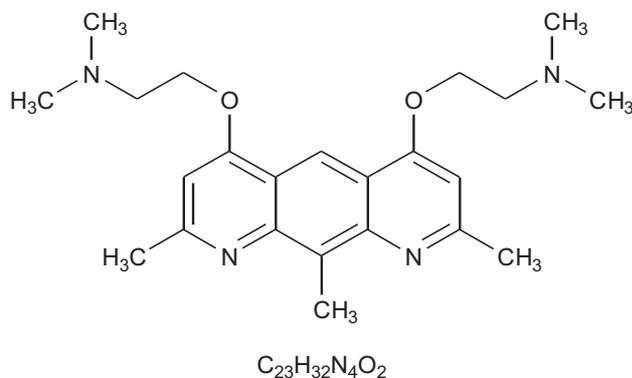
RMN ¹H (CDCl₃): 3,10(s, 6H, CH₃); 3,20(s, 3H, CH₃); 7,35(s, 2H, H Ar); 9,80(s, 1H, H Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃): 11,85(10- CH₃); 22,85(2,8-CH₃); 108,10(C-3-C-7); 119,35(C-5); 120,25(C-5a, C-5b); 124,75(C-10); 140,50(C-10a, C-10b); 167,55(C-2, C-8); 173.60(C-4, C-6).

2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinoléine-4-6-dithione (3)

Dans un ballon de 100 ml équipé d'un réfrigérant, d'un thermomètre, nous introduisons 1,27 g (5 mmol) du produit **2** et 2,22 g (5 mmol) de décassulfure de tétraphosphore (P_4S_{10}) dans 30 ml de pyridine. Ce mélange est porté à 60°-70°C pendant 4 heures sous agitation magnétique. Une fois revenu à température ambiante, le mélange est versé dans 300 ml d'eau et agité jusqu'à l'apparition d'un précipité. Ce dernier est filtré puis lavé abondamment à l'eau, puis séché. Nous obtenons une poudre rouge.

Le rendement, le point de fusion et les spectres RMN de ce composé n'ont pas été déterminé car le produit n'a pas été purifié en raison de sa solubilité extrêmement faible dans tous les solvants usuels à savoir : chloroforme, acétone, éthanol, méthanol...

4,6-Bis[2'-(diméthylamino)éthoxy]-2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinoléine (4a)

Dans un ballon de 250 ml équipé d'un réfrigérant, sont introduits 1,27 g (5 mmol) du composé **2**, 2,6 g (15 mmol) de 1-chloro-2-diméthylamino-éthane, 3 g (1 mmol) de bromure de tétrabutylammonium (TBAB), 70 ml de toluène, 30 ml de KOH à 50%. Le mélange réactionnel est porté à 110°C pendant 24 heures sous agitation magnétique.

Le mélange est filtré dans une ampoule à décanter. La phase aqueuse est extraite avec trois fois 10 ml de toluène. Les phases organiques sont réunies et lavées deux fois avec 10 ml d'eau. La phase organique est séchée sur de sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée à sec.

Nous obtenons une poudre jaune qui est lavée avec très peu d'éther et dont les caractéristiques sont :

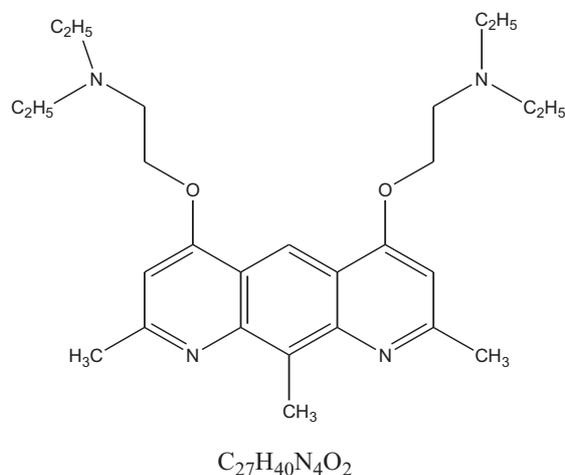
Rendement : 37%

Point de fusion = 156-158°C

MM : 396

RMN ¹H (CDCl₃): 2,44 (s, 12H, CH₃); 2,74(s, 6H, 2,8-CH₃); 2,94(t, 4H, J= 5,5Hz, CH₂-N); 3,28(s, 3H, 10-CH₃); 4,31(t, 4H, J= 5,5Hz, O-CH₂); 6,53(s, 2H, H Ar); 8,88(s, 1H, H Ar).

**Préparation de 4,6-Bis[2'-(diéthylamino)éthoxy]-2,8,10-triméthylpyrido-
[3,2-g]quinoline (4b)**



Dans un ballon de 250 ml équipé d'un réfrigérant, sont introduits 1,27 g (5 mmol) du composé **2**, 2,6 g (15 mmol) de 1-chloro-2-diéthylamino-éthane, 0,6 g (18 mmol) de TBAB, 70 ml de toluène, 30 ml de KOH à 50%. Le mélange réactionnel est porté à 100°C pendant 24 heures sous agitation magnétique.

Le mélange est filtré dans une ampoule à décanter. La phase aqueuse est extraite avec trois fois 10 ml de toluène. Les phases organiques sont réunies et lavées deux fois avec 10 ml d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée à sec.

Nous obtenons une poudre jaune laquelle est lavée avec très peu d'éther et dont les caractéristiques sont :

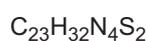
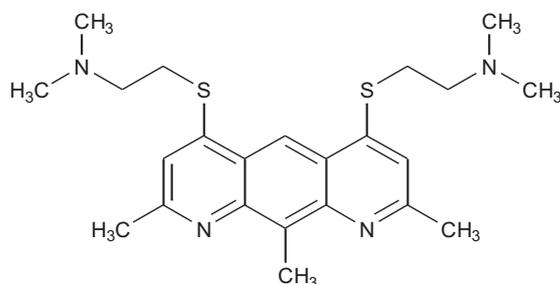
Rendement : 50%

Point de fusion = 144-146°C

MM : 452

RMN ¹H (CDCl₃): 1,10(t, 12H, J= 7,1Hz, CH₃); 2,70(m, 8H, CH, 6H, CH₃); 3,10(t, 4H, J= 6,1Hz, CH₂-N); 3,30(s, 3H, CH₃); 4,25(t, 4H, J= 6,1Hz, O-CH₂); 6,55(s, 2H, H Ar); 8,85(s, 1H, H Ar).

**4,6-Bis[2'-(diméthylamino)éthylthio]-2,8,10-triméthylpyrido
[3,2-g]quinoléine (5)**



Dans un ballon de 250 ml équipé d'un réfrigérant, sont introduits 1,43 g (5 mmol) du produit **3**, 2,16 g (15 mmol) de 1-chloro-2-diméthylamino-éthane, 3 g (1 mmol) de TBAB, 70 ml de toluène, 30 ml de KOH à 50%. Le mélange réactionnel est porté à 110°C pendant 24 heures sous agitation magnétique.

Le mélange est filtré dans une ampoule à décanter. La phase aqueuse est extraite avec trois fois 10 ml de toluène. Les phases organiques sont réunies et lavées deux fois avec 10 ml d'eau. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée à sec.

Nous obtenons une poudre jaune qui est lavée avec très peu d'éther et dont les caractéristiques :

Rendement : 30%

Point de fusion : 182°-184°C

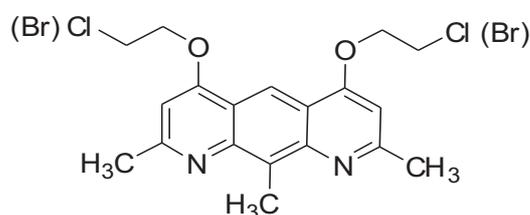
MM : 428

RMN ¹H (CDCl₃): 2,35(s, 12H, N-CH₃); 2,75(t, 4H, J= 6,8Hz, CH₂-N); 2,75(s, 6H, CH₃); 3,20(t, 4H, J= 6,3Hz, S-CH₂); 3,30(s, 3H, CH₃); 7,05(s, 2H, H Ar); 8,75(s, 1H, H Ar).

**4,6-Bis[2'-(bromo)éthoxy]-2,8,10-triméthylpyrido
[3,2-g]quinoléine(6a) ;**

**4,6-Bis[2'-(chloro)éthoxy]-2,8,10-triméthylpyrido
[3,2-g]quinoléine(6b) ;**

**4-[2'-(bromo)éthoxy]-6-[2'-(chloro)éthoxy]-2,8,10-triméthylpyrido
[3,2-g]quinoléine(6c) ;**



Dans un ballon de 100 ml équipé d'un réfrigérant, sont introduits 1,27 g (5 mmol) de TMPQ, 2,86 g (20 mmol) de 1-bromo-2-chloro-éthane, 1,38 g (10 mmol) de carbonate de potassium et 20 ml de diméthylformamide (DMF). Le mélange réactionnel est porté à 100°C pendant 4 heures sous agitation magnétique. Après refroidissement du mélange, 300 ml d'eau sont ajoutés.

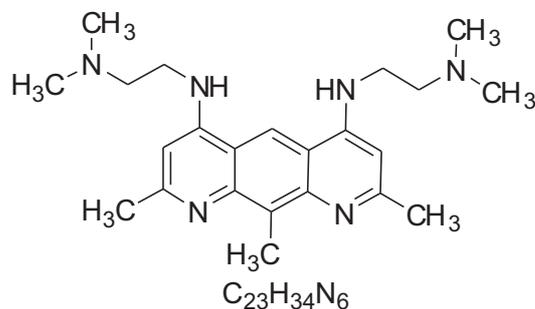
Le précipité obtenu est filtré puis lavée abondamment à l'eau.

Nous obtenons une poudre blanche qui est un mélange des trois composés 4a, 4b et 4c.

RMN ¹H (CDCl₃): 2,75 (s, 12H, 2,8-CH₃); 3,30(s, 6H, 10-CH₃); 3,85(t, 4H, J= 6,3Hz, CH₂); 4,00(t, 4H, J = 6,0Hz, CH₂); 4,50(t, 4H, J = 6,0Hz, CH₂); 4,55(t, 4H, J= 6,38Hz, CH₂); 6,55(s, 4H, CH Ar); 8,90(s, 2H, CH Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 13,00(10-CH₃) ; 27,30(2,8-CH₃); 28,75(CH₂-Br); 41,75(CH₂-Cl); 68,10(O-CH₂); 68,35(O-CH₂); 99,85(C-3, C-7), 113,15(C-5); 118,25(C-5a, C-5b); 130,15(C-10); 146,85(C-10a, C-10b); 160,70(C-2, C-8); 161,45(C-4, C-6).

**4,6-Bis[2'-(diméthylamino)éthylamino]-2,8,10-triméthylpyrido
[3,2-g]quinoléine (7)**



Dans un ballon de 100 ml équipé d'un réfrigérant, sont introduits 0,22 g (5 mmol) du composé **6** et 1,5 ml de 1-amino-2-diméthylamino-éthane. Le mélange réactionnel est porté à 90°C pendant 1h 40 sous agitation magnétique.

Le mélange devient brun et visqueux. 40 ml d'une solution de KOH à 10% sont rajoutés au mélange réactionnel sous agitation et l'on obtient un précipité beige. Celui-ci est filtré puis recristallisé dans de l'éthanol.

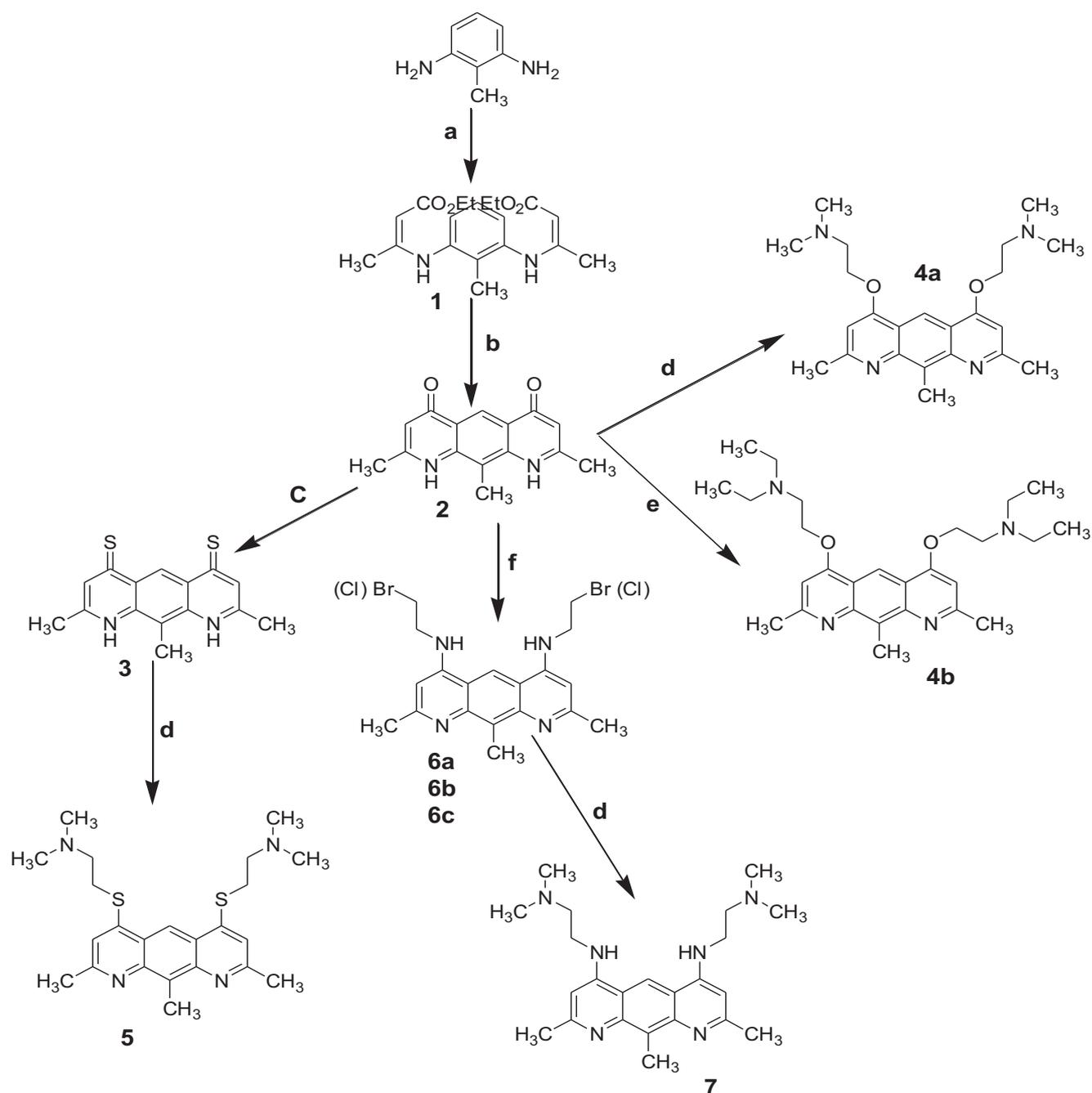
Nous obtenons une poudre beige dont les caractéristiques sont les suivantes :

Rendement : 80%

Point de fusion = 228-230°C

MM : 394

RMN ¹H (CDCl₃): 2,25(s, 12H, CH₃); 2,60(m, 4H, CH₂-N); 2,65(s, 6H, CH₃); 3,25(m, 4H, NH-CH₂); 3,30(s, 3H, CH₃); 6,15(t, 2H, J = 4,2, NH); 6,20(s, 2H, H Ar); 8,75(s, 1H, H Ar).



a : acétoacétate d'éthyle / éthanol absolu / CaSO₄

f : 1-bromo-2-chloro-éthane / carbonate de

b : diphenyléther / N₂

potassium / DMF

c : P₄S₁₀ / pyridine

d : 1-chloro-2-diméthylamino-éthane / toluène / TBAB / KOH 50% / CTP

e : 1-chloro-2-diéthylamino-éthane / toluène / TBAB / KOH 50% / CTP

Figure 10: Schéma général des synthèses

III. CONCLUSION

Après synthèse, obtention et vérification par RMN de l'identité et de la pureté des composés obtenus, ces derniers vont servir de support pour la réalisation de différentes études. Pour des raisons quantitatives, chaque famille a été destinée à une étude précise.

Ainsi la famille pyridoquinoléines triméthylées substituée par le groupement diméthylaminométhane a servi de support à des études pré-cliniques. Il s'agit des composés **4a**, **5**, **7**. L'étude a porté sur les propriétés cytostatiques de ces composés et notamment leur effet inhibiteur de la prolifération des cellules cancéreuses en particulier les lignées étudiées, à savoir : CHO-K1 et A-Mel-3.

Il s'agissait de pouvoir détecter ces trois composés dans le milieu cellulaire de manière précise. La méthode d'investigation utilisée lors de cette étude est la spectroscopie de masse, laquelle est une méthode quantitative qui pourra être utilisée ultérieurement lors des essais sur les animaux, d'où son intérêt pour cette étude, ayant fait l'objet d'une publication¹⁶¹.

Quant au composé **4b**, il servira de support pour démontrer la démarche suivie par le galéniste lors de la mise au point d'un principe actif nouveau ayant montré une activité biologique.

Nous allons ainsi étudier ce composé d'un point de vue physico-chimique afin d'obtenir une caractérisation plus complète que l'analyse RMN. Pour cela nous allons nous appuyer sur la monographie telle qu'elle est décrite par la Pharmacopée européenne, en essayant de s'y conformer le plus possible. Cette étude est présentée au chapitre suivant.

Cette caractérisation servira de support pour les études de préformulation et de formulation qui suivront.

Chapitre III

ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO- CHIMIQUES DU PRINCIPE ACTIF : LE BG 637

Introduction

Les études de préformulation sont les premières étapes du développement d'un médicament et de la mise en point d'une forme galénique. Elles peuvent être définies comme étant une investigation des propriétés physiques et chimiques du principe actif seul dans un premier temps puis du mélange principe actif / excipients.

En fonction de la forme galénique choisie et de la voie d'administration, les études de préformulation sont orientées vers la recherche de caractéristiques bien spécifiques, par exemple pour un comprimé il est important de connaître les caractères physico-chimiques telles que la granulométrie du principe actif, sa dissolution, son pKa...

Toute étude de préformulation doit commencer par la description de la substance, sa couleur son odeur, son goût (caractères organoleptiques). La pureté est un facteur essentiel, elle doit être vérifiée par des méthodes connues telle que la chromatographie sur couche mince (CCM) ou la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Par la suite, nous procédons à des analyses complémentaires : spectres UV, IRTF, de masse, la diffraction aux rayons X, l'analyse calorimétrique différentielle (DSC), mesure du pKa, de la solubilité ainsi que de la stabilité sous les différentes conditions ICH et autres études toujours en conformité avec la Pharmacopée Européenne.

Lorsque la structure d'un principe actif a été établie, il est nécessaire de mettre en évidence les problèmes d'interactions physico-chimiques possibles entre le principe actif et les excipients composant la formulation.

Il peut s'agir d'une synergie entre les différents composants et l'on parle alors d'interactions bénéfiques et l'on peut observer par exemple une augmentation de la stabilité, de la solubilité. Soit nous avons une incompatibilité entre les différents composants et l'on parle alors d'interactions négatives qui peuvent se traduire par une dégradation plus rapide du principe actif ou une diminution de la solubilité à titre d'exemple.

Pour ces raisons l'étude des interactions principe actif / excipients est importante pour le formulateur. Elle permet la sélection des excipients les plus appropriés pour la formulation. Elles seront l'objet du chapitre suivant.

Toutes ces étapes de caractérisation et de mise en forme galénique sont schématisées dans la figure 7.

Dans ce chapitre, nous allons aborder dans un premier temps la description de la monographie d'un principe actif, telle qu'elle est décrite par la Pharmacopée Européenne, puis tout en essayant de rester conforme à cette dernière, aux études elles-mêmes basées sur des méthodes d'analyses connues telles que l'analyse calorimétrique différentielle (DSC), les méthodes spectrales en ultraviolet (UV), en infra-rouge (IRTF), des études de solubilité, de stabilité, selon différentes conditions.

Aspects bibliographiques

I. Le principe actif

Ce qui confère à un médicament son activité thérapeutique, c'est le **principe actif**.

Tout nouveau principe actif ayant révélé une activité thérapeutique, doit être identifié et analysé selon des critères établis et validés par la Pharmacopée Européenne. Les propriétés étudiées sont classées en deux catégories : les propriétés chimiques et les propriétés physiques.

II. les propriétés chimiques

II.1. la nature du principe actif¹⁶² : qui peut être d'origine :

- ☞ **Synthétique** : le produit est caractérisé par ses constantes physiques et chimiques.
- ☞ **Biologique** : obtenu à partir d'animaux, de végétaux ou de micro-organismes.
- ☞ **Minérale** : obtenu à partir de produits naturels tels que les minéraux, les produits fossilisés...

Le BG 637 est d'origine synthétique. Cela permet d'assurer la reproductibilité de sa qualité chimique, galénique et biologique.

Un grand nombre de molécules obtenues à partir d'une série de réactions chimiques consécutives occupent la première place dans la thérapeutique¹⁶³.

II.2. L'état de pureté

Les principes actifs contiennent en général certaines impuretés. Ces dernières ont pour origine le procédé de synthèse ou bien elles peuvent apparaître au cours du stockage. Elles peuvent également être le résultat d'une dégradation du composé.

Les impuretés de fabrication sont donc liées au processus de synthèse ou aux opérations de purification si elles sont insuffisantes. Elles peuvent contenir les produits de départ et leurs impuretés, les produits de réactions secondaires, des traces de solvants de réaction, de catalyseurs et autres.

Il existe différentes techniques de purification des principes actifs solides :

☞ **L'extraction par les solvants** : elle est basée sur la différence de solubilité entre le principe actif et les impuretés dans un même solvant organique. Après chauffage, la solution est filtrée afin que les impuretés soient retenues sur le filtre puis elle mise au froid pour une recristallisation. Nous obtenons un produit pur mais le rendement est nettement diminué.

☞ **La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)** : elle est basée sur la différence d'affinité des constituants du mélange sur un adsorbant, la silice par exemple. Les différents composants migrent à des vitesses différentes et sont donc élus à différents moments ce qui permet de

récolter au fur et à mesure des fractions. Un produit pur ne donne qu'une seule tache après révélation¹⁶⁴.

L'analyse RMN et la chromatographie du BG 637 ne révèlent qu'un seul produit.

II.3. La monographie¹⁶⁵ : Etant donné que le produit est inconnu, sa monographie est réalisée par le laboratoire de synthèse, en corrélation avec la Pharmacopée Européenne (PE). On parle de **monographie interne** et rend compte de :

1) Le titre en français et en latin (si cela s'avère possible) qui établit la nomenclature du produit selon les règles établies de la chimie

2) La formule brute et développée du produit et la connaissance des groupements fonctionnels permettent d'avoir des indications telles que le risque d'incompatibilité et le type d'instabilité pouvant se produire.

3) Sa masse atomique et moléculaire relative

4) La production qui permet de connaître la méthode fabrication du produit concernant les matières premières, le procédé de fabrication lui-même ainsi qu'à sa validation et son contrôle.

Une fois cette première identification établie elle est complétée par :

5) Description des caractères organoleptiques

☒ **La couleur** : est fonction de la structure chimique, du degré d'insaturation de la molécule et des groupements chromophores qu'elle contient.

☒ **L'odeur** : doit être examinée avec attention et peut être caractéristique d'un groupement fonctionnel (sulfure, amine...).

☒ **Le goût** : est une caractéristique importante pour les formes orales, s'il doit être masqué.

6) Identification du produit d'un point de vue physico-chimique à savoir faire une analyse spectrale par l'infra-rouge, l'ultra-violet, le point de fusion, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC)...

7) Evaluation de sa solubilité selon les indicateurs de solubilité de la pharmacopée européenne à une température comprise entre 15° et 25°C comme indiqués dans le **tableau 6**:

Tableau 6 : évaluation de la solubilité d'un produit selon la P.E.

Termes descriptifs	Volumes approximatifs de solvants en millilitres par gramme de substance		
Très soluble	Inférieur	1	
Facilement soluble	De	1	à 10
Soluble	De	10	à 30
Assez soluble	De	30	à 100
Peu soluble	De	100	à 1000
Très peu soluble	De	1000	à 10000
Pratiquement insoluble	Plus de	10000	

8) Essai et dosage : qui permettent de préciser si la substance est desséchée ou anhydre, mention à mettre entre parenthèses, mais encore le degré d'impuretés et les limites dues aux erreurs analytiques normales, des variations acceptables inhérentes à la fabrication et à la préparation et un degré de dégradation acceptable. Ils permettent également de déterminer, l'indice de pureté et le point de fusion du principe actif. C'est la mesure de la température de fusion du solide. [Charles Gerhardt, 1853]. Elle s'effectue par deux types d'appareillage : appareils capillaires et appareils à plaque chauffante (banc Kofler, bloc Maquenne)¹⁶⁵. Ces essais comprennent également la détermination perte à la dessiccation ou dosage de l'eau par la méthode de Karl Fischer, la détermination du pouvoir rotatoire de la molécule, son indice de réfraction, sa viscosité...

9) La conservation du produit dont les conditions doivent également être explicitées (récipient étanche, à l'abri de la lumière,...)

10) L'étiquetage est régi par des accords internationaux et des règlements supranationaux et nationaux.

11) Les avertissements : en cas de produits dangereux pour la santé et doivent être manipulés avec précaution.

12) Les impuretés : dont la liste doit être établie à titre d'information, tels les solvants résiduels, les produits de départ et qui doivent être éliminées par les méthodes citées ultérieurement.

13) Les propriétés fonctionnelles : dont la liste est fournie à titre d'information.

14) Les substances de référence, préparations de référence et spectres de référence : spécifiés dans certaines monographies. La substance de référence, la préparation de référence ou le spectre de référence ayant un usage déterminé, la Commission Européenne de Pharmacopée ne peut être tenue pour responsable des erreurs éventuelles liées à un autre usage que celui qui est prescrit.

L'étude d'un principe actif incluse également l'étude d'un phénomène spécifique, qui ne doit pas être négligé vu de son influence sur la stabilité du futur médicament. Ce phénomène est :

II.4. Polymorphisme et état cristallin : Un grand nombre de médicaments peuvent exister à l'état solide sous forme d'au moins deux mailles cristallines différentes, c'est le phénomène de polymorphisme. Ces différentes formes cristallines sont appelées polymorphes¹⁶⁶. Ils diffèrent les uns des autres par leurs propriétés physiques telles que la solubilité, la densité vraie, les propriétés d'écoulement, le comportement à la compression^{167 168}.

Le polymorphisme vrai est un phénomène relatif à un tiers des substances organiques, un autre tiers existant sous forme de solvates ou d'hydrates, c'est à dire des pseudopolymorphes^{169 170}. Une telle fréquence se retrouve parmi les principes actifs pharmaceutiques, à savoir : 40% de substances de l'USP avec des monographies comportant un test de dissolution¹⁷¹. (Plus de cent substances de la Pharmacopée Européenne¹⁷²

Le polymorphisme influence :

- a) La biodisponibilité du principe actif.^{173 174}
- b) la stabilité chimique du principe actif.¹⁶³
- c) la compressibilité du principe actif.¹⁶⁸
- d) la stabilité physique du principe actif.

Les autres polymorphes peuvent se transformer avec le temps en forme stable. Si cette transformation est lente le polymorphe est dit métastables.

Elles peuvent être utilisées à la place de la forme stable si elle présente de meilleures propriétés de dissolution et compression et si l'efficacité thérapeutique n'est pas diminuée.

III. Les propriétés physiques

L'objectif de la pharmacie galénique est de trouver pour chaque principe actif la forme médicamenteuse la mieux adaptée au traitement d'une maladie déterminée. L'opération de mise en forme galénique a pour but de :

- Favoriser la conservation des principes actifs en les protégeant contre les facteurs d'altération.
- Masquer et corriger les impressions et les effets secondaires : odeur et saveur désagréable, réactions douloureuses.
- Modifier la durée de l'activité du principe actif.

En connaissant les inconvénients de la matière première, le galéniste pourra disposer de moyens adéquats afin de les masquer¹⁷⁵.

problèmes	Solutions possibles
Caractères organoleptiques peu agréables	Aromatisation, édulcoration
Granulométrie importante	Broyage
Granulométrie faible	Densification par mouillage
Faible solubilité	Co-solvants, tensio-actifs, complexes, pH

Les qualités physiques d'un principe actif concernent :

III.1. Le pouvoir de dissolution : consiste à diviser une substance à l'état moléculaire au sein d'un liquide. Le résultat est appelé *solution* car on obtient une phase unique homogène qui est constituée par le *soluté* (ensemble des substances dissoutes) et par le *solvant*¹⁷⁶.

Il existe deux types de dissolution : la dissolution simple ou complète et la dissolution extractive ou partielle.

Le pouvoir de dissolution dépend de plusieurs facteurs qui sont :

III.1.1. La solubilité du produit¹⁷⁶ : qui est fonction de la nature chimique de la substance à dissoudre et de celle du solvant. Les principes actifs hydrophiles sont solubles dans les solvants polaires et les principes actifs hydrophobes sont quant à eux solubles dans les solvants apolaires.

La solubilité est aussi fonction de la température qui correspond en générale à la température ambiante soit 20°C sachant qu'elle augmente avec la température.

Le pH joue également un rôle dans le cas de la solubilité par ionisation.

Un produit est plus soluble à l'état amorphe qu'à l'état cristallin et sachant qu'à température donnée la forme cristalline la moins stable est la plus soluble, Le polymorphisme a donc son importance.

Les additifs qui peuvent modifier la solubilité en l'augmentant ou en la diminuant.

I.2.1.2. La vitesse de dissolution : les produits cristallisés étant plus organisés que les produits amorphes, on observe dans ce cas une réaction de désorganisation à l'interface solide-liquide d'une part et d'autre part une diffusion des molécules ou des ions de la surface du solide vers le sein de la solution.

La vitesse de dissolution dépend de :

⊗ La surface de contact solide-liquide. Ainsi la vitesse de dissolution augmente en fonction du degré de division.

⊗ La viscosité qui la diminue en réduisant la diffusion.

⊗ L'agitation qui l'accélère en renouvelant le liquide d'interface.

On peut avoir recourt à une augmentation de la température dans la pratique pour accélérer la dissolution. Elle dépend en général du phénomène le plus lent¹⁷⁶.

III.2. La granulométrie ou taille de particules :

La taille et la forme des particules de la molécule affectent certaines propriétés physico-chimiques ainsi que le comportement biopharmaceutique du produit^{177 178}.

Elles jouent un rôle sur l'écoulement et l'efficacité des mélanges de poudres et la taille joue aussi un rôle sur l'homogénéité du comprimé final¹⁷³.

La granulométrie influence :

⊗ la vitesse de dissolution : plus les particules sont fines plus la dissolution est facilitée.

⊗ L'homogénéité et la stabilité des mélanges de poudres

⊗ La qualité du comprimé

⊗ Le dosage ou/ et répartition des poudres pour les comprimés

⊗ La biodisponibilité des principes actifs peu solubles administrés sous forme solide¹⁷⁶.

Le plus souvent, on a recourt soit au tamis, soit au microscope optique, soit au granulomètre laser pour l'analyse de la granulométrie.

III.3. Les densités vraie et apparente : Elles sont nécessaires pour la détermination de la surface spécifique. Elles permettent d'avoir des indications sur la dimension de la forme finale et sur le stockage du produit. Cette densité joue un rôle sur les propriétés d'écoulement et dans le cas des mélanges de poudres¹⁷⁶.

III.3.1. La densité vraie : correspond au volume occupé par le solide à l'exclusion de toute porosité.

III.3.2. La densité apparente : correspond au volume apparent du granulé :

$$\text{Densité apparente} = \frac{\text{Masse}}{\text{Volume apparent}}$$

III.4. La porosité : définie par le pourcentage de vides d'une poudre ou d'un granulé.

III.5. La surface spécifique : qui représente la surface totale par unité de masse. Sa valeur influence la vitesse de dissolution.

III.6. Le coefficient de partage et le coefficient d'ionisation : ces deux notions sont étroitement liées. Elles font parties de l'hypothèse du partage selon le pH ou « pH partition hypothesis ». Cette hypothèse regroupe plusieurs constatations :

La plupart des principes actifs sont des acides ou des bases faibles. Ils franchissent la barrière lipidique membranaire le plus souvent par diffusion passive (loi de Fick).

Pour diffuser dans la membrane lipidique, la molécule doit y présenter une certaine solubilité. Seule la fraction non ionisée est liposoluble. C'est sous forme non ionisée que la molécule va diffuser dans la membrane.

Le degré d'ionisation dépend du pH, il sera différent dans le suc gastrique, le suc intestinal et le plasma.

Donc la connaissance du coefficient d'ionisation, pKa, et du coefficient de partage, P, nous permettra d'émettre des hypothèses sur les possibilités de résorption d'un nouveau principe actif.

III.6.1. Le coefficient de partage :

C'est le reflet de la lipophilie de la molécule. Il correspond au rapport de ses concentrations à l'équilibre dans deux phases non miscibles, la phase lipophile (solvant organique) et la phase aqueuse (eau).

Détermination du coefficient de partage¹⁷⁹:

$$P = \frac{C_{\text{Lip}}}{C_{\text{aq}}} = \frac{a (C_{\text{aq}}^0 C_{\text{aq}}^1)}{b C_{\text{aq}}^1}$$

où :

- ⊗ a : représente le volume de la phase lipophile
- ⊗ b : représente le volume de la phase aqueuse
- ⊗ C_{aq}^0 : est la concentration avant l'expérience dans la phase aqueuse
- ⊗ C_{aq}^1 : est la concentration après l'expérience dans la phase aqueuse

III.6.2. Coefficient d'ionisation :

Elle se rapporte à la réaction générale d'ionisation d'un acide :



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

où HA et A^- sont respectivement l'acide et la base conjuguée.

La constante d'ionisation est donnée par l'équation :

$$\text{pKa} = -\log K_a = \text{pH} + \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^+]}$$

De même pour une base B :



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{B}]}{[\text{BH}^+]}$$

$$\text{p}K_a = \text{pH} + \log \frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}]}$$

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le pKa, elles sont décrites par ALBERT et SERJEANT¹⁸⁰

III.7. Etude de la stabilité du produit :

III.7.1. A la chaleur et l'humidité :

Les données obtenues permettent une évaluation de la stabilité du produit dans les conditions habituelles de stockage (**conditions ICH**).

Stockage	Température (°C)	Humidité relative (HR)	Durée en mois
Long terme	25°C ± 2°C	60% HR ± 5%	T0, T3, T6, T9, T12, T18, T24, T36 mois
Moyen terme	30°C ± 2°C	65% HR ± 5%	T0, T3, T6, T9, T12 mois
Accéléré	40°C ± 2°C	75% HR ± 5%	T0, T3, T6 mois

Les échantillons subissent un processus de vieillissement accéléré à haute température (120°C) pendant 60 jours¹⁸¹.

Ils sont également placés dans des conditions diverses hors conditions ICH, afin d'évaluer leur stabilité. Ces conditions sont :

☒ Une température de + 4°C et la température ambiante sont les températures de référence standardisées.

☒ Le test à la chaleur sèche de 35° à 37°C ; 45° à 50°C ou encore de 45°C ; 70°C.

☒ L'humidité relative est de 70 ou 75%.

☒ Le test de la chaleur humide se fait à des températures de 35°C et 90% d'humidité relative.

Les prélèvements se font à 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 et 36 mois de stockage normalement. Pour les températures élevées le terme de l'essai se situe à 15 jours.

Les caractères organoleptiques, la CCM, les spectres seront de nouveau déterminés pour détecter d'éventuels variations. Si aucun changement n'est observé après le test à température élevée on pourra conclure que le produit est stable.

III.7.2. A la lumière (ICH):

L'essai est réalisé grâce à un appareillage spécifique dont la lumière artificielle simule la lumière solaire.

Les échantillons sont placés dans des boîtes de Pétri ouvertes afin d'exposer une assez grande surface. Les échantillons témoins sont placés dans les mêmes conditions mais protégés de la lumière. Le temps d'exposition peut aller de quelques heures à quelques jours. Les échantillons devront être examinés régulièrement durant ce laps de temps. Si un quelconque changement est observé, le produit peut être considéré comme étant sensible à la lumière.

III.7.3. A l'oxydation :

Elle est nécessaire pour le conditionnement final du produit (sous atmosphère inerte ou non). L'échantillon est placé sous une atmosphère riche en oxygène (40%) puis il est mis à vieillir dans des ampoules scellées sous air et sous azote.

IV. Conclusion

Ainsi le champ d'investigation établi par la Pharmacopée Européenne est assez large et regroupe un certain nombre de caractérisations, nécessitant des appareillages assez lourds et pas souvent disponibles en milieu universitaire. Un grand nombre des méthodes citées ci-dessus sera réalisé, en essayant de rester le plus conformément possible à la Pharmacopée Européenne.

**Propriétés physico-chimiques du
BG 637 : expérimentation**

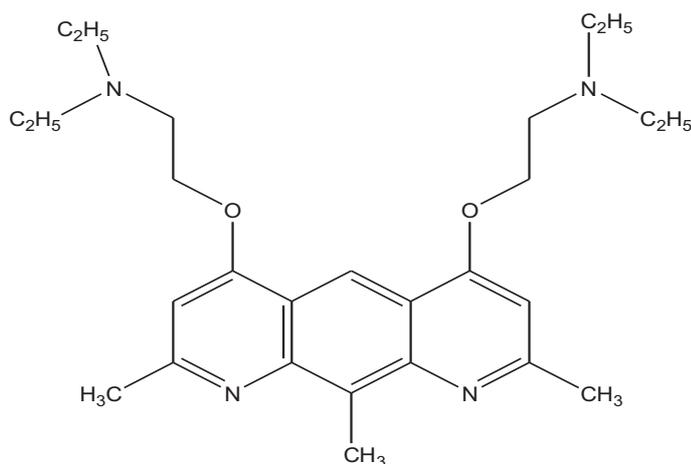
I. Propriétés chimiques

I.1. La nomenclature

4,6-Bis[2'-(diéthylamino)éthoxy]-2,8,10-triméthylpyrido[3,2-g]quinoléine

I.2. structure moléculaire

Formule développée :



Formule brute : $C_{27}H_{40}N_4O_2$

Masse moléculaire : 452

Classe thérapeutique : Agent reversant de la MDR

I.3. Propriétés organoleptiques :

Aspect : Microcristaux

Couleur : Jaune

Odeur : sans

solubilité Insoluble dans l'eau

Soluble dans les solvants organiques : chloroforme, éthanol, méthanol, cétone, toluène...

I.4. Point de fusion :

144-146°C

I.5. Activité optique : nulle car la molécule ne possède pas de carbone asymétrique.**I.6. Analyse calorimétrique différentielle (DSC)¹⁸²:**

L'analyse calorimétrique différentielle est une technique utilisée pour déterminer les températures de transition du composé étudié. Ces transitions sont le reflet des changements qui interviennent dans le composé lors de son chauffage.

Ainsi, la DSC nous permet de déterminer, au chauffage, les températures de fusion, d'oxydation ou de décomposition, au refroidissement, la température de cristallisation, le phénomène de polymorphisme et pseudo-polymorphisme. Tous ces changements, s'ils ont lieu, se traduisent par des pics spécifiques en DSC.

A l'étape de préformulation, la DSC permet aussi de mettre en évidence les interactions et incompatibilités entre les différents composants d'une forme galénique, de prédire la stabilité thermique entre autres.

I.6.1. Matériel et méthode :

Pour réaliser l'analyse calorimétrique différentielle (DSC) nous avons utilisé un appareil DSC Setaram 92 avec des creusets en aluminium, des thermocouples en Platinel®. La prise d'essai exacte est voisine de 20 mg et le produit de référence thermiquement inerte, le kaolin pyrolosé à 1000°C. L'analyse a été faite sous air statique avec une vitesse de chauffage de 2°C/min, depuis la température ambiante (20°C) jusqu'à 600°C, avec un isotherme de 300°C au départ.

La vérification de l'étalonnage des températures a été faite par l'acide benzoïque, l'indium, l'étain, le bismuth et le plomb, puis la détermination des variations d'enthalpie (ΔH J/g), par intégration linéaire des pics endothermiques et exothermiques (logiciel Sétaram).

La caractérisation du phénomène de la fusion a été réalisée par refroidissement de l'échantillon fondu et obtention du pic exothermique de cristallisation à une température voisine de celle du pic endothermique présent au chauffage. On déterminera pour la fusion, la température du sommet du pic endothermique (T_{max}) et la température extrapolée (T_{onset}) correspondant à l'intersection des

tangentes, d'une part à la ligne de base, et d'autre part, à la première partie du pic endothermique. La Tonset correspond au cas où l'échantillon est composé de solide et de liquide, alors que la Tmax correspond à l'échantillon **uniquement** sous forme de liquide.

Une deuxième analyse DSC a été réalisée par l'appareil Netzsch DSC 200F3. La prise d'essai est voisine de 10 mg. L'échantillon est placé dans un creuset en aluminium, avec un couvercle. L'analyse a été faite sous air statique depuis la température ambiante (20°C) jusqu'à 600°C, avec une vitesse de chauffage variant de 1° à 10°C/min. un creuset vide en aluminium, avec un couvercle, est utilisé comme référence.

Pour l'étude du BG 637, la vitesse de chauffe a été de 1, 2, 5 et 10°C/min afin de mettre en évidence la présence éventuelle d'impuretés ou de formes polymorphes. Une augmentation de la vitesse de chauffage entraîne une amplitude des pics plus grande, avec souvent une mauvaise résolution lorsque des pics rapprochés sont présents. A l'inverse, à faible vitesse de chauffage la séparation est meilleure, mais l'amplitude des pics est plus faible, entraînant un manque de sensibilité.

La vitesse que nous choisirons par la suite, pour les excipients seuls et les mélanges avec le BG 637, sera de 2°C/min.

I.6.2. Résultat et interprétation :

L'essai se déroule en trois cycles : 1^{er} - chauffage, 2^{ème} - refroidissement et 3^{ème} - chauffage.

Le spectre DSC du BG 637 (**figure 11 A, tableau 7**) met en évidence un pic endothermique correspondant à la fusion. Le Tonset est constant alors que le Tmax augmente avec la vitesse de chauffage.

A 200°C, on observe un phénomène d'oxydation : pic exothermique à 300°C et un autre entre 300°-550°C qui serait dû au phénomène de combustion.(**figure 11 B**).

Tableau 7: données DSC du BG 637: températures et valeurs d'enthalpie (Essais réalisés avec le Setaram)

	essais	1	2	3	4
	Vitesse de chauffage (°C)	1	2	5	10
1 ^{er} chauffage	Tonset (°C)	139,7	138,7	140,1	140,2
	Tmax (°C)	142,6	142,7	144,2	145,1
	ΔH (J/g)	-35,7	-34,5	-35,6	-37,1
refroidissement	Tmax (°C)	135,0	136,2	134,7	133,2
2 ^{ème} chauffage	Tonset (°C)	139,3	138,8	139,2	138,0
	Tmax (°C)	142,1	142,3	144,1	145,0
	ΔH (J/g)	-33,3	-32,3	-34,5	-36,3

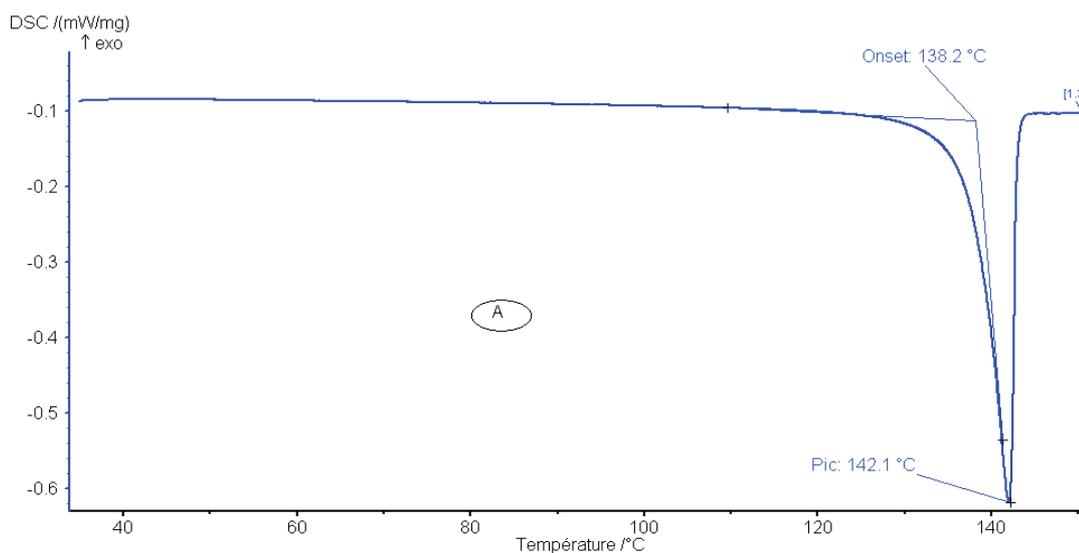
A partir des 8 valeurs obtenues pour Tonset, on détermine :

La moyenne = 139,3°C

L'écart type = 0,746°C

Le coefficient de variation = 0,596%

Les valeurs de la moyenne des Tonset des quatre essais, de l'écart type et du coefficient de variation sont similaires quelque soit l'appareil utilisé



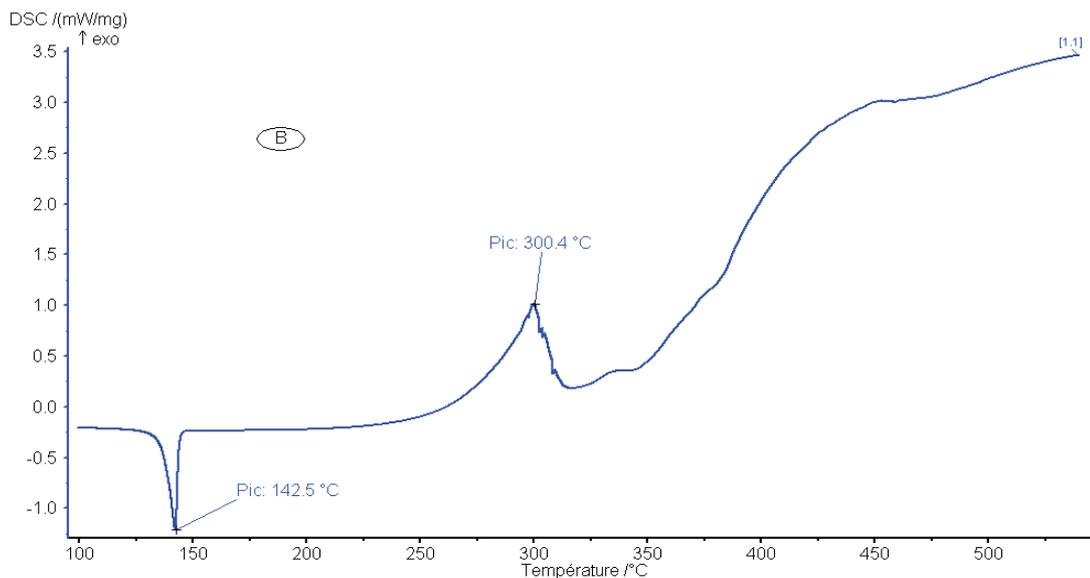


Figure 11 : spectres DSC du BG 637: A = vitesse de chauffage 30 – 150°C; échantillon : 11,6 mg; B = vitesse de chauffage 50 – 550°C; échantillon 10,8 mg. (Essais réalisés par le Netzsch, vitesse de chauffage 2°C/min, sous air statique).

I.7. Caractéristiques spectrales

I.7.1. Spectroscopie UV-VIS :

C'est une méthode rapide et précise. Elle est utilisée pour le contrôle des produits pharmaceutiques d'un point de vue quantitatif et non structural. Elle est utilisée pour des analyses effectuées dans des systèmes multi-composants, ainsi que pour des mesures quantitatives directes en milieu trouble ou coloré.

Ce domaine spectral est divisé en deux plages :

- ☒ **UV** (185-400 nm),
- ☒ **Visible** (400-700 nm),

L'origine de l'absorption lumineuse est due à l'interaction des photons incidents avec les espèces de l'échantillon. Les groupes fonctionnels des composés organiques (cétones, amines etc.) sont responsables de l'absorption en UV/VIS, ils sont appelés **groupements chromophores**¹⁸³.

I.7.1.1. Matériel et méthode :

Pour réaliser cette analyse, nous avons utilisé un appareil Shimadzu UV 2401 avec une cuve en quartz de 1cm de trajet optique.

5 mg de BG 637 sont dissous dans 1000 ml d'éthanol absolu; nous obtenons ainsi une solution mère pour l'analyse spectrométrique.

L'absorbance en UV est mesurée contre un blanc, représenté par de l'éthanol absolu, entre les longueurs d'onde allant de 200 à 400 nm.

La mesure est répétée trois avec trois échantillons différents pour sa validation.

I.7.1.2. Résultat et interprétation :

Le spectre obtenu présente trois pics : le premier pic à une longueur d'onde de 256,4 nm avec une absorbance maximum à 1,0851, le deuxième pic à une longueur d'onde de 350,8 nm avec une absorbance de 0,0733 et le dernier pic à une longueur d'onde de 369,2 nm avec une absorbance de 0,0677. L'allure du spectre est identique pour les trois échantillons. (**Figure 12**)

L'absorbance maximum étant inférieure à 2, le spectre obéit à la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon \cdot l \cdot c$

A est l'absorbance,

ϵ est le coefficient d'extinction molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$,

l la longueur de la cuve en quartz en cm,

c la concentration du produit en mol/l.

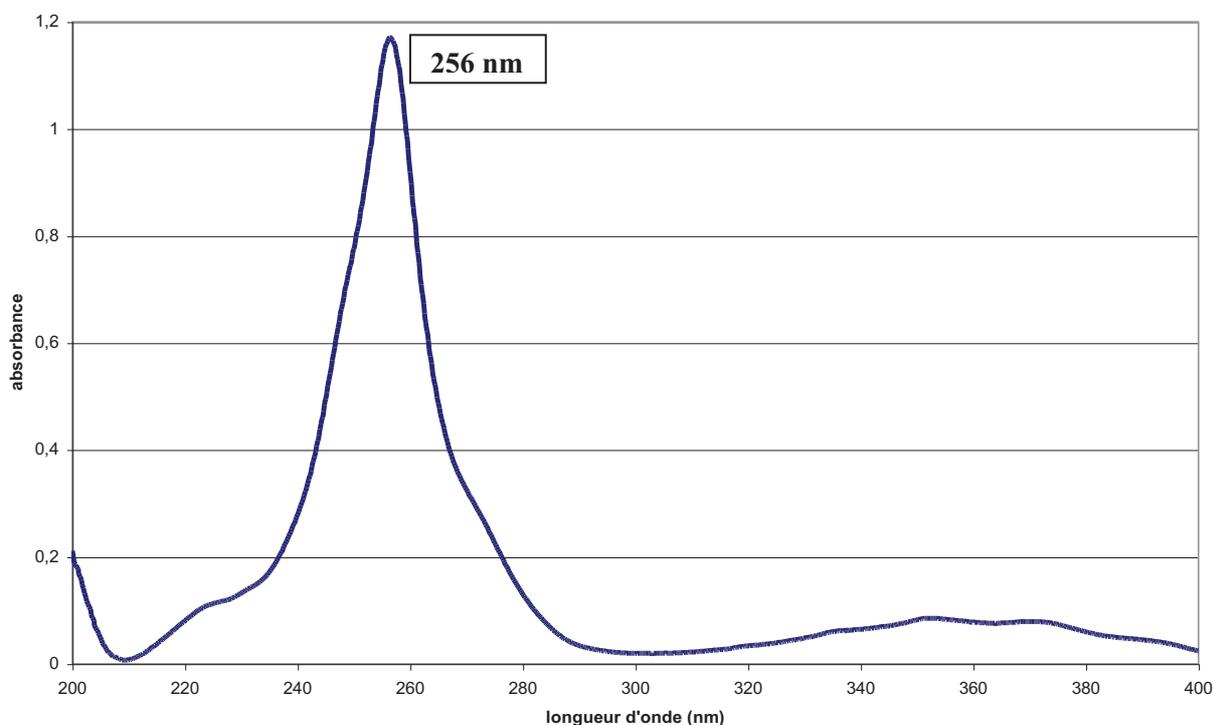


Figure 12 : spectre UV du BG 637 réalisé dans l'éthanol absolu avec une cuve de 1 cm.

I.7.2. La courbe étalon :

A partir de la solution mère préparée pour l'analyse spectrométrique, nous allons procéder à des dilutions appropriées afin de déterminer la gamme d'étalonnage du produit et de vérifier ainsi sa linéarité, sa sensibilité.

Cette courbe, le plus souvent est assimilable à une droite, pour les solutions diluées.

Ainsi, à partir de dilutions successives du principe actif de 0% (représenté par de l'éthanol) à 120% (de 1 mg à 6 mg de BG 637), la détermination de la courbe étalon est réalisée.

La mesure s'effectue à 256 nm, afin de déterminer les paramètres analytiques tels que la sensibilité, de 1 mg à 6 mg de BG 637, la linéarité avec $r = 0,997$, la répétabilité $CV = 1,13\%$, la précision $CV = 1,92\%$ et le coefficient de justesse ($101,2 \pm 1,5 \%$).

La mesure est effectuée trois fois afin de valider la méthode¹⁸⁴

L'absorbance est linéaire en fonction de la quantité de principe actif entre 20 et 120% et le coefficient de corrélation R^2 a une valeur de 0,997.

Au-delà de la caractérisation du produit, cette méthode d'analyse est un élément fondamental car elle permet le dosage ultérieur du principe actif dans la forme pharmaceutique.

I.7.3. La résonance magnétique nucléaire :

La **résonance magnétique nucléaire (RMN)** est une méthode d'identification structurale des composés organiques et minéraux. Elle conduit à des certitudes structurales. Elle est, de ce point de vue, complémentaire de la spectrométrie infrarouge.

Les informations structurales sont obtenues grâce à l'interaction qui naît entre le noyau des atomes de certains éléments présents dans l'échantillon étudié et le champs magnétique intense et constant produit par un aimant, auquel on le soumet. Ces signaux donnent ainsi **le spectre RMN**. Les plus classiquement étudiés concernent le proton (^1H) et le carbone 13 (C^{13})^{183 185}.

L'interprétation de ces signaux (position, aspect, intensité), conduit à un ensemble d'informations d'où l'on en déduit des détails de structure du composé étudié.

On distingue ainsi les différents paramètres qui permettent d'identifier la structure du composé analysé¹⁸⁶ :

Le déplacement chimique (δ), exprimé en partie par million (ppm), représente la séparation entre un signal et celui présenté par une référence. Le déplacement chimique renseigne sur la nature chimique du groupe fonctionnel.

La multiplicité des signaux (singulet, triplet, multiplet...) permet, dans les cas simples, la mesure des constantes de couplage (J) entre noyaux. Les couplages renseignent sur la proximité des noyaux.

I.7.3.1. Matériel et méthode :

Pour réaliser les deux types de mesures, 20 mg de produit sont dissous dans un volume de solvant approprié.

Les spectres de RMN ont été enregistrés à température ambiante sur le spectromètre ARX200 Brüker et ARX300. Les déplacements chimiques, exprimés en ppm (partie par million), sont donnés par rapport au chloroforme deutérié (CDCl_3).

Les abréviations, s, t, m signifient respectivement : singulet, triplet, multiplet. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz.

I.7.3.2. Résultat et interprétation :

Le spectre du proton ^1H :

RMN ^1H (CDCl_3) : 1,10(t, 12H, $J= 7,1\text{Hz}$, CH_3); 2,70(m, 14H, 8H 10- CH_2 ; 6H, CH_3); 3,10(t, 4H, $J= 6,1\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-N}$); 3,30(s, 3H, CH_3); 4,25(t, 4H, $J= 6,1\text{Hz}$, O- CH_2); 6,55(s, 2H, H Ar); 8,85(s, 1H, H Ar).

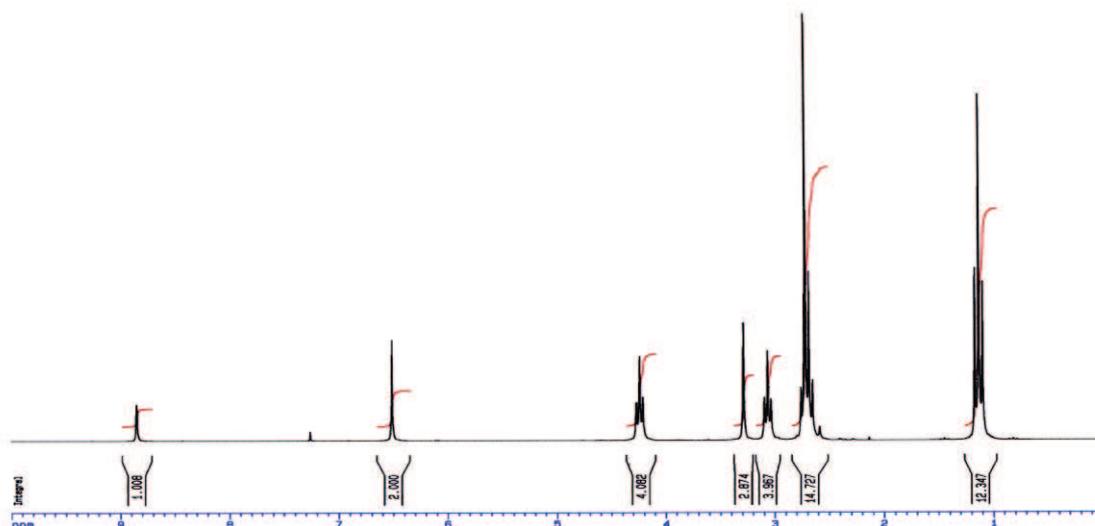


Figure 13 : Spectre RMN du proton du BG 637

Le spectre RMN du carbone ^{13}C :

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 12,26(CH_3); 12,55(10- CH_3); 26,87(2,8- CH_3); 48,07(CH_2); 51,36($\text{CH}_2\text{-N}$); 67,30(O-CH_2); 99,35(C-3, C-7); 112,90(C-5); 118,10(C-5a, C-5b); 132,36(C-10); 146,45(C-10a, C-10b); 160,32(C-2, C-8); 162,01(C-4, C-6).

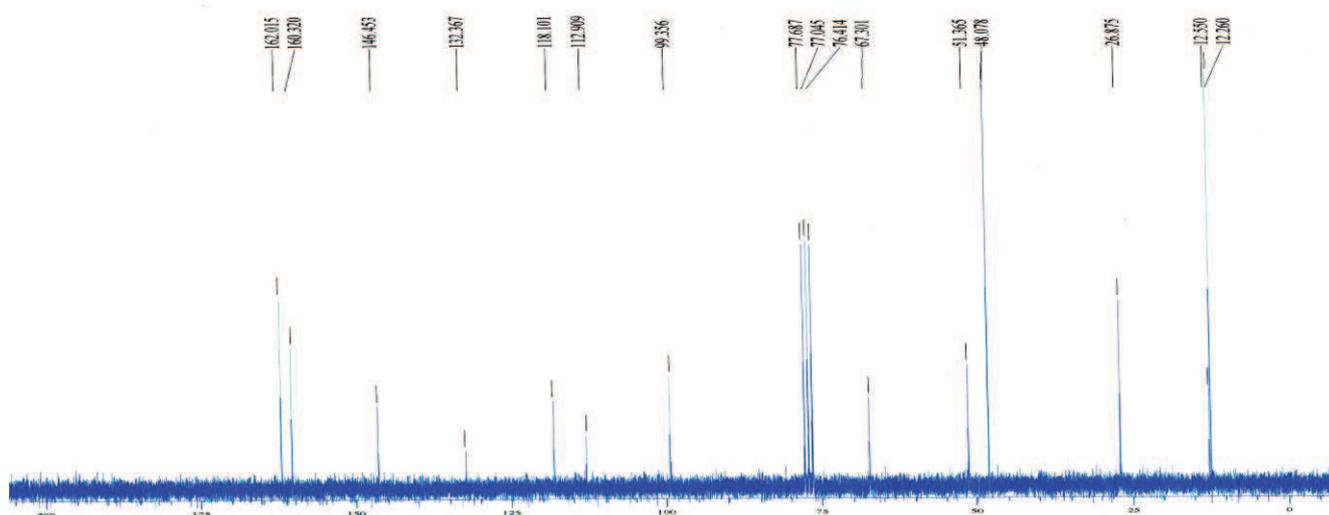


Figure 14 : Spectre RMN du carbone 13 du BG 637

1.7.4. Diffraction de rayons X¹⁸⁷

La diffractométrie des rayons X (XRD ou XRPD pour X-Ray Powder Diffraction) est une technique de base permettant de déterminer la structure des cristaux et des poudres.

L'échantillon est une poudre homogène isotrope, ou bien un solide composé de minuscules cristaux soudés entre eux. La méthode générale consiste à bombarder l'échantillon avec des rayons X, les électrons diffractent ces rayons X comme décrit par l'équation de Bragg^{187 188}. Les rayons X sont diffractés selon un angle de déviation 2θ . On enregistre l'intensité détectée; la courbe obtenue s'appelle le «diffractogramme».

Dans l'industrie pharmaceutique, la XRD est utilisée pour étudier les cristaux des molécules nouvellement découvertes. Elle permet ainsi de vérifier si l'on n'est en présence de polymorphisme.

1.7.4.1. Diffraction aux rayons X du cristal :

Une fois que la structure moléculaire du principe actif a été établie par l'analyse RMN, la diffraction aux rayons X du cristal est réalisée afin de confirmer cette structure.

Les cristaux sont caractérisés par une structure triplement périodique appelée la maille, dont les caractéristiques sont mesurées par la XRD, on peut également définir les plans parallèles, les équidistants, passant par tous les atomes: ce sont les plans réticulaires¹⁸⁷.

Les cristaux sont obtenus après une évaporation lente, à l'air libre, de la solution d'éthanol absolu dans laquelle le BG 637 a été dissout.

Nous avons obtenu l'image ci-dessous avec les données cristallines correspondantes, voir **figure 15**. Le BG 637 est un monocristal de taille 0,2 x 0,2 x 0,2 mm, avec un système cristallin de type triclinique, de type P-1, avec une maille de dimensions:

$$a = 9,213(2) \text{ \AA}, \quad \alpha = 82,61(3)^\circ$$

$$b = 9,903(2) \text{ \AA}, \quad \beta = 88,56(3)^\circ$$

$$c = 15,118(4) \text{ \AA}, \quad \gamma = 83,39(3)^\circ$$

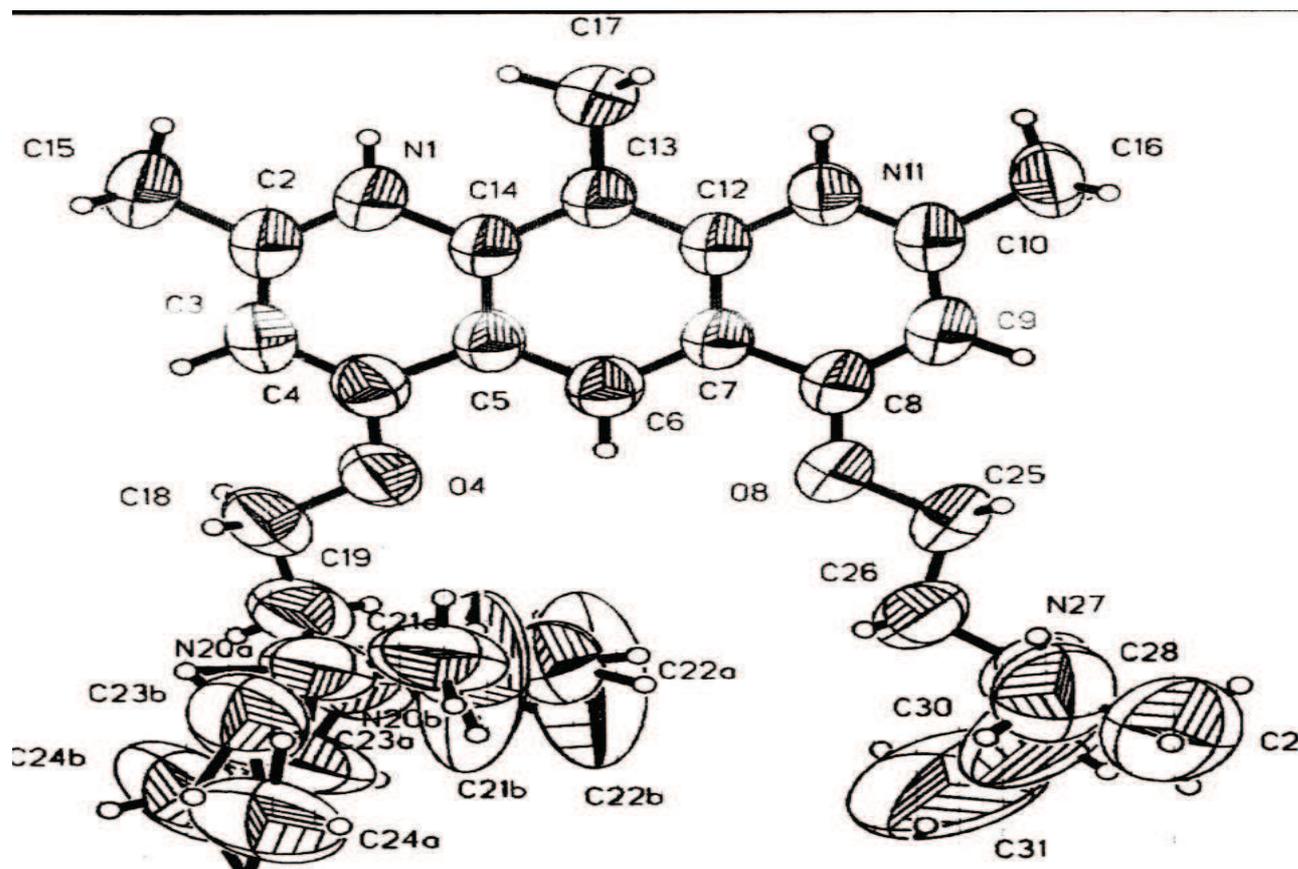


Figure 15: cristallographie du BG 637

1.7.4.2. Diffraction aux rayons X de la poudre

L'appareil utilisé est le INEL CPS 120. Le même échantillon de BG 637 est analysé selon différentes conditions: le premier n'a subi aucune manipulation, le deuxième a été broyé et le troisième échantillon a été recristallisé.

Ainsi, les différents diffractogrammes obtenus sont comparés afin de déterminer des similitudes ou différences cristallines, par rapport au traitement subi par l'échantillon.

Quel que soit le traitement subi par l'échantillon, nous obtenons une même allure de spectre avec les mêmes pics. Ces résultats suggèrent que le BG 637, malgré les différentes manipulations effectuées, n'a subi aucun changement et a une bonne stabilité polymorphique, voir **figure 16**.

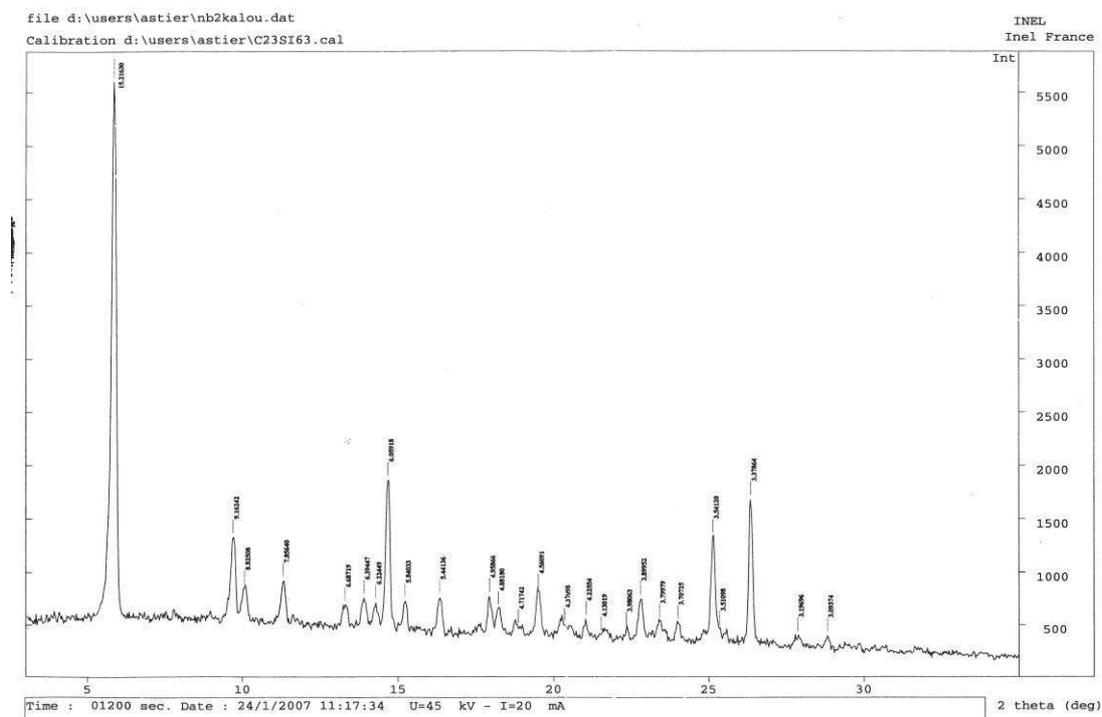


Figure 16 : spectre de diffraction aux rayons X de la poudre

1.7.5. La spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse (**SM**) désigne une méthode d'analyse qui repose sur la détermination des masses des ions atomiques ou moléculaires, spécifiques de l'échantillon analysé, ce qui permet de recueillir des informations sur sa structure.

La spectrométrie de masse repose sur l'ionisation et la fragmentation des molécules. Leur ionisation entraîne une accumulation d'énergie qui, en se dissipant, peut provoquer la rupture des liaisons interatomiques et donner naissance à des fragments caractérisés **par le rapport de leur masse**

sur leur charge m/z ^{183 185}. Le recueil sélectif des différents ions permet l'établissement d'un spectre caractéristique : **le spectre de masse**.

Son domaine d'application s'étend de la chimie organique et inorganique, à la biochimie, à la chimie clinique et environnementale, à la géochimie, sans oublier le domaine de l'agroalimentaire.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse, grâce à sa puissance séparatrice, de la spectrométrie de masse avec sa sensibilité et sa sélectivité de détection, a augmenté les possibilités de chacune des deux méthodes et explique son utilisation dans les études de pharmacocinétique et de métabolisme des médicaments¹⁸⁵.

I.7.5.1. Matériel et méthode :

L'impact électronique (EI) a été la méthode utilisée pour cette analyse selon les conditions standards.

L'analyse est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

L'appareil est un Trace GC DSQ de marque Thermo Finnigan. L'impact électronique est de 70 eV.

Une colonne Thermo TR-5MS de 60 m de long et de 0,32 mm de diamètre interne et 0,25 μm d'épaisseur de film est utilisée (Hewlett Packard, USA). L'hélium est le gaz vecteur à un débit de 1,5 ml/min. La température d'injection est de 250°C.

Une solution à 1g/l de principe actif (PA) est préparée avec le méthanol comme solvant. 1 μl de cette solution. La température est programmée à partir de 100°C pour augmenter de façon linéaire de 15°C/min jusqu'à atteindre 300°C (température finale).

I.7.5.2. Résultat et interprétation :

Le chromatogramme du BG 637, réalisé en couplage avec la spectre de masse, montre la prédominance un seul produit majoritaire qui correspond au principe actif, ce qui permet de s'assurer de la pureté du composé, voir **figure 17**.

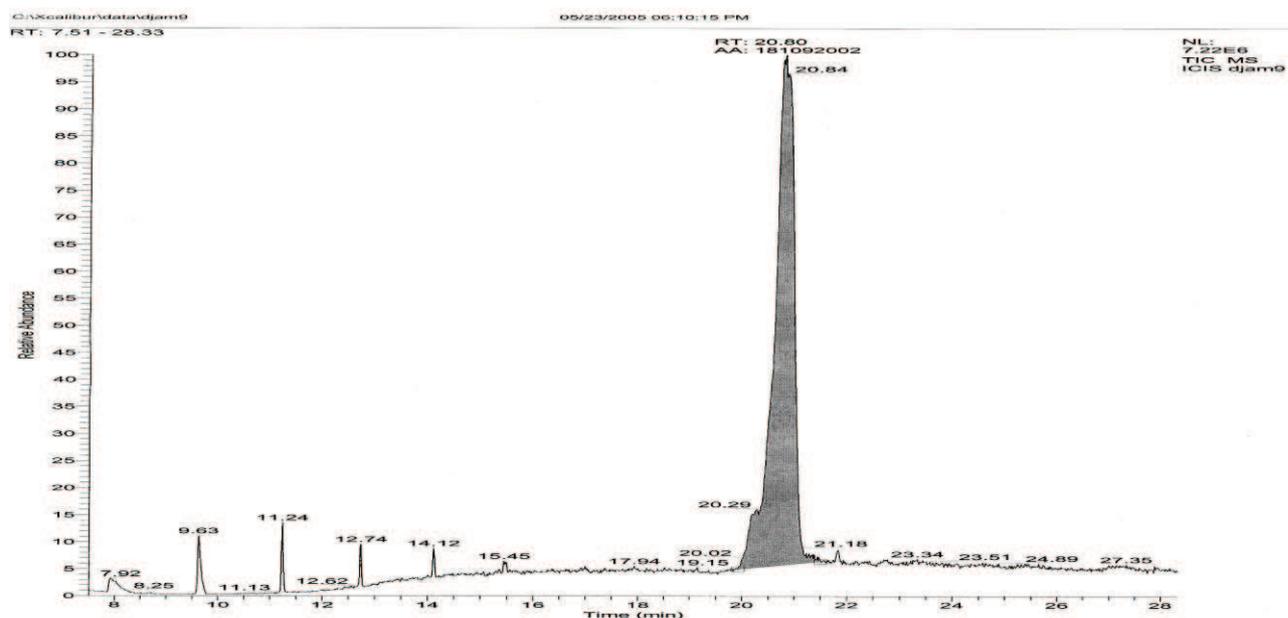


Figure 17: chromatogramme du BG 637 en spectroscopie de masse

L'étude du spectre montre le phénomène de fragmentation de la molécule. Les principaux fragments sont données dans le tableau 8 et les figures 18 et 19.

Tableau 8: principaux fragments et leur intensité relative

m / z	Intensité relative (%)
86	100
100	53.78
252	0,03
352	0,03
452	0,15

Ainsi le BG 637, sous l'impact électronique, subit une fragmentation au niveau de la chaîne latérale. Cette dernière peut se produire à deux niveaux : soit entre les deux CH₂ situé dans la chaîne alkylamine, ce qui nous donne le pic à 86, soit entre le CH₂ et l'oxygène, ce qui nous donne le pic situé à 100, voir figure 18.

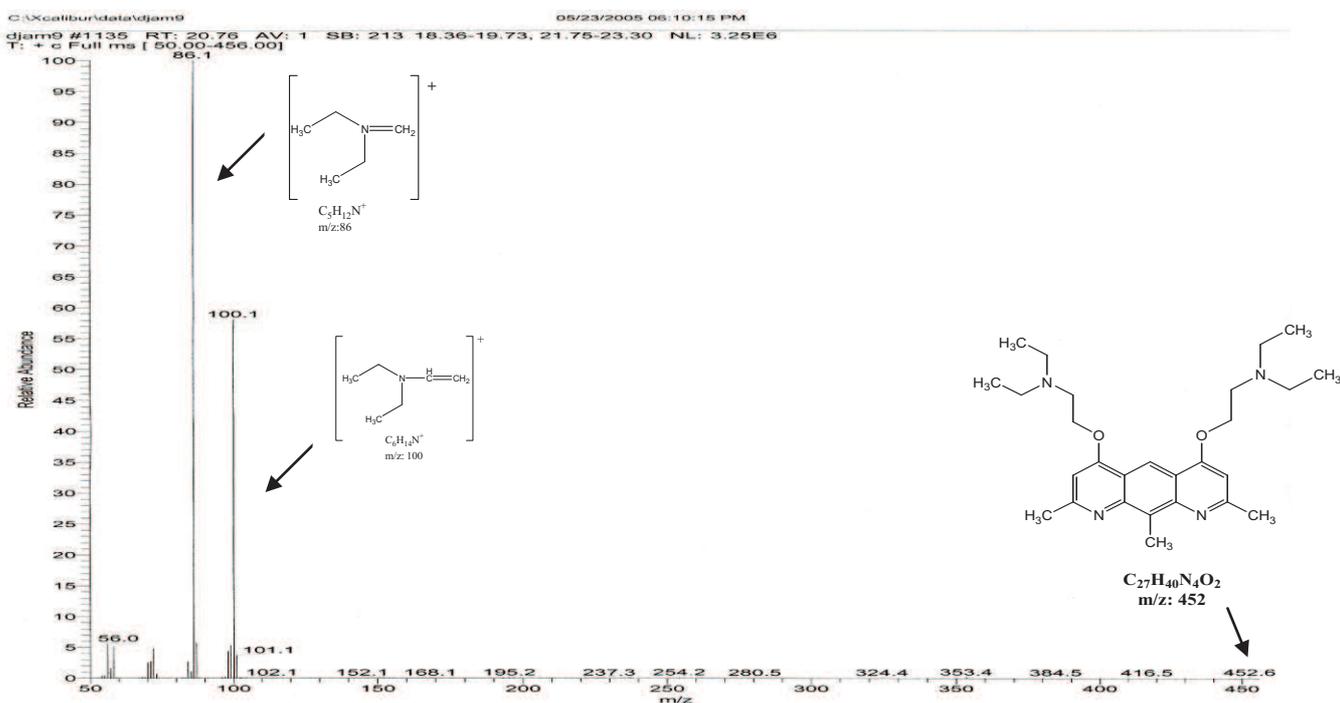


Figure 18 : spectre de masse du BG 637

L'ion moléculaire 452 correspondant au BG 637 est présent mais avec une faible intensité de l'ordre de 0,15% et n'est donc pas visible sur le spectre général. Ceci peut être attribué à une instabilité de la molécule, qui se scinde sous le flux des électrons.

Les fragments 86 et 100 étant majoritaires, les autres fragments sont peu abondants au niveau du spectre général. Cependant l'agrandissement de ce dernier permet la mise en évidence des ions supplémentaires, voir les **figure 19 A, 19 B et 19C**.

L'agrandissement des zones comprises entre 200 et 300 (**figure 19A**), entre 300 et 400 (**figure 19 B**), et entre 399 et 455 (**figure 19C**) indiquent la présence de m/z 254 avec une intensité de 50%, de m/z 353 avec une intensité de 100% et à m/z 452 (ion moléculaire) avec une intensité de 100%, mais dont les intensités réelles sont respectivement : 0,03% ; 0,18% ; 0,15%.

L'ion à 353 pourrait correspondre à la molécule BG 637 ayant été fragmentée au niveau de la fonction éther et ayant perdu la chaîne alkylamine d'un côté, et l'ion à 254 correspondrait à la perte de la chaîne alkylamine entière.

Ces résultats démontrent que la structure de base de la pyridoquinoléine n'est pas stable vis-à-vis de l'ionisation électronique en spectrométrie de masse.

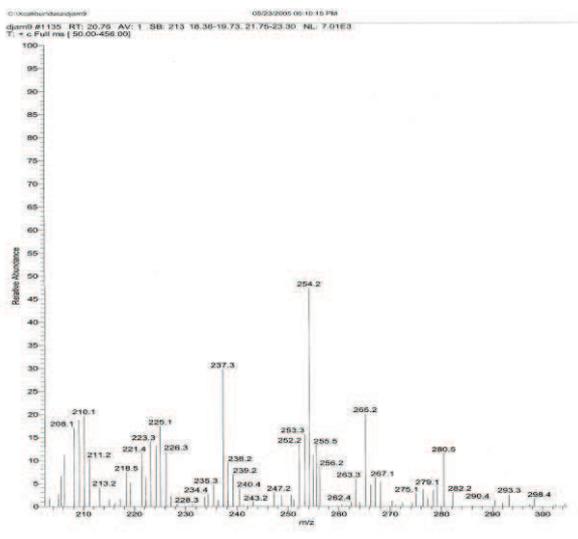


Figure 19 A : Agrandissement de la zone m/z de 200 à 300

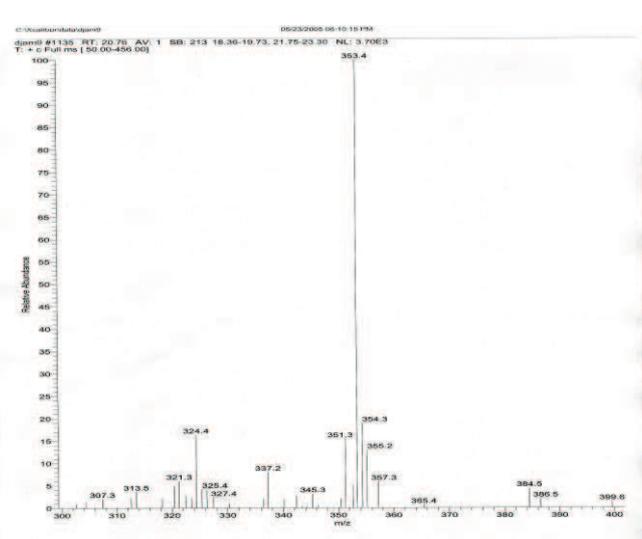


Figure 19 B : agrandissement de la zone m/z de 300 à 400

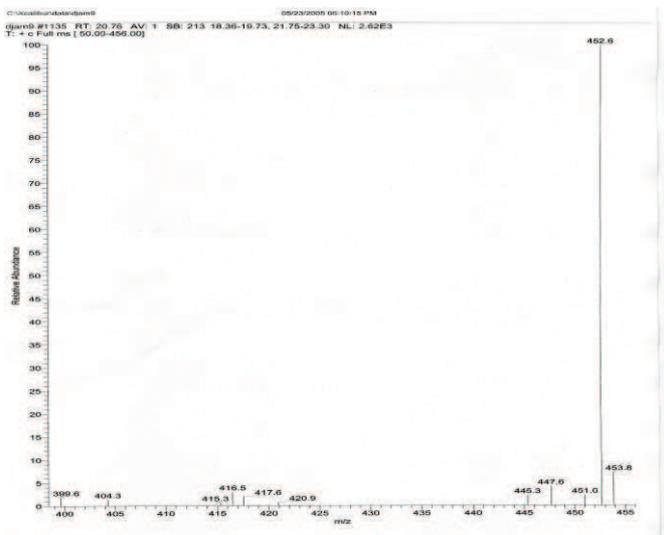


Figure 19 C : Agrandissement de la zone m/z de 400 à 455

Figure 19 : agrandissements du spectre de masse du BG 637.

La fragmentation du principe actif qui correspond donc à deux composés majoritaires, se déroule selon le schéma de fragmentation présenté **figure 20**.

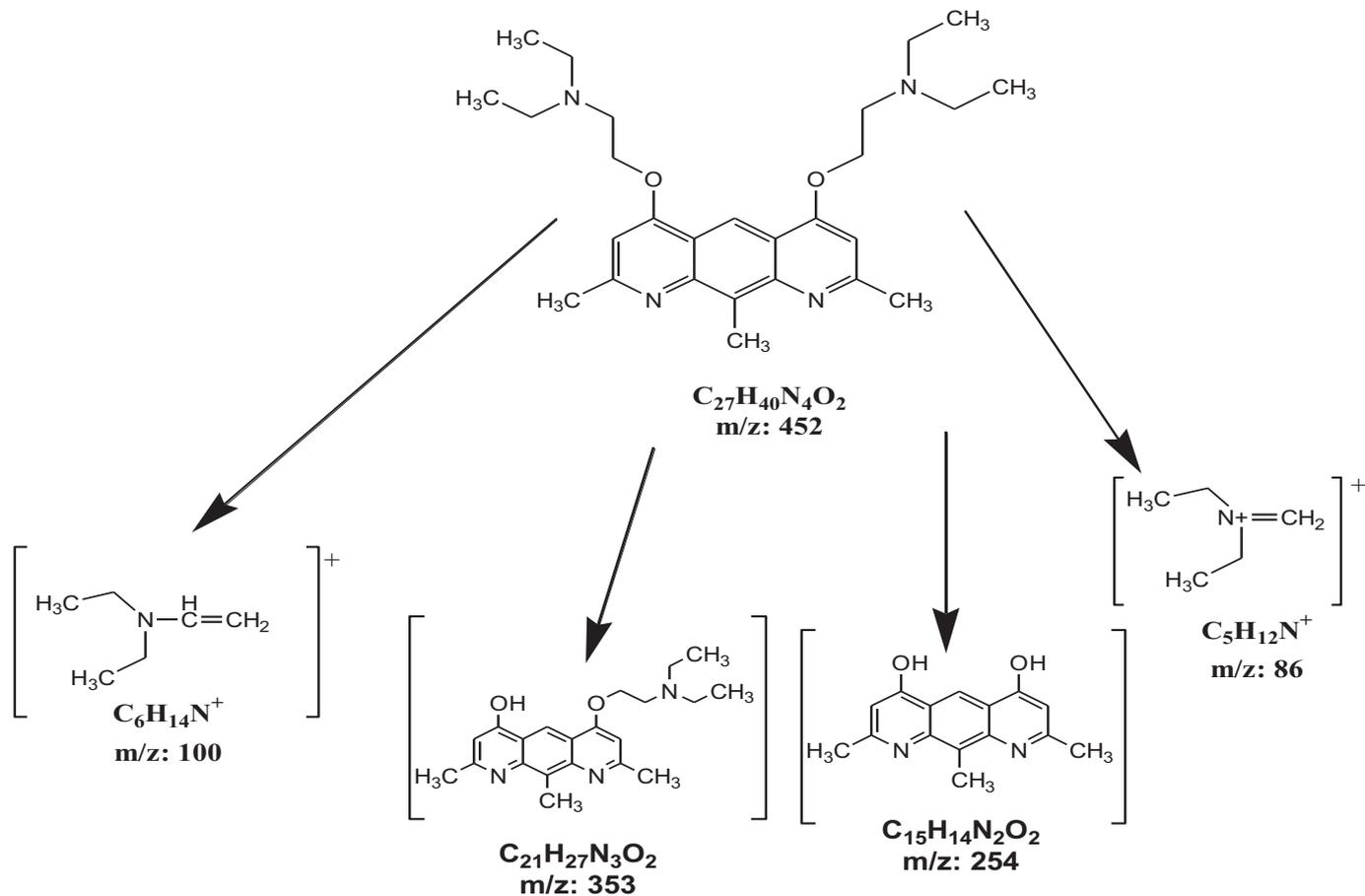


Figure 20 : principaux fragments du BG 63

I.7.6. La spectrométrie Infra Rouge à Transformée de Fourier

L'infrarouge analytique regroupe plusieurs méthodes d'identification et de dosages basés sur l'absorption et la réflexion, par l'échantillon, des radiations électromagnétiques comprises entre 1 et 50 μm . Cette bande spectrale est divisée en proche infrarouge (de 1 à 2,5 μm) et en moyen infrarouge (de 2,5 à 50 μm). Ce dernier est le plus utilisé pour récolter des informations structurales des composés analysés. De ce fait, il est utilisé pour l'identification des molécules organiques dont il permet de garder une empreinte digitale¹⁸³. Les vibrations des liaisons chimiques, spécifiques des groupements chimiques, permettent l'obtention de spectres portant l'information voulue sur la composition des substances chimiques analysées.

I.7.6.1. Matériel et méthode :

L'analyse IRTF du PA a été réalisée avec un spectrophotomètre de type ATI Mattson, Genesis series FTIRTM avec ATD.

Les spectres sont enregistrés à température ambiante, dans les conditions expérimentales suivantes :

- ✎ Domaine spectral : 4000 à 500 cm^{-1}
- ✎ Résolution spectrale : 4 cm^{-1}
- ✎ Nombre d'accumulation de balayage : 30
- ✎ Méthode utilisée : triangle

Le bruit de fond est mesuré avec une coupelle vide, afin qu'il soit automatiquement soustrait du spectre de l'échantillon.

L'échantillon de PA est mélangé avec du KBr, puis placé dans une coupelle pour la mesure. Nous obtenons ainsi un spectre caractéristique du composé, avec des bandes spécifiques correspondant au cycle aromatique, ou à la fonction amine, à titre d'exemple.

I.7.6.2. Résultat et interprétation

Les attributions des bandes infrarouges se font grâce aux tables définies pour chaque groupement spécifique.

La **figure 21** montre le spectre obtenu après analyse du BG 637 par IRTF.

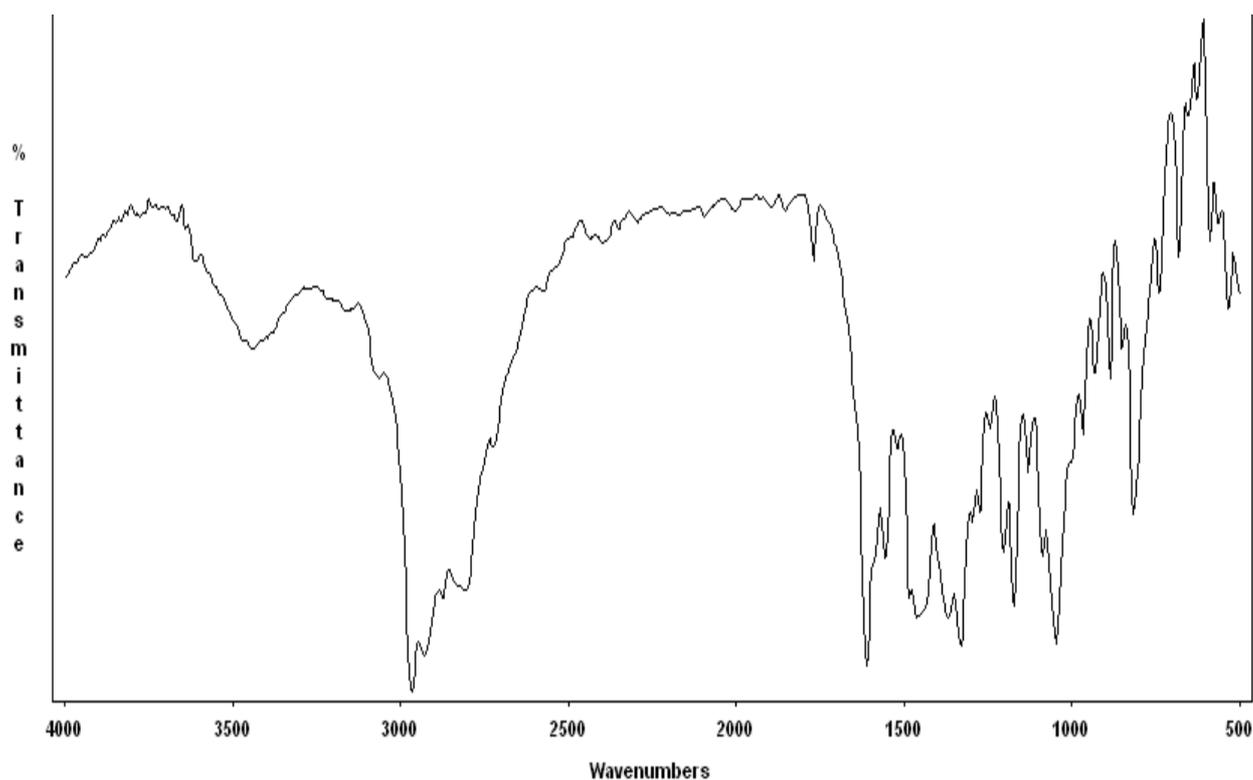


Figure 21 : spectre IRTF du BG 637 entre 4000 et 500 cm^{-1} (résolution de 4 cm^{-1} , 30 balayages)

Les attributions des bandes sont spécifiées dans le **tableau 9** ci-dessous :

Tableau 9 : bandes infra rouges caractéristiques du BG 637

Composé analysé	Fréquences spécifiques en cm^{-1}	Groupements fonctionnels
BG 637	2600 - 3000	$\text{CH}_3\text{-CH}_2$ et CH_2 alkylamine; $\text{CH}_3\text{-CH}$ aromatique
	1625	C=C aromatique
	1300	C-N Amine tertiaire
	1300 – 1200 ; 1200 - 1050	C-O aromatique

I.8. Les impuretés :

Le spectre RMN montre que l'on est en présence d'un seul produit pur, ceci est confirmé par la chromatographie couplée au spectre de masse.

II. Propriétés physiques

II.1. La solubilité :

La solubilité a été étudiée à température ambiante (25°C), dans différents solvants organiques et dans des solutions tampons à différents pH.

II.1.1. Solubilité en fonction des solvants

La mise en solution d'un composé ionique dans un solvant ionisant entraîne une diminution importante de ces forces qui sont divisées par la constante diélectrique ϵ du milieu. L'agitation moléculaire suffit pour détruire l'édifice. Les ions se répartissent alors d'une façon désordonnée¹⁸⁹.

II.1.1.1. Matériel et méthode

Dans des tubes en verre contenant 1 ml de solvant, le produit à dissoudre est rajouté petit à petit avec homogénéisation, jusqu'à saturation. Le produit ne se dissout plus et forme un dépôt au fond du tube.

II.1.1.2. Résultats :

Il s'avère que le BG 637 est très soluble dans les solvants polaires ce qui serait conforme avec sa lipophilie. (Tableau 10)

Tableau 10 : solubilité du BG 637 dans différents solvants

Solvant (1 ml)	Selon la Pharmacopée Européenne	Concentration de saturation (g/ml)
Cétone	Facilement soluble	0,0472
Ethanol absolu	Facilement soluble	0,0676
Toluène	Facilement soluble	0,0792
Chloroforme	Facilement soluble	0,1021
Ether	Très soluble	indéterminée
Méthanol	Très soluble	indéterminée

I.1.2. Solubilité en solution aqueuse fonction du pH**II.1.2.1. Matériel et méthode :**

Les solutions tampons sont préparées selon le mode opératoire de : « **Alexev. V., Analyse Quantitatives. Edition de Moscou, 1980** ». Pour préparer les solutions tampons à pH alcalin, on procède à un mélange de NaOH et d'acide borique, les quantités dépendent du pH désiré. Pour les solutions tampons à pH acide, nous mélangeons l'acide chlorhydrique et le KCl ou l'acide chlorhydrique et du phosphate disodique et de l'acide citrique selon le pH voulu les quantités étant ajustées par rapport à ce dernier (**tableau 11**).

Nous procédons de la même manière que pour les solvants organiques (**voir paragraphe précédent**). Dans des tubes en verre contenant 1 ml de solution tampon, le produit à dissoudre est rajouté petit à petit jusqu'à saturation.

Tableau 11 : Préparation des mélanges de tampons

pH	Méthode de préparation
1	Ajouter à 194 ml de solution 0,1 N d'acide chlorhydrique 0,75 g de KCl et diluer à 200 ml avec de l'eau
3	Mélanger 102,75 ml de solution 0,2 M de phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{XX } 2\text{H}_2\text{O}$) avec 397,25 ml de solution 0,1 M d'acide citrique $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{XX } \text{H}_2\text{O}$
4	Mélanger 192,75 ml de solution 0,2 M de phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{XX } 2\text{H}_2\text{O}$) avec 307,25 ml de solution 0,1 M d'acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{XX } \text{H}_2\text{O}$)
5	Mélanger 257,5 ml de solution 0,2 M de phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{XX } 2\text{H}_2\text{O}$) avec 292,5 ml de solution 0,1 M d'acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{XX } \text{H}_2\text{O}$)
7	Mélanger 411,75 ml de solution 0,2 M de phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{XX } 2\text{H}_2\text{O}$) avec 88,25 ml de solution 0,1 M d'acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{XX } \text{H}_2\text{O}$)
9	Mélanger 106,5 ml de solution 0,1 M de NaOH avec 250 ml de solution 0,1 M d'acide borique
13	Solution 0,1 M de NaOH

II.1.2.2. Résultats :

Les points d'ionisation du BG 637 représentés par les doublets libres des atomes d'azote permettent la fixation des protons et donc la solubilisation du GB 637 dans les milieux acides. Lorsque l'on rajoute le BG 637, qui est de pH basique, dans une solution de pH acide, nous allons avoir une réaction de type : $\text{acide}_1 + \text{base}_1 \leftrightarrow \text{base}_2 + \text{acide}_2$. Le BG 637 est soluble dans les solutions aqueuses à pH acide et neutre. Plus le pH augmente et devient alcalin, plus le BG 637 devient insoluble (**tableau 12**).

Tableau 12 : solubilité du BG 637 selon le pH

pH	Concentration de saturation (g/ml)	Selon la Pharmacopée Européenne
1	0,0261	Très soluble
3	0,0328	Très soluble
4	0,0339	Très soluble
5	0,0571	Très soluble
7	0,0826	Très soluble
9	Insoluble	Insoluble
13	Insoluble	Insoluble

II.1.3. Essai de solubilité dans les solutions pH 1,2 et pH 6,8

L'un des tests réalisés sur le comprimé fini est un test de dissolution. Ce dernier est le plus souvent réalisé dans un milieu aqueux dont le pH est proche le plus possible du pH gastrique ou intestinal. Des solutions à pH 1,2 et pH 6,8 sont réalisées selon la Pharmacopée Européenne. Le BG 637 est ensuite analysé par spectrophotométrie UV selon les conditions décrites dans la section « **analyse spectrale** ».

Les résultats obtenus montrent qu'à pH acide ou neutre, le BG 637 est soluble et peut être détecté en UV à une concentration de 5 mg/L.

Ainsi, nous retrouvons le même pic au maximum d'absorption à 256 nm. Ce qui signifie qu'en milieu acide et neutre, la molécule conserve la même structure et peut donc être identifiée par l'analyse UV.

II.1.4. La granulométrie ou taille de particules :

II.1.4.1. microscopie électronique à balayage (MEB)¹⁹⁰

La microscopie électronique à balayage (MEB) ou ("Scanning Electron Microscopy"), est très proche de la microscopie optique. Elle permet d'observer la topologie des surfaces.

La technique est basée sur le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Différents détecteurs permettent d'analyser ces particules et de reconstruire une image de la surface.

L'observation du BG 637 montre que la poudre est constituée de microcristaux se présentant sous forme d'aiguilles, à la surface lisse, sans relief apparent. La taille de ses particules est variable de 10 μm à 500 μm (**figure 22**) au grossissement 100.

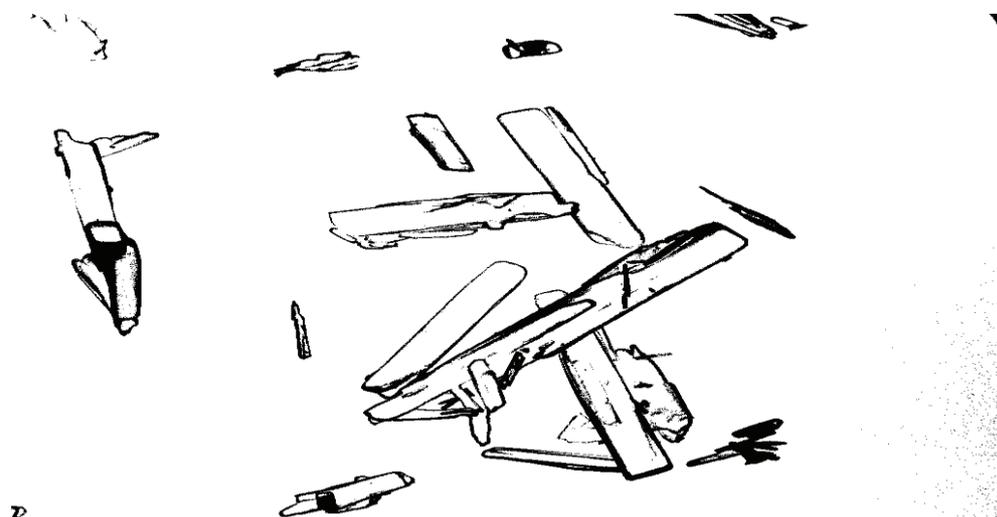


Figure 22 : image par MEB du BG 637.

II.1.4.2. granulométrie laser ^a

La granulométrie laser permet de déterminer la taille des particules et la répartition granulométrique plus finement que la microscopie électronique. Les méthodes d'analyse granulométrique différencient et classent les particules en s'appuyant sur différentes propriétés liées à leur taille. Le type de taille mesuré (diamètre équivalent) dépend de la méthode d'analyse employée.

Cette technique repose sur l'irradiation d'une suspension ou émulsion par un faisceau de lumière cohérente, une partie de l'énergie de cette dernière est absorbée et le reste est diffracté ou diffusé suivant les propriétés du milieu. Si les entités en suspension ont une taille supérieure ou égale à la

longueur d'onde de la lumière irradiante, celle-ci est diffractée. La puissance du rayonnement diffracté est proportionnelle à la surface des particules. Ce type d'analyse permet de travailler sur une large gamme de taille de 0,05 μm à quelques millimètres.

Pour les traitements des données, les objets sont supposés sphériques. Les distributions de taille ainsi obtenues sont pondérées en volume et donnent de l'importance aux plus grosses particules. Le diamètre équivalent en volume (D_v) représente le diamètre d'une sphère de même volume que la particule.

$$V = (\pi / 6) d^3 v$$

Les formes étant très variable, elles sont assimilées à des sphères de volume fixe.

II.1.4.2.1. Matériel et méthode

Les mesures de la taille des particules du principe actif ont été réalisées par voie humide, avec un granulomètre laser de type Mastersizer S, équipé d'une lentille de 300RF, en mode polydispersé. L'échantillon de poudre est mis en suspension dans de l'eau, au niveau de la cellule de mesure. Les particules passent devant la lentille, qui ne détecte que celles de taille comprise entre 0,05 et 880 μm . L'obscurité (qui aide à fixer la concentration de l'échantillon) idéale doit être comprise entre 10-30%.

La mesure est réalisée trois fois de suite, sur le même échantillon afin de valider les résultats obtenus.

II.1.4.2.2. Résultat

L'obscurité est de 12,6%, condition idéale pour effectuer la mesure.

La taille moyenne des particules est de 422,86 μm . Le graphe correspondant à la mesure effectuée est d'allure gaussienne, ce qui traduit une homogénéité de la taille des particules.

La taille des particules varie de 20 μm à une faible fraction supérieure à 880 μm .

Le diamètre médian $D[v, 0,5]$ est la taille des particules à laquelle 50% de l'échantillon a une taille inférieure et 50% de l'échantillon à une taille supérieure à cette taille.

$D[v, 0,5] = 422,86 \mu\text{m}$, d'où 50% de l'échantillon a une taille inférieure à 422,86 μm et 50% de l'échantillon à une taille supérieure à 422,86 μm .

$D[v, 0,1]$ est la taille de particules pour laquelle 10% de l'échantillon se trouve en dessous de cette dimension, $D(V, 0,1) = 167,96 \mu\text{m}$, d'où 10% de l'échantillon se trouve en dessous de 167,96 μm .

$D[v, 0,9]$ est la taille de particules pour laquelle 90% de l'échantillon se trouve en dessous de cette dimension, $D(V, 0,9) = 695,95 \mu\text{m}$, d'où 90% de l'échantillon se trouve en dessous de $695,95 \mu\text{m}$.

$D[4, 3]$ est le diamètre moyen (volume), dans le cas du BG 637, il a une valeur de $426,98 \mu\text{m}$.

Nous obtenons un graphe ayant la même allure à chaque mesure. Les particules de taille supérieure à $880 \mu\text{m}$ ne sont pas détectées.

La courbe des passants, représentée par la courbe qui s'étend sur toute largeur du graphe, indique le pourcentage en dessous d'une certaine taille. Par exemple 50% de l'échantillon mesure moins de $422 \mu\text{m}$, ce qui correspondrait au $D[v, 0,5]$.

II.1.5. Coefficient de partage et coefficient d'ionisation :

L'analyse par le logiciel Pallas de la structure du BG 637 a permis de déterminer le pKa pour les deux fonctions **nitriles (amine III)** à 9,52 pour l'une et à 8,92 pour la deuxième. Quant au Log P, il a été évalué à 4,75. Ces valeurs restent approximatives car elles découlent d'une simple théorie

Suite à la caractérisation du BG 637 du point de vue physico-chimique, il convient de déterminer sa stabilité sous différentes conditions de conservation en se référant aux conditions internationales d'harmonisation (**International Conditions of Harmonization, ICH**)¹⁹¹ qui régissent ces études de stabilité.

II.1.6. Tests de stabilité selon l'ICH

Ces tests de stabilité permettent de déterminer la qualité du produit testé en fonction du temps dans des conditions environnementales de température, d'humidité et de luminosité. On pourra ainsi établir une durée de vie pour le produit testé et les conditions optimales de stockage.

Pour le produit BG 637, ces tests de stabilité permettent de mettre en évidence éventuellement, ses produits de dégradation.

Les produits d'hydrolyse de la molécule sont également testés en fonction du pH, sans oublier les tests de photo stabilité.

Dans le cas où le produit est soumis aux conditions de stockage accélérées, les tests sont effectués à des périodes déterminées, à savoir aux temps : zéro, trois mois et six mois. Si l'étude s'étend sur une année, les tests sont alors effectués à zéro, six, neuf et douze mois.

II.1.6.1. Conditions de stockage :

La durée des tests et les conditions de stockage doivent pouvoir renseigner sur les conditions de stockage et d'expédition du produit sans oublier son utilisation future.

En général, les conditions sont celles décrites dans le tableau ci-dessous :

II.1.6.1.1. A la chaleur et l'humidité :

Elle se fait selon les conditions énoncées ci-dessous :

Etude	Conditions de stockage	Durée minimale de l'étude
Long terme	25°C ± 2°C / 60% RH ± 5% RH ou 30°C ± 2°C / 65% RH ± 5% RH	12 mois
Moyen terme	30°C ± 2°C / 65% RH ± 5% RH	6 mois
Accélééré	40°C ± 2°C / 75% RH ± 5% RH	6 mois

II.1.6.1.2. Au froid (au réfrigérateur) :

Elle se fait selon les conditions suivantes:

Etude	Conditions de stockage	Durée minimale de l'étude
Long terme	5°C ± 3°C	12 mois
Accélééré	25°C ± 2°C/60% RH ± 5% RH	6 mois

Si un changement ou une dégradation du produit sont constatés dans ce cas l'étude de stabilité est reconduite.

II.1.6.1.3. A la lumière :

Ces tests servent à démontrer que le composé testé reste stable sans aucun changement, s'il est soumis au stress de la lumière. La source lumineuse doit conforme être aux normes **ISO 10977** (1993).

Soit le composé est exposé à une lumière émettant dans le visible et l'UV telles que le xénon, soit une lumière blanche fluorescente émettant selon les spécifications **ISO 10977** (1993), ou alors, une lumière proche de l'UV, fluorescente, ayant un spectre d'émission compris entre 320 et 400 nm

avec une émission maximale se situant entre 350 et 370 nm. Le rayonnement de l'émission UV doit être entre 320 à 360 nm et 360 à 400 nm.

L'échantillon doit être exposé à 1,2 millions de Lux /heure et l'énergie UV doit être inférieure à 200 watts/ heures/m². Le composé doit être exposé dans sa totalité.

Après exposition à la lumière, le composé est analysé pour détecter la présence d'éventuels changements.

II.1.6.2. Résultats :

Les études de stabilité du principe actif ont été menées selon les conditions suivantes :

☒ Vieillessement accéléré : le produit est stocké dans une fiole scellée, à 40°C et 75% d'humidité relative, selon les conditions ICH pendant 6 mois.

☒ Vieillessement à long terme : le produit est stocké dans une fiole scellée, à 5°C, selon les conditions ICH pendant 12 mois.

☒ Vieillessement à long terme : à 25°C sans conditions spécifiques d'humidité relative, hors normes ICH.

☒ Vieillessement à la lumière hors normes ICH : selon deux sources lumineuses :

- Le rayonnement solaire
- Une ampoule de 150Watts

L'analyse RMN du principe actif, selon ces différentes conditions de stockage, a montré un spectre identique à celui obtenu lors de l'identification du produit après synthèse organique. Ainsi aucun changement de quelque nature que se soit (dégradation, hydrolyse, changement de la structure chimique ou autre), n'est décelé par cette analyse. Le produit demeure donc inchangé et ce composé est stable dans le temps.

III. Conclusion

Les propriétés chimiques ont confirmé la structure moléculaire du composé (spectre RMN, Spectre de masse, spectre IRTF) d'établir le spectre UV. la pureté du produit étudié, facteur important pour le stockage et la stabilité du composé au cours du temps.

Les propriétés physiques ont permis d'évaluer la granulométrie du principe actif par microscopie électronique et granulométrie laser, la solubilité du produit dans différents solvants et à différents pH, notamment les pH qui nous intéressent le plus, à savoir, le pH 1,2 (gastrique) et pH 6,8 (intestinal). Ce paramètre est important pour les tests de dissolution et pour évaluer le devenir du principe actif dans le tractus gastro-intestinal.

Toutes ces données sont une première étape vers la formulation, la seconde étant définie par l'étude physico-chimique des interactions pouvant se produire entre le principe actif étudié et les excipients qui lui sont associés.

Cette étude permet de choisir les excipients qui seront associés au principe actif en accord avec les données physico-chimiques et de prédire les problèmes d'interactions pouvant se produire entre ces deux types de composants, telles la réaction de Maillard, une dégradation, un changement de structure chimique ou voir même une complexation entre le principe actif et les excipients (de type adsorption).

CHAPITRE IV
**INTERACTIONS PRINCIPE ACTIF/
EXCIPIENTS**

Introduction

Le médicament est devenu, depuis plus d'une décennie, un composant incontournable de notre société. En 1950, seulement cinq molécules d'antibiotiques étaient commercialisées. En 2002 plus de 150 molécules sont disponibles et leur consommation en Europe atteint 10.000 tonnes.

La galénique ou l'art de la formulation a pour but la mise en œuvre du principe actif, porteur de l'activité thérapeutique, avec différents excipients afin d'assurer son administration optimale, de garantir sa stabilité dans le temps, de faciliter la fabrication des médicaments et de moduler sa biodisponibilité, garante de son efficacité.

La qualité d'un médicament ne dépend pas uniquement des caractéristiques du principe actif qu'il contient et du processus de fabrication mais également de tous les autres composants rajoutés, à savoir les excipients.

Si l'on considère la forme galénique finale du point de vue de son poids, on se rend compte qu'il est dû en grande partie aux excipients associés au principe actif, lui-même n'y étant présent qu'en quantité infime, parfois de l'ordre du microgramme.

Pour toutes ces raisons, il nous a semblé nécessaire de mener une étude physico-chimique des interactions pouvant se produire entre notre principe actif, le BG 637, et certains excipients choisis. En effet cette étape est obligatoire pour un développement pharmaceutique afin de constituer le dossier pour l'autorisation de mise sur le marché (AMM).

Le choix de la forme galénique s'est tout naturellement porté sur le comprimé. En effet de par son mode d'administration orale, très facile, de sa longue conservation, entre autre, c'est la forme la plus utilisée par les malades. Ainsi, nous allons étudier les interactions dans le but de formuler un comprimé à libération immédiate.

Dans ce cas, les interactions entre le principe actif et les excipients concernent les classes des lubrifiants, des diluants, des liants et des désintégrant. Chaque classe doit faire l'objet au minimum de deux essais.

En général, les méthodes analytiques mise en œuvre pour l'étude de ces interactions sont la LCHP, la DSC, la spectrométrie en UV et l'IRTF.

Aspects bibliographiques

I. Les excipients :

I.1. Définition

Le mot excipients vient du latin « *excipere* » ce qui signifie « **recevoir** »; et du fait, l'excipient reçoit le principe actif.

De nos jours, plus d'un millier d'excipients sont utilisés en pharmacie galénique, étant aussi bien des molécules simples que des polymères à haut poids moléculaire. Seulement deux cents d'entre eux ont été décrits par la Pharmacopée.

Selon **The National Formulary Admission Policy** de 1994, les excipients sont définis comme étant « **Tout composé autre que la substance active ajouté intentionnellement à la formulation** »¹⁹².

Longtemps considérés comme des composés inertes et inactifs, il s'avère aujourd'hui que les excipients exercent une influence certaine sur le médicament notamment en ce qui concerne sa stabilité, sa biodisponibilité et facilitent le processus de fabrication^{193 194}.

Ce sont des composés chimiques pouvant interagir avec d'autres substances par des groupements fonctionnels exemples les groupements éthyle, alcool, propylène glycole¹⁹³ ..., ce qui peut induire une diminution de l'activité du médicament ou tout autre changement qualitatif¹⁹⁵. De la même manière, nous ne pouvons pas affirmer qu'ils soient inactifs d'un point de vue pharmacologique et toxicologique.

I.2. Classification

Ils jouent plusieurs rôles en galénique. Ils sont le support et le véhicule du principe actif, mais en plus, ce sont des adjuvants qui aident à la libération du principe actif selon la forme galénique choisie¹⁹¹.

Ils sont classés selon leur fonction et apportent au principe actif les qualités qui lui manquent. Souvent un excipient peut réunir plusieurs propriétés à la fois. On distingue:^{176 196}

Les diluants, les désintégrants, les liants, les lubrifiants, les aromatisants, les mouillants, les substances tampons, les colorants, les édulcorants et les conservateurs.

I.2.1. Les diluants : poudres généralement inertes, ils jouent un rôle de remplissage lorsque la quantité de principe actif est insuffisante pour faire un comprimé de taille suffisante. A titre d'exemple citons :

- **Les sucres** : lactose, mannitol, saccharose.
- **Les sels** : phosphate dicalcique, tricalcique, sulfate de calcium, carbonate de calcium, chlorure de sodium.
- **Amidons natifs.**
- **Cellulose microcristalline.**

I.2.2. Les désagrégants ou délitants : ils accélèrent la désintégration du comprimé en fragments et particules, exposant et dispersant ainsi une certaine quantité du principe actif dans le milieu physiologique¹⁸⁹ (eau et suc gastrique). Exemple de l'amidon, de la gélatine. Ils aident donc à la libération du principe actif. Leur dose d'utilisation est de 5 à 20%. Ils agissent selon divers procédés:

☒ **Par gonflement** : ces délitants augmentent de volume au contact de l'eau, permettent la pénétration du liquide et provoquent l'éclatement des comprimés. Sont ainsi utilisés: les amines natives, les amidons modifiés, les celluloses et les gommes.

☒ **Par dissolution ou solubilisation**: C'est une désagrégation de l'extérieur vers l'intérieur par érosion des surfaces du comprimé. Sont concernés par exemple des sucres tels que: le lactose, le glucose et le sorbitol.

☒ **Par réaction chimique**: Provocation d'une effervescence au niveau de l'estomac par les carbonates (bicarbonate de soude) ou l'utilisation d'un couple effervescent (acide citrique ou tartrique + carbonates).

I.2.3. Les lubrifiants : Ils sont ajoutés en phase externe, ils donnent un aspect brillant et non poussiéreux aux comprimés Leur dose d'utilisation est généralement faible : 0,2 à 5%. Ils jouent un rôle sur les propriétés rhéologiques des granulés et sur les opérations de compression:

☒ Ils améliorent la fluidité du grain : c'est à dire qu'ils favorisent l'alimentation régulière de la chambre de compression en améliorant les propriétés rhéologiques du mélange. C'est le pouvoir glissant. C'est le cas de la silice.

✎ Ils diminuent les problèmes de collage au niveau des poinçons de la matrice en diminuant l'adhérence du grain et l'électricité statique de certaines poudres. C'est le pouvoir anti-adhérent antistatique. Exemple du talc.

✎ Ils réduisent la friction entre particules durant la compression et diminuent les frottements (grippage), facilitant l'éjection du comprimé. C'est le pouvoir anti-friction. Exemple du stéarate de magnésium.

Les lubrifiants les plus couramment utilisés sont: le stéarate de magnésium, l'acide stéarique, les dérivés glycéridiques, l'huile de coton hydrogéné, la paraffine solide, le polytétrafluoroéthylène, le talc, l'huile de ricin hydrogénée, le lauryl sulfate de sodium et la silice pure colloïdale.

I.2.4. Les liants ou agglutinants: ils lient entre elles les particules qui ne peuvent l'être sous la seule action de la compression. Certains jouent un rôle au niveau de la compression directe tel que la cellulose microcristalline, et d'autres sont utilisés pour la granulation humide tel que les dérivés vinyliques (PVP). Nous trouvons entre autre les dérivés cellulosiques, les amidons (amidons modifiés, empois d'amidon), les polyéthylène-glycols (PEG), les carraghénates, les dérivés glycéridiques (D - glucose, maltose, sorbitol), les protéines (gélatine) et les gommes.

I.2.5. Les adjuvants divers:

✎ **les mouillants:** compensent les propriétés hydrofuges de certains constituants.

✎ **les substances tampons:** ont pour rôle de protéger les principes actifs contre les variations de pH au cours de la conservation. Exemple, le citrate ou phosphate de calcium.

✎ **les colorants:** améliorent l'aspect du comprimé.

✎ **les aromatisants et les édulcorants:** atténuent les saveurs désagréables.

✎ **les conservateurs:** permettent la conservation du comprimé et donc d'augmenter sa durée de vie en retardant l'oxydation du principe actif et des excipients ainsi que la prolifération microbienne. Ce sont essentiellement des antioxydants et antimicrobiens. Leur usage est limité.

Ainsi les excipients joueraient un rôle non négligeable dans l'administration du principe actif qu'ils facilitent par l'amélioration des caractères organoleptiques (**les aromatisants, les colorants et les édulcorants**). Ils peuvent jouer un rôle au niveau de la solubilité du produit en la modifiant selon le désir du galéniste, ainsi ils permettent d'augmenter le taux de dissolution et de libération d'un principe actif. Ils assurent la protection et la stabilité du principe actif tel que l'oxyde de titane qui est un

opacifiant, assurant la protection des principes actifs photosensibles des rayonnements lumineux (tableau 13).

Tableau 13 : exemples de propriétés améliorées par les excipients selon la forme galénique

Voie d'administration	Propriétés améliorées
Orale	Organoleptiques
Rectale et vaginale	Facilité d'administration
Inhalation	Détermination de la dose administrée avec précision
Transdermique	Administration plus continue
Ophthalmologique	Dissolution et désagrégation
Nasale	Contrôle de la dose
Parentérale	Absorption
Topique	Stabilité

La connaissance des caractéristiques de chaque composant est essentielle en galénique. Durant la formulation, les propriétés des excipients et du principe actif influencent certains paramètres tels la fluidité, la compression, le poids du médicament dans la forme finale.

Les excipients sont désormais considérés non plus comme des composés inertes, mais comme des constituants essentiels de la galénique. En variant leur type, leur quantité et leur qualité, les caractéristiques du médicament seront corrigées et optimisées.

II. Etude des interactions physico-chimiques

II.1. Définition :

Une interaction est une influence réciproque entre deux entités ou deux phénomènes.

Dans le domaine pharmaceutique, une interaction peut avoir lieu entre un principe actif et les excipients qui lui sont associés, entre les excipients eux-mêmes ou entre deux principes actifs associés dans une même formulation.

Ces interactions peuvent être de deux types

✎ **Bénéfiques** : cas de **compatibilité** entre composés,

✎ **Néfastes** : cas d'**incompatibilité** entre composés.

Elles sont le résultat de la formation de liaisons hydrogènes, ions-dipôles, dipôles-dipôles ou d'interactions de Van Der Waals. Elles induisent un changement au niveau des propriétés physico-chimiques et pharmacologiques du principe actif, telles que sa biodisponibilité et sa toxicité.

De nos jours, le choix des excipients et leurs interactions avec le principe actif sont les bases de la formulation des médicaments¹⁹⁷.

Dans le cas des interactions bénéfiques, on observe à titre d'exemple une augmentation de la solubilité, de la dissolution^{198 199 200}, de la stabilité^{201 202} et une augmentation de la quantité de principe actif libéré²⁰³.

Dans les cas d'incompatibilité, nous citerons une altération de l'activité thérapeutique, une augmentation des effets indésirables²⁰⁴ et de la biodisponibilité¹⁹².

II.2. Les incompatibilités chimiques principe actif / excipients

Elles sont de deux types²⁰⁵ :

☞ Les incompatibilités correspondantes à des dégradations intrinsèques du principe actif, sans réaction chimique avec les excipients, mais ces derniers peuvent jouer le rôle de catalyseur et donc les favoriser. Citons à titre d'exemple la réaction d'hydrolyse du principe actif, telle que celle d'un nitrile en amide, d'un ester en acide et alcool, ou la réaction d'oxydation du principe actif telle que celle d'une amine tertiaire en N-oxyde, d'un thiol en disulfure, d'un alcool en cétone ou d'un aldéhyde en acide.

☞ Les incompatibilités qui correspondent à des réactions covalentes entre le principe actif et les excipients qui lui sont associés. L'exemple type est la réaction des amines primaires et secondaires avec les sucres réducteurs, comme le lactose, liée au fait qu'il existe pour ces sucres un équilibre entre la forme cyclisée et la forme ouverte qui présente une fonction carbonyle favorisant ainsi une attaque nucléophile du doublet libre de l'azote

II.3. évaluation des interactions physico-chimiques :

Les interactions pouvant survenir entre un principe actif et les excipients qui lui sont associés peuvent être de deux types :

☞ **Les interactions physiques²⁰⁶** : Les interactions physiques peuvent affecter la vitesse de dissolution. En effet certains composés peuvent adsorber le principe actif à leur surface, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la surface active et donc la mouillabilité et la vitesse de dissolution. A contrario, quand les forces d'attraction sont fortes, la libération du principe actif est alors difficile et

son assimilation est alors modifiée. C'est le cas des excipients lipophiles comme les lubrifiants tel que le stéarate de magnésium, qui réduit la vitesse de dissolution du principe actif après avoir été dispersé sous forme de particules.

☞ **Les interactions chimiques** : peuvent induire une dégradation du principe actif avec formation d'impuretés^{207 208}. Sachant que l'eau est le solvant le plus communément utilisé dans les formes liquides, la réaction la plus fréquente est une réaction d'hydrolyse.

Les molécules d'oxygène en présence d'un catalyseur tel que la lumière, les ions de métaux lourds ou la chaleur, peuvent induire la formation de radicaux libres et des réactions d'oxydoréduction. La photolyse, l'isomérisation et la polymérisation peuvent aussi survenir avec certains types d'excipients générant des impuretés. A titre d'exemple citons les polymorphes des β lactamines telle que l'ampicilline qui peut être la cause de graves réactions d'allergie chez certains patients.

Un mélange de principe actif ionisable et d'un excipient ionisable et soluble induit la formation de composés insolubles résultant des interactions de charges entre les différents composés.

Expérimentations

I. Protocoles

De nombreux plans d'expérience sont utilisés afin de mettre en évidence et d'étudier ces interactions dans les formes galéniques²⁰⁹.

Nous avons choisi de réaliser des mélanges binaires principe actif / excipient, en des proportions les plus proches possible de la formulation finale et de les placer en conditions de stress (lumière, chaleur, obscurité...) afin de favoriser l'apparition des interactions. Par diverses techniques d'analyse, on compare les lots entre eux, ainsi qu'avec les excipients seuls ou le principe actif seul.

I.1. Choix des excipients²¹⁰

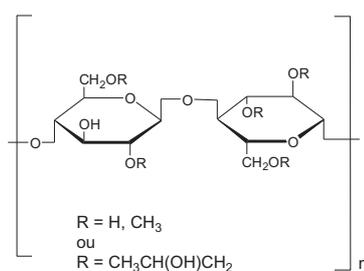
La qualité d'un médicament ne dépend pas uniquement des propriétés physico-chimiques du principe actif, mais également de celles des excipients qui lui sont associés.

Leur choix est dicté par leurs propriétés physico-mécaniques. L'étude des interactions principe actif / excipients avant toute formulation, permet de mettre en évidence aussi bien les incompatibilités entre ces composés comme par exemple celle existant entre le lactose et les amines, que les interactions de synergie. Il faut que les ratios des mélanges soient judicieusement réalisés^{211 212}.

Nous avons choisi les excipients les plus usuellement utilisés en technologie pharmaceutique et entrant dans les formulations sèches. Ces excipients sont : la carboxypropylméthylcellulose, le lactose, le mannitol, le talc, la polyvidone, le glycolate, le stéarate de magnésium, la crospovidone, la croscarmellose sodique.

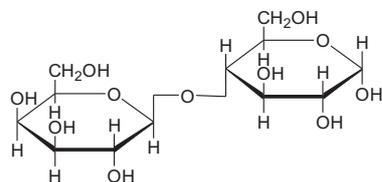
I.1.1. L'hydroxypropylméthylcellulose ou 2-hydroxypropylmethylether cellulose. C'est une poudre blanche, qui peut être légèrement jaune, granuleuse, soluble dans l'eau chaude, sans goût et sans odeur caractéristique. Son poids moléculaire varie de 10 000 à 1500 000.

Cet excipient est utilisé dans les formes orales comme liant ou agent filmogène, selon le mode de formulation.



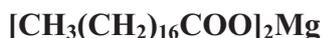
I.1.2. Le mannitol de formule chimique $C_6H_{14}O_6$, il est utilisé en formulation pharmaceutique et dans le domaine de l'alimentaire. Il se présente sous forme d'une poudre cristalline, blanche, inodore, ainsi que sous forme de granules. Il a un goût doux et une sensation de fraîcheur dans la bouche, ce qui explique son utilisation pour les dragées à mâcher. Comme il n'est pas hygroscopique, il peut être utilisé avec des principes actifs sensibles à l'humidité, contrairement au sorbitol. Il peut se présenter sous formes polymorphes α , β et γ . Il est utilisé en tant que diluant dans les formes orales (capsule et comprimé) et en tant que vecteur pour les préparations lyophilisées. Son poids moléculaire est de 182,17.

I.1.3. Le lactose de formule chimique $C_{12}H_{22}O_{11}(\pm H_2O)$. Il est largement utilisé comme diluant et agent de remplissage. Il se présente sous forme de poudre ou de cristaux blancs, inodores avec un goût légèrement sucré. C'est un disaccharide de glucose et galactose, présent naturellement dans le lait à des proportions de 5%. Le lactose utilisé pour la compression, peut se présenter majoritairement sous la forme **α -lactose monohydrate** qui est un monocristal non hygroscopique et stable à l'air, et se présente aussi sous la forme d'agrégats sphériques avec un poids moléculaire de 360,31 et minoritairement sous la forme **anhydre β -lactose**, non hygroscopique, avec un poids moléculaire de 342,30.



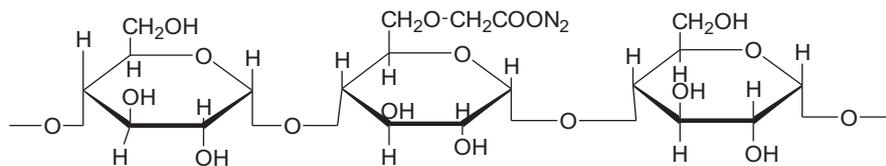
I.1.4. Le stéarate de magnésium sa formule chimique est $C_{36}H_{70}MgO_4$, C'est un mélange en proportions variées de stéarate de magnésium, de palmitate et d'oléate. Il se présente sous forme de poudre fine, blanche, visqueuse, avec une légère odeur et le goût d'acide stéarique. Pratiquement insoluble dans l'eau, l'éthanol et l'éther.

Il existe sous 3 formes pseudopolymorphiques : anhydre, dihydrate et trihydrate. Son poids moléculaire pour une poudre pure est de 591,27. Il est utilisé comme lubrifiant dans les formes orales (capsule et comprimé). Il est également utilisé en cosmétologie et dans l'alimentation.

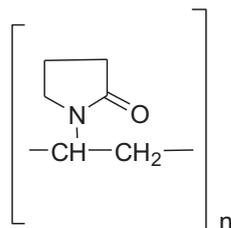


I.1.5. Starch ou Glycolate de formule chimique $(C_6H_{10}O_5)_n$. Son poids moléculaire se situe entre 50 000 et 160 000. Il est constitué d'amylose et d'amylopectine. Il se présente sous forme d'une fine

poudre blanche inodore et sans goût. Il est utilisé en tant que désintégrant dans les formes orales (capsule et comprimé), diluant et liant pour les comprimés.



I.1.6. La povidone : également appelé PVP, c'est un homopolymère du N-vinyle-2-pyrrolidinone de formule chimique $(C_6H_9NO)_n$. Son poids moléculaire est compris entre 2500 et 3000 000. Polymère polyvinylique, se présentant sous forme d'une poudre blanche ou blanc-jaune, sans odeur, hygroscopique, facilement soluble dans l'eau et dans l'alcool. Il est utilisé pour ses propriétés de liants. Ceux choisis pour l'étude sont les PVP K 30 et K 90. Les différentes qualités des polyvidones sont caractérisées par leur viscosité en solutions représentée par une constante K, dépendante de la masse moléculaire.

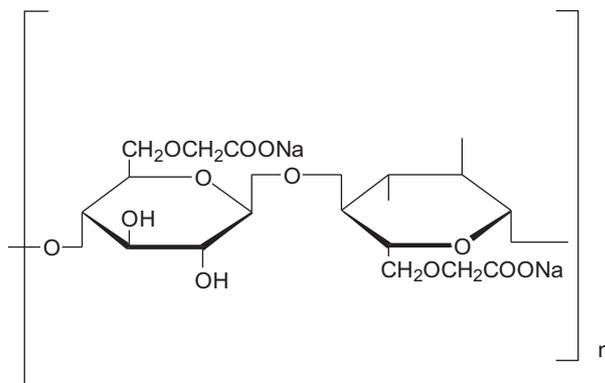


I.1.7. Le talc silicate de magnésium, purifié et hydraté, de formule chimique approximative $Mg_6(Si_2O_5)_4(OH)_4$. Il peut contenir de faibles quantités de silicate d'aluminium et de fer. C'est une poudre blanche, très fine, onctueuse au toucher, insoluble dans l'eau, dans les solvants organiques, les acides et les bases. Le talc est souvent utilisé pour ses propriétés de lubrifiant en cosmétique et en industrie alimentaire. En galénique, il est utilisé en tant que lubrifiant et diluant dans les formes orales.

I.1.8. La crospovidone comme pour la povidone, la crospovidone est un homopolymère du N-vinyle-2-pyrrolidinone, de formule chimique $(C_6H_9NO)_n$. Son poids moléculaire est supérieur à 1000 000. C'est une fine poudre blanche, hygroscopique, sans odeur et sans goût. C'est un désintégrant utilisé en compression directe et en granulation humide.

I.1.9. La croscarmellose sodique (Ac-di-sol®) est un polymère de la carboxyméthylcellulose sodique. Son poids moléculaire varie de 90 000 à 700 000. Elle se présente sous forme d'une poudre

blanche, inodore, insoluble dans l'eau. Elle est aussi bien utilisée en compression directe qu'en granulation humide en tant que désintégrants.



I.2. Les mélanges

Nous avons réalisé des mélanges binaires comportant un excipient et le principe actif retenu.

Avant de procéder, nous devons tenir compte d'un certain nombre de facteurs qui interviennent dans un mélange de poudres.

➤ **La ténuité des composants:** il est fortement recommandé de mélanger des particules de mêmes dimensions pour éviter un démixage rapide.

➤ **La densité des composants:** qui joue un rôle fondamental sur la stabilité du mélange. Avec le temps, les particules les plus lourdes ont tendance à descendre au fond des récipients (**sédimentation**), alors que les plus légères se retrouvent à la surface (**percolation**).

➤ **Les proportions des différents constituants :** l'homogénéité d'un mélange de poudre est plus difficile à obtenir si l'un des composants est présent en faible proportion par rapport aux autres. Or il est indispensable que le constituant en petite quantité soit parfaitement réparti dans toute la masse.

Nous avons ainsi choisi huit excipients, parmi les plus communément utilisés, deux de chaque classe. Les mélanges sont réalisés en introduisant les composants en quantité équivalente dans des tubes à essai. Lors de notre travail, la quantité choisie est de 200 mg par composant, soit un total de 400 mg par mélange étudié. Seize mélanges PA/excipients sont ainsi réalisés. Huit sont stockés à l'obscurité et les huit autres sont exposés à la lumière. Ces derniers sont mélangés pendant 5 à 10 minutes. A la fin du temps de mélange, des échantillons sont prélevés pour être analysés (**tableau 14**). Cette première analyse constitue le temps zéro. Des analyses au cours du temps seront réalisées.

Tableau 14: les excipients choisis pour l'étude des interactions

Excipient	Nom commercial
Hydroxypropylméthyl cellulose	Methocel E15 LV
Talc	néant
Mannitol	Pearlitol DC 400
Crospovidone	Kollidon CL
Lactose	Supertab spray dried
Sodium starch glycolate	primojel
Stéarate de magnésium	néant
polyvinylpladone	PVP K 90
Croscarmellose sodique	Ac-di-sol®

I.3. Analyses des mélanges

Pour évaluer les interactions pouvant se produire entre le principe actif étudié et les excipients qui lui ont été associés, les caractéristiques physico-chimiques préalablement établies aussi bien pour le principe actif que pour les excipients sont alors comparées avec les nouvelles données. Tout changement pourrait être le résultat d'une interaction.

La DSC^{213 214} constitue une des méthodes les plus utilisées pour déterminer si oui ou non des interactions ont lieu, et cela en comparant les données recueillies pour chaque élément seul puis les données des mélanges. L'observation de changements au niveau des spectres DSC pourraient traduire des incompatibilités ou des synergies. La spectrométrie en ultraviolet (UV) et en Infra Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) viendront confirmer ou infirmer les conclusions de la DSC.

Ainsi, les spectres obtenus, pour chaque mélange analysé, seront comparés aux spectres obtenus avec le BG 637 seul.

I.3.1. DSC des mélanges binaires

Dans un premier temps, nous allons étudié les excipients suivants seuls: le **lactose**, la **cellulose microcristalline (Avicel®)**, le **polyvinylpyrrolidone (PVP K 30 et PVP K 90)**, le **croscarmellose**

sodique (Ac-di-sol®), le mannitol, le stéarate de magnésium, l'hydroxypropylméthyl cellulose, le sodium starch (glycolate) et le talc. La vitesse de chauffage reste fixée à 2°C/min.

Seuls les excipients choisis pour la formulation seront présentés dans la figure 24, avec les courbes DSC de chacun de ces composés, enregistrés dans les mêmes conditions. Les résultats sont présentés dans le **tableau 15**.

Le talc présente une très grande stabilité thermique. l'hydroxypropylméthyl cellulose sodique, le sodium starch (glycolate) et PVP K 30 contiennent de l'humidité, mais présentent également une grande stabilité depuis environ 80°C jusqu'à vers 200°C.

Le mannitol se caractérise par sa fusion (Tonset 162,4°C, Tmax 168,7°C, $\Delta H = -144\text{J/g}$). Ce groupe d'excipients n'étant pas retenus pour la formulation, ne sont pas représenté dans le **tableau 15**.

La courbe DSC du lactose montre un pic endothermique correspondant au départ de l'eau de cristallisation à Tmax 144,2°C avec un $\Delta H = -72,0\text{J/g}$, le pic exothermique est dû à la cristallisation avec un Tmax de 169,8°C et $\Delta H < 1\text{J/g}$. Le point de fusion est à 189,4°C, suivi par le phénomène d'oxydation à 224°C (**figure 25A**). On observe au niveau des courbes DSC de la microcristalline cellulose (avicel®), du PVP K30, de l'ac-di-sol® et du stéarate de magnésium, un pic endothermique dû à la perte d'humidité respectivement à Tmax 81,7°C, Tmax 75,6°C, Tmax 70,8°C et Tmax 73,2°C. Par la suite, on observe le phénomène de décomposition respectivement à 270°C, (**fig. 25B**), 175°C (**fig. 25C**), 213°C (**fig. 25D**) et 155°C (**fig. 25E**).

Tableau 15 : données DSC des excipients: températures et valeurs d'enthalpie (Essais réalisés avec le Setaram, température de chauffe 2°C/min)

excipients	Pics caractéristiques
Lactose monohydrate	Pic endothermique (depart de l'eau de cristallisation) : Tonset 136,5°C, Tmax 144,2°C, $\Delta H = -72,0$ J/g Pic exothermique : Tonset 167,0°C, Tmax 169,8°C, $\Delta H = +0,81$ J/g Pic endothermique (fusion) Tonset 189,4°C, Tmax 206,3°C, $\Delta H = -134,6$ J/g Début d'oxydation: 224°C.
Microcristalline cellulose (Avicel®)	Pic endothermique (humidité) Tmax 81,7°C, $\Delta H = -52,9$ J/g. Début d'oxydation: 270°C.
PVP K 30	Pic endothermique (humidité) Tmax 75,6°C, $\Delta H = -161,8$ J/g. Début d'oxydation: 175°C.
Ac-di-sol®	Pic endothermique (humidité) Tmax 70,8°C, $\Delta H = -107,9$ J/g. Début d'oxydation: 213°C.
Stéarate de magnésium	Pic endothermique (humidité) Tmax 73,2°C, $\Delta H = -13,2$ J/g. Pic endothermique Tonset 95,6°C, Tmax 105,3°C, $\Delta H = -13,3$ J/g Début d'oxydation: 155°C.

Selon la littérature, le magnésium stéarate commercialisé est souvent sous forme cristalline hydratée (di ou trihydrate ou bien mélange des deux formes) et peu de forme anhydre^{215 216 217}.

Les molécules d'eau s'évaporent entre 60 et 110°C, se traduisant sur la courbe DSC en un pic endothermique à $T_{\max} 105,3^\circ\text{C}$. Dans notre étude aucun pic n'été observé.

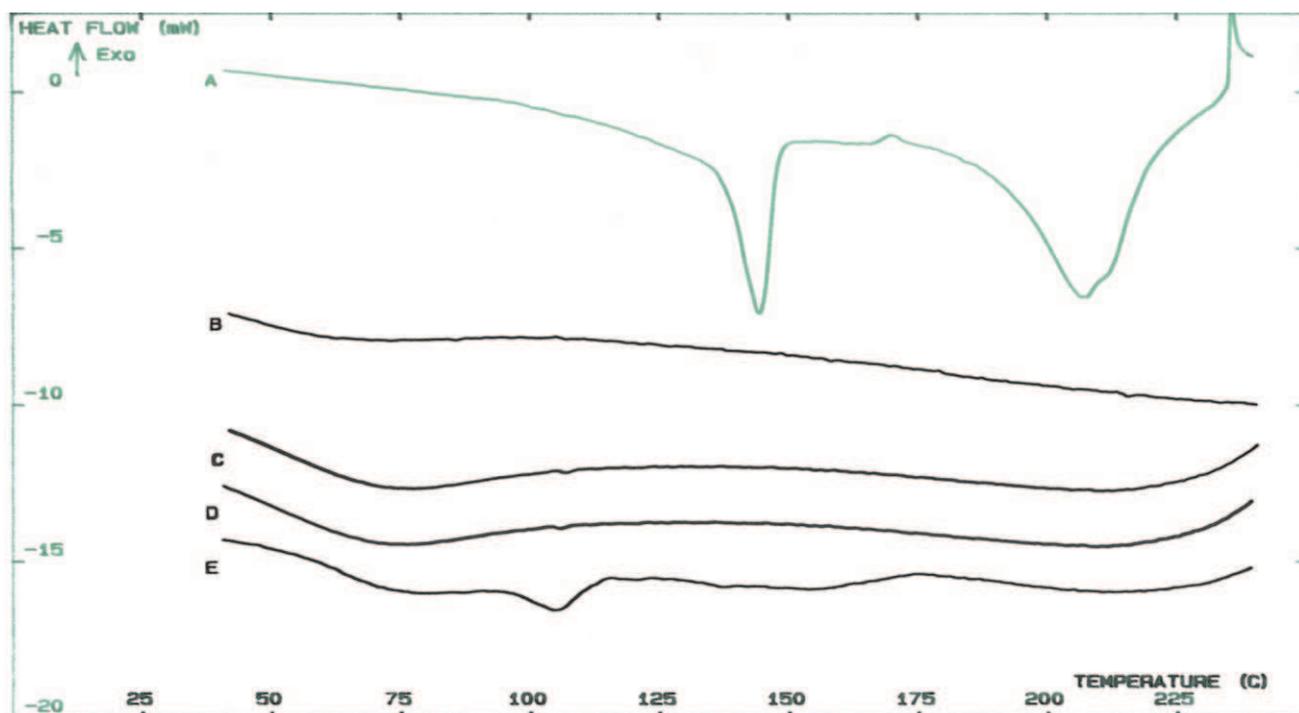


Figure 23 : courbes DSC des excipients sous air statique, vitesse de chauffage 2°C/min ; (A: lactose, B: Avicel[®], C: PVP K30, D: Ac-di-sol[®], E: stéarate de Magnésium).

Par la suite, les mélanges binaires principe actif / excipients sont analysés. Tous les mélanges ont été préparés par une pesée exacte suivie de trituration au mortier pendant 15 minutes. L'intérêt de cette étude sera de vérifier si l'on retrouve le pic de fusion du BG 637 dans les mélanges binaires avec chacun des cinq excipients étudiés, en s'assurant que la courbe DSC obtenue pour chaque mélange corresponde à la juxtaposition théorique des courbes DSC du PA et des excipients.

Les essais de DSC pour les mélanges binaires Excipient/principe actif sont réalisés comme cela a été décrit dans le paragraphe DSC. Les valeurs des enthalpies et des pics d'oxydation sont présentées dans le **tableau 16**.

Tableau 16 : données DSC des mélanges BG 637/ excipients: températures et valeurs d'enthalpie Lactose, Microcristalline cellulose, Polyvinylpyrrolidone PVP K30, Croscarmellose sodique et Stéarate de magnésium (Essais réalisés avec le Setaram, vitesse de chauffe 2°/min)

Mélanges binaires	BG637/ Lactose	BG637/ Avicel®	BG 637/ PVP K30	BG637/ Ac-di-sol	BG637/ Stéarate de Mg
Prise d'essai (mg)	17,6	18,0	26,9	17,0	17,5
Pic Endothermique (humidité) Tmax (°C)	Néant	51,5	70,9	52,7	70,6
Pic Endothermique Tonset (°C)	136,8	136,8	137,5	137,1	137,4
Tmax (°C)	141,7	142,6	142,5	142,4	141,0
ΔH (J/g)	-55,0	-19,1	-17,8	-21,0	-21,0
Pic Endothermique Tonset (°C)	186,8	néant	néant	néant	néant
Tmax (°C)	191,5				
ΔH (J/g)	-16,7				
Pic Exothermique Tonset (°C)	196,0	néant	137,5	néant	néant
Tmax (°C)	198,4		176,0		
ΔH (J/g)	+29,6		+3,00		
début d'oxydation	196	196	220	205	208

Les courbes DCS montrent un pic endothermique entre 50° et 70°C dû à la perte d'humidité exception faite du lactose.

En ce qui concerne le mélange BG637/ lactose, on observe un premier pic endothermique avec T_{max} 141,7°C et $\Delta H = -55,0$ J/g, ce qui correspond à la moyenne de la somme de ΔH BG 637 + ΔH lactose *monohydrate* $(-72,0 -34,5) / 2 = -53,3$ J/g). Le second pic endothermique a son enthalpie plus basse que celle du lactose seul, ce qui est probablement dû à une formation d'eutectique.

Les valeurs d'enthalpies des autres mélanges BG 637/ excipients sont comprises entre -17,8 à -21,0 J/g. elles sont proches de la valeur théorique $\Delta H -17,3$ J/g.

Ainsi, nous pouvons conclure que le BG 637 n'est pas dégradé et sa structure moléculaire ne change pas. Les interactions entre BG 637 et les excipients choisis n'ont pas été observées. Un complément d'étude sera réalisé par l'UV et l'IRTF.

I.3.2. Analyse UV des mélanges binaires

Afin de confirmer ou d'infirmer l'existence d'interaction entre le principe actif et les excipients choisis, une des analyses couplée à la DSC est l'analyse UV. Les spectres obtenus seront comparés avec le spectre du principe actif seul afin d'observer d'éventuels changements qui traduiraient des interactions entre les différents composants des mélanges.

Les échantillons sont prélevés à des temps déterminés afin de mesurer leur évolution dans le temps. Nous allons ainsi analyser les échantillons au temps zéro, une semaine, deux semaines, un mois, deux et trois mois.

Se basant sur la concentration à laquelle le spectre UV du BG 637 a été réalisé, nous procédons au dosage et aux dilutions appropriées des mélanges afin de réaliser l'analyse des mélanges dans les mêmes conditions que celles réalisées précédemment pour le principe actif seul.

Les analyses UV sont réalisées aux temps zéro, une semaine, 1 mois sous les deux conditions de stockage. Les résultats sont montrés ci-dessous :

Temps zéro : pour les seize échantillons, le spectre obtenu est semblable à celui obtenu avec le BG 637 seul.

Sont présentés ci-dessous quelques exemples de spectres au temps zéro seul (**spectre A**), une semaine (**spectre B**), un mois à l'obscurité (**spectre C**), un mois à la lumière (**spectre D**).

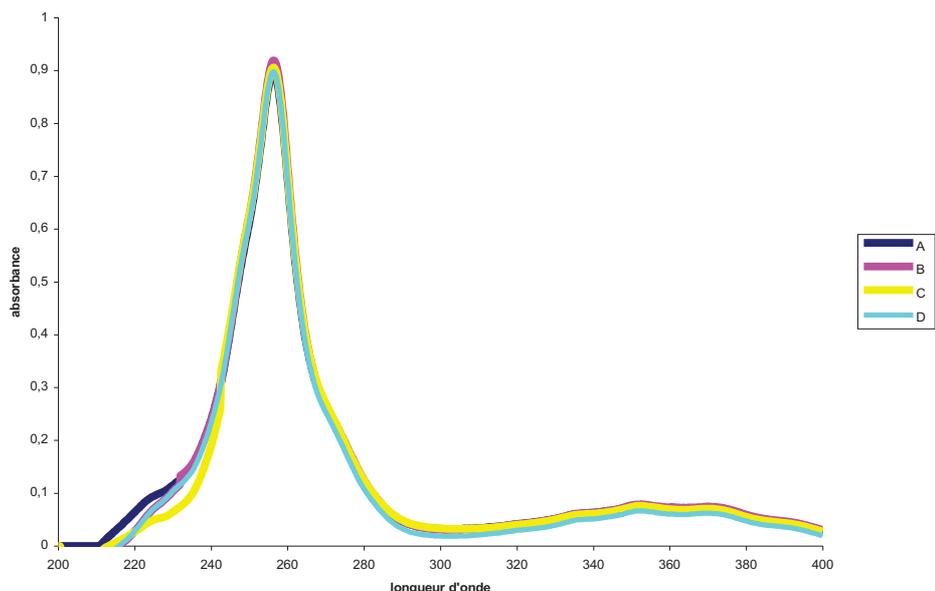


Figure 24 : spectre UV du mélange mannitol / BG 637 au cours du temps (A : temps zéro, B : temps une semaine, C : temps un mois à l'obscurité, D : temps un mois à la lumière)

Ces mélanges sont testés au cours du temps afin de rendre compte de la stabilité du produit et des éventuelles interactions pouvant avoir lieu entre le principe actif et les excipients.

Comme on peut le constater, les spectres UV évoluent selon les conditions de stockage.

A une semaine de stockage, quelles que soient les conditions de stockage (lumière, obscurité), nous observons peu de changement au niveau de l'allure générale des spectres UV en comparaison avec le spectre UV du BG 637 seul (le témoin). Après un mois, les spectres montrent une légère évolution, principalement au niveau de la zone UV située entre 200 et 240 nm. Le pic du principe actif qui correspond au maximum d'absorption, situé à 256 nm est quant à lui toujours présent et à la même absorbance.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces changements :

Première hypothèse : interactions chimiques dues aux charges ou formation d'un complexe¹⁹⁴

Le BG 637 et les différents excipients qui lui ont été associés sont des composés chimiquement chargés. Les excipients de part leurs différents groupements tels que les groupements carbonyles (OH pour le lactose), peuvent induire des interactions entre ces derniers et les groupements amines du BG637, induisant ainsi la formation d'un complexe organique, dont le spectre d'absorption différencierait de celui du BG 637 seul.

Deuxième hypothèse : dégradation du principe actif ²⁰⁶:

Une dégradation du principe actif peut se produire. elle peut être le résultat d'une réaction d'oxydoréduction, due à la présence d'ions d'oxygène dans la formulation, et dont le catalyseur pourrait être la lumière, la chaleur, à titre d'exemple.

Troisième hypothèse : changement de la structure chimique ²⁰⁶:

Par translocation de chaînes latérales du BG 637, qui pourrait se repositionner au niveau des azotes aromatiques du tricycle, à titre d'exemple. Mais le fait que les deux chaînes migrent au même temps vers les azotes n'affecte en rien l'aromaticité du tricycle qui reste alors stable et donc le spectre UV devrait être peu ou pas perturbé.

I.3.3. Discussion

Les excipients représentent en terme de quantité la masse plus importante d'un médicament administré par voie orale et parentérale. Ils sont constitués des groupements susceptibles de réagir, induisant ainsi des transformations chimiques et physiques. Ces dernières peuvent être le résultat d'interactions pouvant avoir lieu entre un principe actif et les excipients qui lui sont associés.

Des trois hypothèses émises, la première semble la plus probable. Le BG 637 n'étant pas dégradé, mais engagé dans des liaisons hydrogènes avec certains excipients.

Ces liaisons se situeraient soit au niveau des amines du tricycle, ce qui induirait un blocage de l'aromaticité et donc un changement au niveau de la bande d'absorption correspondante, soit au niveau de la chaîne latérale, entre l'excipient et le doublet libre de l'azote, induisant les mêmes les changements au niveau des bandes correspondantes. Ces liaisons hydrogènes pourraient être à l'origine des changements observés au niveau des spectres UV.

Plusieurs facteurs pourraient induire ces liaisons, tels que la présence de groupements spécifiques au niveau de certains excipients tels que l'aluminium, le fer, le magnésium, qui en présence d'autres facteurs tels que la lumière, la chaleur, joueraient le rôle de catalyseurs pour de tels changements.

I.3.4. Analyse des mélanges par IRTF ^{184 213}:

Dans l'hypothèse de vérifier ou d'infirmer ces éventuelles interactions entre le principe actif et les excipients, nous avons réalisé des analyses UV et IRTF.

Nous allons procéder de la même manière pour tous les échantillons. Nous avons choisi trois mélanges principe actif / excipients qui vont être analysés, puis les spectres obtenus seront comparés à celui du principe actif seul afin d'observer si les spectres IR sont modifiés.

Les mélanges choisis sont :

BG 637 et le lactose (lumière et obscurité),

BG 637 et le PVP K90 (lumière et obscurité),

BG 637 et le stéarate de magnésium (lumière et obscurité).

Au préalable, le bruit de fond est évalué. Puis chacun des trois excipients choisis est analysé afin de déterminer son propre spectre. L'excipient est de nouveau analysé, mais en tant que bruit de fond, afin d'être soustrait du spectre du mélange. Ainsi, le spectre obtenu ne tiendra compte que de celui du principe actif et les éventuelles interactions ayant pu survenir au niveau de ces mélanges seront alors plus facile à déterminer. Les bandes concernées, et par conséquent, les groupements correspondant seront mieux localisés.

Après avoir réalisé les spectres de chaque excipient et de chaque mélange, ces derniers sont comparés avec le spectre du principe actif seul afin de déterminer s'il est reconnu au niveau des spectres des mélanges. Cette méthode de recouvrement réalisée par le logiciel a donné les recouvrements suivants :

BG 637 et le lactose (lumière) : 747‰

BG 637 et le lactose (obscurité) : 943‰

BG 637 et le PVP K90 (lumière) : 866‰

BG 637 et le PVP K90 (obscurité) : 543‰

BG 637 et le stéarate de magnésium (lumière) : 744‰

BG 637 et le stéarate de magnésium (obscurité) : 762‰

La superposition des spectres du BG 637 seul, du mélange BG 637 / stéarate de magnésium (obscurité) et du mélange BG 637 / stéarate de magnésium (lumière) donne les résultats suivants, **voir Figure 25.**

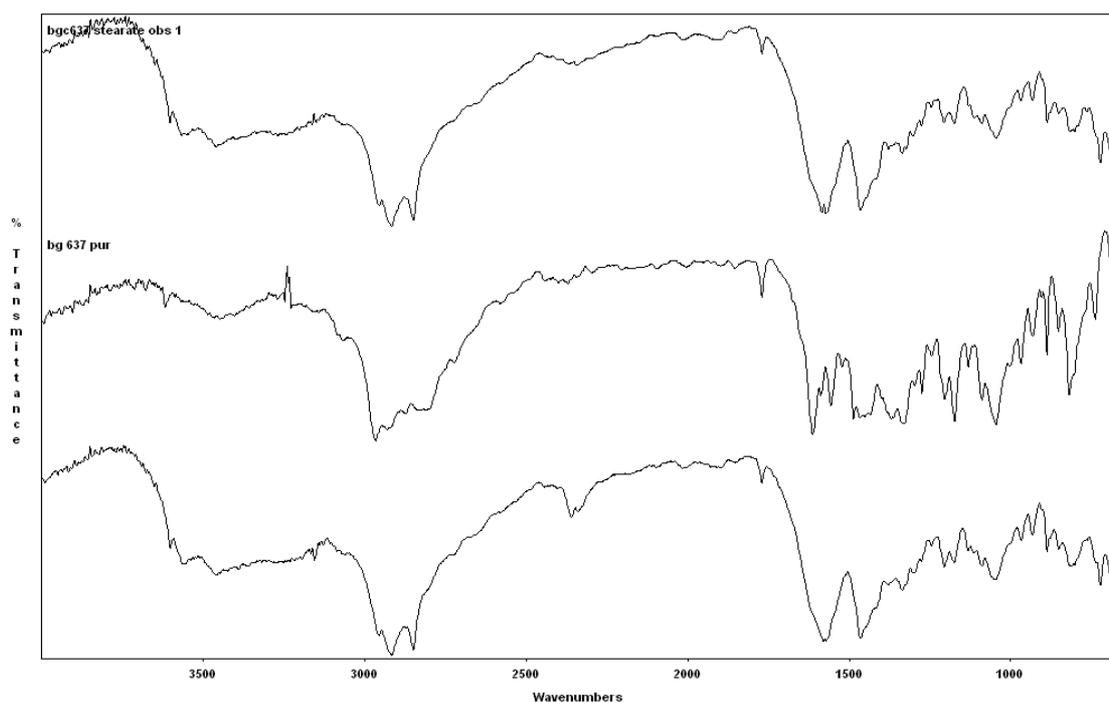


Figure 25 : du haut vers le bas spectres du BG 637 seul et du mélange BG 637 / stéarate de magnésium à l’obscurité et a la lumière sans soustraction su spectres de l’excipient.

La superposition des spectres du BG 637 seul, du mélange BG 637 / lactose (obscurité) et du mélange BG 637 / lactose (lumière) donne les résultats suivants, **voir Figure 26.**

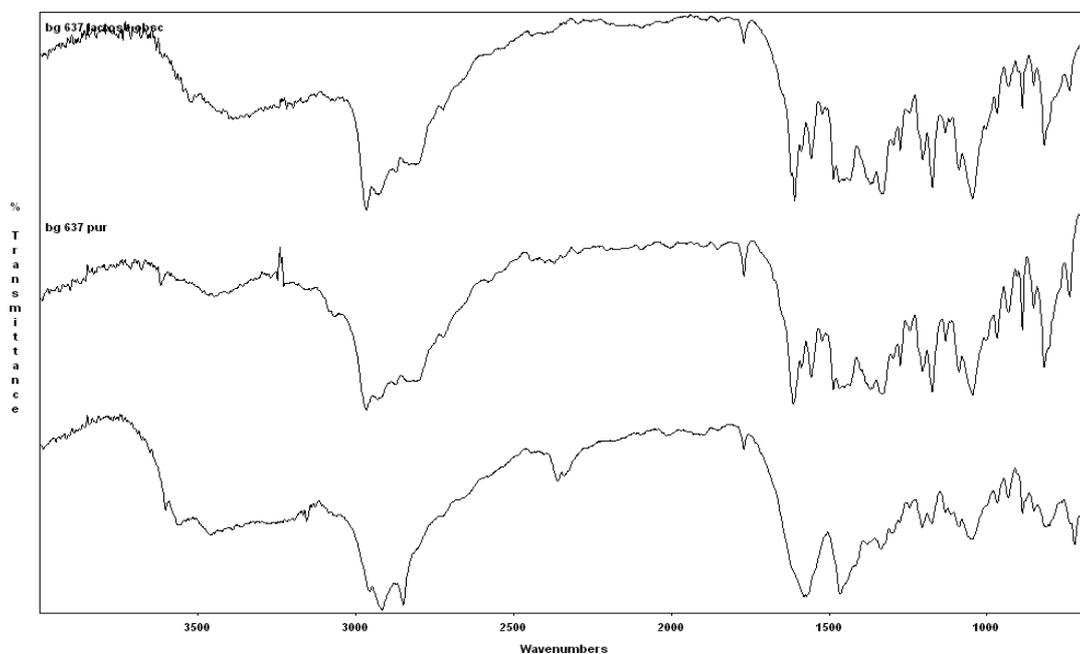


Figure 26 : du haut vers le bas spectres du mélange BG 637 / lactose à la lumière, du BG 637 seul et du mélange BG 637 / lactose à l’obscurité, sans soustraction du spectre de l’excipient.

Dans les deux cas, les trois spectres superposés ne présentent pas de modifications.

I.4. Conclusion

De toutes les hypothèses émises, à savoir possibilité de formation d'un complexe entre le principe actif et les excipients, possibilité d'une dégradation du principe actif ou bien changement de la structure chimique du principe actif, la plus cohérente serait la première de par la présence des groupements réactionnels aussi bien au niveau du principe actif de par ses doublets libres au niveau des atomes d'oxygène et d'azote qu'au niveau des excipients qui présentent pour la plupart d'entre eux des groupement OH susceptibles d'interagir.

La dégradation du principe actif ainsi qu'un changement de sa structure chimique semblent peu probables de fait de la stabilité du composé conférée par l'hétérocycle et son aromaticité.

En effet, les études de stabilités préalablement menées sur le BG 637 ont montré que ce dernier est stable à la lumière, à l'obscurité, au froid, à la chaleur et à l'humidité (section caractéristiques physiques, études de la stabilité). Donc il semble peu probable que le mélange principe actif / excipients ait provoqué une quelconque dégradation du principe actif à l'origine du changement du spectre UV, quelque soient les conditions de stockage.

Ce même facteur pourrait intervenir, en empêchant la formation de nouvelles liaisons et donc d'un complexe, d'autant plus que l'on opère en milieu sec, sans solvant pour jouer le rôle de catalyseur.

La structure chimique stable du principe actif pourrait expliquer le peu de modifications observées au niveau des analyses spectroscopiques.

Les analyses réalisées par DSC, UV et IRTF ne révèlent pas de changements au niveau des spectres, ceci ne nous permet donc pas de conclure à l'existence d'interactions entre le principe actif étudié et les excipients qui lui ont été associés.

Chapitre V

Mise en forme galénique orale :

Le comprimé

Introduction

La Pharmacopée européenne regroupe actuellement ¹⁷⁶:

☒ **Des monographies qui répertorient les formes pharmaceutiques par voies d'administration** : préparations parentérales, auriculaires, nasales, ophtalmiques, rectales, vaginales, pour inhalation et pour irrigation.

☒ **Des monographies pour différentes formes destinées à l'application locale** : liquides pour application cutanée, préparations semi solides pour applications locales, poudres pour applications locales, préparations pharmaceutiques pressurisées, dispositifs transdermiques, mousses pharmaceutiques, tampons médicamenteux et bâtons.

☒ **Des monographies classées par formes pour voie orale** : comprimés, capsules, granulés et liquide pour usage oral.

La formulation des formes pharmaceutiques destinées à être administrées par voie orale doit être adaptée aux phénomènes se déroulant dans le tractus digestif. Il est indispensable de tenir compte des caractéristiques du milieu biologique relatif à l'appareil digestif (pH, enzymes, sels biliaires, forces ioniques).

Les formes à libération rapide ont pour objectif de libérer le principe actif le plus rapidement possible. Le temps de désagrégation sera très court et la vitesse de dissolution élevée. Pour libérer le principe actif, la structure doit être détruite. La solubilité sera plus élevée que l'état de désagrégation sera avancé, et les particules fines.

Les phénomènes de désagrégation et de dissolution seront influencés par de nombreux facteurs, à savoir :

☒ Des facteurs technologiques, en particulier le procédé de fabrication : granulation humide, sèche ou opération de compression directe (force et vitesse de compression, appareillage),

☒ La granulométrie du principe actif,

☒ La nature et la concentration des substances auxiliaires : lubrifiants, diluants, désagrégants, liants,...

☒ La solubilité du principe actif,

☞ Les conditions de stockage.

Les formes orales sont les plus utilisées. Elles permettent d'une part une bonne conservation du principe actif, du fait de leur faible teneur en solvant et présentent une facilité d'utilisation en ambulatoire d'autre part. Les formes orales incluent : les comprimés, les capsules, les poudres, les lyophilisats sans oublier les granulés et les sirops. Les plus couramment utilisés sont les gélules et les comprimés. Ces derniers représentent plus de la moitié des médicaments prescrits par voie orale²¹⁸.

Formulation: Aspect bibliographique

I. Les comprimés

I.1. Définition

Les comprimés sont des préparations solides contenant une unité de prise d'un ou de plusieurs principes actifs. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules¹⁷⁶.

Dans la plupart des cas, ils sont destinés à être absorbés tels quels, par voie orale, néanmoins certains d'entre eux doivent être préalablement dissous dans l'eau (comprimés dispersibles) ou bien séjourner dans la cavité buccale en vue d'y exercer une action locale ou de permettre, entre autre, l'absorption directe du médicament.

I.2. Classification

Du fait de leur mode de fabrication, et de leur utilisation, les comprimés destinés à la voix orale peuvent être classés en différentes catégories :

☞ **Les comprimés non enrobés** : forme pharmaceutique assez récente, elle a remplacé progressivement la forme pilule. Ils comprennent des comprimés à couche unique, résultant d'une seule compression et des comprimés à couches multiples, disposées parallèlement ou de manière concentrique, résultant de compressions successives.

☞ **Les comprimés enrobés** : ils présentent une surface recouverte d'une ou plusieurs couches de mélanges de substances diverses telles que : résines naturelles ou synthétiques, gommes, charges insolubles, inactives, sucres, substances plastifiantes, polyols, cires, matières colorantes autorisées par les autorités compétentes et parfois des aromatisants et principes actifs.

Quand l'épaisseur de l'enrobage est très mince, le comprimé est dit *pelliculé*. Ainsi le comprimé enrobé est composé de deux parties : *le noyau* représenté par le comprimé nu et l'enrobage appelé, en général *couverture*.

☞ **Les comprimés à libération modifiée** : enrobés ou non, ils sont préparés avec des excipients spécifiques ou par des procédés particuliers pouvant ainsi différer la libération du principe actif.

☞ **Les comprimés gastro-résistants** : ce sont des comprimés à libération modifiée destinés à résister à la dégradation enzymatiques par les sucs gastriques et à libérer le ou les principes actifs au niveau de l'intestin, site où le pH est le plus élevé.

✎ **Les comprimés effervescents** qui sont des formes à dissoudre dans l'eau, avec libération de dioxyde de carbone. Ce sont des comprimés non enrobés contenant des substances acides et des carbonates ou bicarbonates.

✎ **Les comprimés solubles** qui sont des systèmes à dissoudre dans l'eau. Ce sont des comprimés non enrobés ou pelliculés.

✎ **Les comprimés dispersibles** sont des comprimés non enrobés ou pelliculés destinés à être dispersés dans de l'eau avant administration en donnant une dispersion homogène.

✎ **Les comprimés oro- dispersibles** qui se désagrègent ou se dissolvent dans la cavité buccale. Ce sont des comprimés non enrobés. Leur formule est telle quelle permet une libération lente et une action locale du et des principes actifs ou une libération et l'absorption du et des principes actifs dans une partie définie de la cavité buccale.

Ces derniers se présentent sous forme de tablettes, de comprimés sublinguaux, de comprimés buccaux, de comprimés muco-adhésifs ou de comprimés à croquer.

La compression transforme un mélange de poudres ou de grains en comprimés. Il est donc important de tenir compte de l'aspect technologique (appareillage, paramètres de compression) mais aussi des propriétés des poudres.

II. Les facteurs influençant la rhéologie des poudres

Le comportement des milieux pulvérulents dépend des caractéristiques physico-chimiques des interfaces, des textures micro et macroscopiques, des conditions ambiantes et de la technologie. Les poudres ont un comportement rhéologique particulier.

II.1. La densité : elle conditionne la vitesse de déplacement dans l'air de particules de forme et de taille définie. Les contraintes externes jouent sur la densité par leurs intensités et par la façon dont elles sont appliquées.

II.2. La structure atomique et la composition chimique : les particules des matériaux solides sont maintenus ensemble par des forces de cohésion internes. La nature de ces forces et leur intensité déterminent la réaction d'un matériau donné aux influences extérieures.

II.3. La porosité : des particules de trop petite taille entraîne un problème de cohésion d'où écoulement nul, alors qu'au contraire plus l'espace interparticulaire est important plus l'écoulement est facilité.

II.4. La morphologie : elle décrit la silhouette de la particule. Elle révèle les fragilités, les enchevêtrements, les surfaces de contact et l'anisotropie. La mésomorphologie précise la rugosité, les défauts, les amorces de fractures et la micromorphologie décèle la géométrie des contacts.

II.5. la taille et la granulométrie : on s'intéresse à la distribution des tailles des particules, c'est-à-dire leur granulométrie. Elle permet de déterminer la forme des particules et de mesurer leur dimension. La granulométrie des poudres influence les phénomènes d'écoulement et de tassement.

II.6. Humidité : la présence de l'eau à la surface des particules a des conséquences importantes sur la rhéologie des poudres. Ainsi il faut tenir compte de l'humidité due à :

☒ L'eau contenue dans le solide et pouvant être éliminée par séchage.

☒ L'eau périphérique constituée par l'eau de cristallisation (inhérente au produit) et l'eau adsorbée (inhérente à l'environnement).

Cette humidité peut selon les cas provoquer une dissolution complète du produit ou sa cristallisation.

II.7. Electricité statique : ce facteur entraîne des problèmes d'adhésion et de cohésion lors de la manipulation des poudres. Il apparaît chaque fois que les particules sont en mouvement et entrent en contact avec d'autres éléments (particules ou support). Il peut y avoir échange ionique en présence d'eau, mais le plus souvent la friction interparticulaire multiplie les contacts et augmente la température, modifiant ainsi l'état de surface induisant un transfert d'électrons lequel est influencé par la nature du matériau et les caractéristiques du milieu ambiant.

II.8. Conditions d'écoulement : on distingue trois type d'écoulement:

☒ **Écoulement en cheminée:** la masse forme un cratère et l'écoulement se fait par le centre et l'alimentation par la périphérie.

☒ **Écoulement en dôme:** la masse forme un dôme, l'écoulement se fait par la périphérie et l'alimentation par le centre

☒ **Écoulement mixte:** c'est une association des deux précédents.

II.9. La surface : une poudre ne réagit avec le milieu extérieur que par sa surface de contact. Cette dernière possède trois caractéristiques propres :

☞ **Sa nature** qui diffère du reste du corps de la particule car des substances sont adsorbées mécaniquement ou physico-chimiquement créant ainsi une couche autour de la particule, influençant le comportement rhéologique.

☞ **Sa texture** qui permet de classer les systèmes particuliers en rugueux ou polis.

☞ **Sa valeur** qui est inversement proportionnelle à la taille des particules : plus la poudre est fine plus la surface du matériau est importante et les contacts nombreux.

III. La fabrication des comprimés

Pour la mise en forme galénique de notre principe actif, nous avons choisi de fabriquer un comprimé selon le procédé le plus simple à mettre en œuvre, c'est-à-dire un comprimé non enrobé.

La poudre à comprimer doit respecter les propriétés physiques et mécaniques de rhéologie détaillées ci-dessus.

La granulométrie et la fluidité du grain doivent pouvoir assurer le remplissage de la chambre de compression de manière rapide et précise et les particules qui constituent le mélange doivent être capables de s'agglutiner et de rester liées les unes aux autres après compression afin d'obtenir un comprimé solide non friable.

Il faut également veiller au bon déroulement de la compression, c'est-à-dire vérifier l'absence de collage (adhésion au poinçon) ou de grippage (strie sur les tranches du comprimé). Il faut également veiller à ce que le délitement du comprimé entre dans les normes de la Pharmacopée européenne.

La grande majorité des principes actifs nécessite la présence d'adjuvants (**chapitre IV section excipients**) et un traitement spécial appelé *la granulation*, pour obtenir les deux qualités essentielles des comprimés à savoir : une cohésion suffisante entre les grains et un délitement facile.

Les différentes possibilités de la fabrication des comprimés peuvent être schématisées dans la **figure 27**.

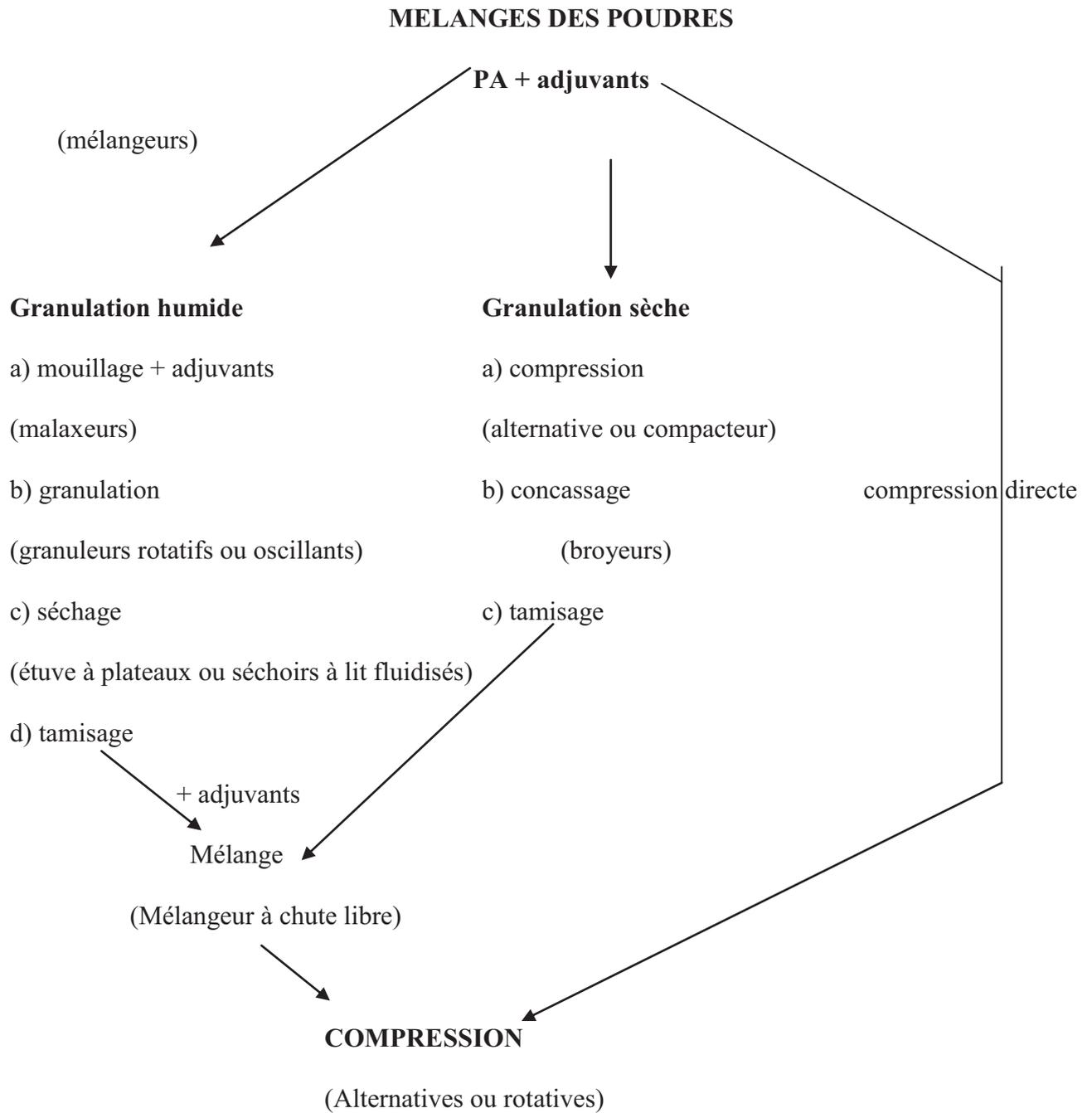


Figure 27 : Fabrication des comprimés : différentes possibilités¹⁷⁶

Ainsi on distingue la granulation et la compression directe.

III.1. La granulation

Le mélange des poudres est la première étape dans la fabrication des comprimés. Le principe actif est mélangé aux différents excipients. La granulation a pour but de modifier la texture du mélange pour augmenter sa densité afin d'assurer un bon écoulement du mélange dans la matrice et de minimiser la présence d'air entre les particules, qui pourrait gêner la compression.

On distingue deux modes de granulation : *humide* et *sèche*. La première se fait en général, en présence d'eau et de liants ou avec des solvants plus volatils et le plus souvent il s'agit de l'alcool plus ou moins dilué. La seconde est utilisée lorsque le principe actif ne supporte ni l'humidité ni le séchage par la chaleur ou qu'il est trop soluble dans l'eau ou l'alcool.

La granulation est une opération complexe. La tendance actuelle est à la compression directe des mélanges de poudres grâce à des adjuvants spéciaux tels que les amidons modifiés, les dérivés de la cellulose...

Tous les constituants doivent être de granulométrie bien déterminée et de densités voisines. Cette méthode est utilisée pour des proportions de principe actif assez faible. C'est la méthode retenue pour notre principe actif vu que les quantités dont nous disposons sont de quelques grammes.

III.2. La compression :

Elle est réalisée grâce à deux types de machines : les machines alternatives les premières à avoir été utilisées et le sont toujours en développement et les machines rotatives qui les ont peu à peu remplacées et sont plus modernes et plus adaptées aux grandes échelles. Pour notre comprimé, nous avons utilisé la machine alternative, de mécanismes simple, plus adapté pour les petites séries et plus facile à nettoyer et à régler entre deux fabrications différentes. Leur mode de fonctionnement est décrit ci-dessous.

Les pièces les plus importantes de cet appareil sont les suivantes^{176 196}:

La matrice : percée d'un trou cylindrique vertical, elle est fixe ;

Deux poinçons mobiles : le poinçon inférieur et le poinçon supérieur dont l'amplitude des déplacements verticaux est parfaitement réglée par un système de disque et de vis.

La trémie et le sabot : qui assurent l'alimentation en grain. La trémie est un réservoir en forme d'entonnoir soumis à des vibrations. Le sabot qui est le prolongement de la trémie, amène entre chaque compression, le grain au-dessus de la chambre de compression.

Les principales phases de la compression sont au nombre de quatre :

- 1) Distribution du mélange ou alimentation de la chambre de compression par simple écoulement du mélange. Les poinçons inférieurs et supérieurs sont immobiles.
- 2) Elimination de l'excès de grain par arasage : le sabot se déplace horizontalement en arasant la poudre au niveau supérieur de la matrice. Il fait office de racleur.
- 3) Compression proprement dite le poinçon inférieur ne bouge pas et le poinçon supérieur descend brutalement et comprime avec force le grain.
- 4) Ejection du comprimé par le poinçon inférieur qui s'élève au niveau supérieur de la matrice.

Le sabot revient à sa place initiale et remplit de nouveau simultanément la chambre de compression pour une nouvelle compression.

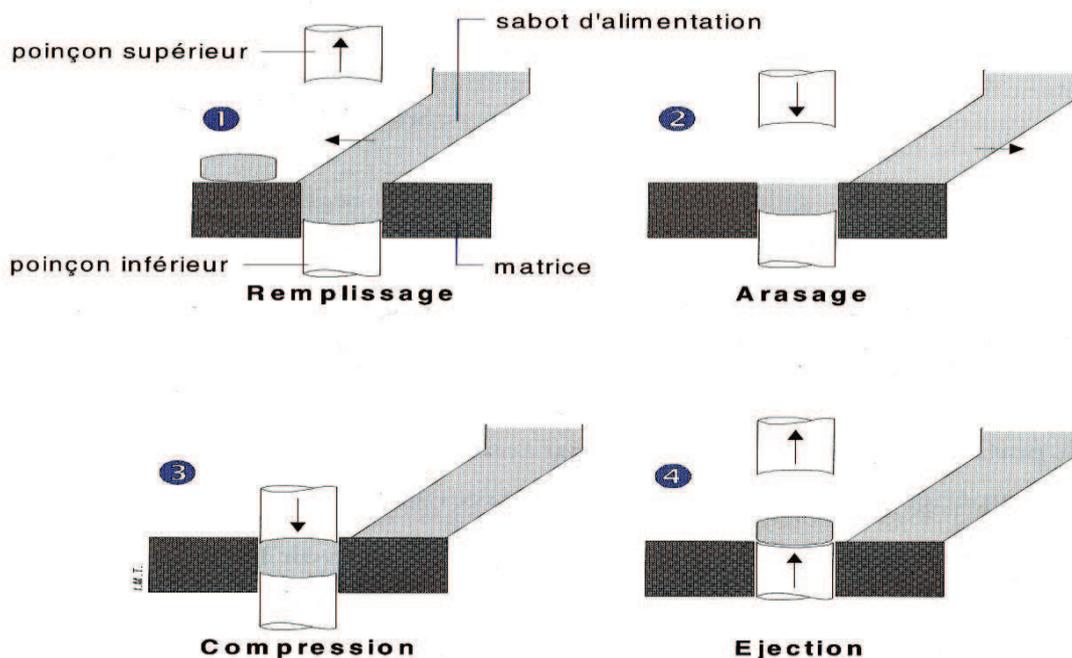
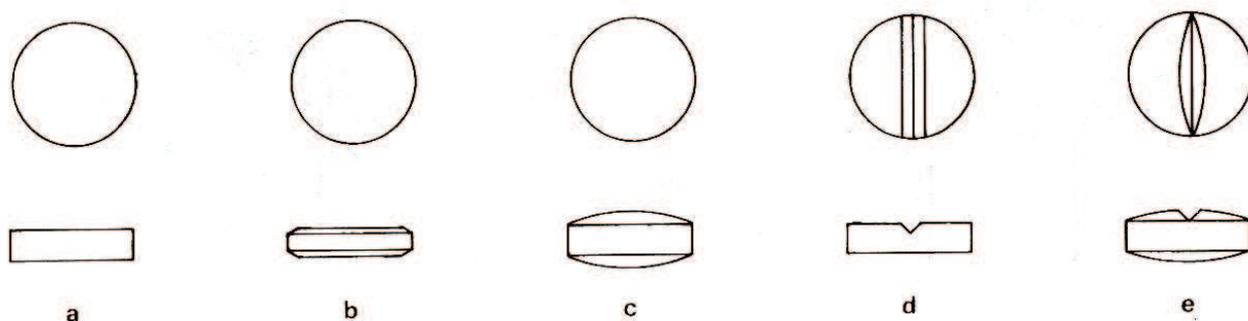


Figure 28 : Schéma principal du cycle de compression sur presse alternative¹⁹⁶

Le réglage de la masse et de la dureté du comprimé se fait au niveau de la machine avant la compression proprement dite. En ajustant le volume de la chambre de compression et en réglant la

position basse du poinçon inférieur, nous arrivons à obtenir une masse donnée. Quant à la dureté, elle est ajustée par réglage de la course du poinçon supérieur : plus il descendra vite et plus le comprimé sera dur.

Les comprimés ainsi obtenus sont dépoussiérés pour être débarrassés des fines particules qui les accompagnent. Le plus souvent ils sont ronds, mais ils peuvent être ovales, carrés,...et selon la forme du poinçon, ils peuvent être plats, bombés, sécables et avec chanfrein (**figure 29**).



Comprimés plat (a) avec chanfrein (b), bombé (c) et sécables (d et e).

Figure 29: Comprimés plat (a), avec chanfrein (b), bombé (c) et sécable (d et e) ¹⁷⁶

Au fur et à mesure que les comprimés sont fabriqués, il est important de vérifier le bon paramétrage de l'appareil et cela en contrôlant la dureté et la masse des comprimés à certains intervalles.

Une fois les comprimés finis, certains tests restent à réaliser, ils concernent le temps de délitement ou de désagrégation, la vitesse de dissolution, le contrôle macroscopique, la dureté (ou résistance à la rupture) et la friabilité.

III.3. Le temps de délitement ou de désagrégation : il se fait sur six comprimés prélevés sur chaque lot de fabrication. Pour l'essai, on place un comprimé puis un disque dans chaque tube. Au bout de 15 min, pour les comprimés nus, il ne doit rester aucun résidu sur les grilles (normes P.E).

III.4. Le test de dissolution : Pour cet essai nous disposons de trois appareils : à palette tournante, à panier, et la méthode de cellule à flux continu. C'est l'appareil à palette tournante que nous avons utilisé pour nos essais (**figure 30**).

L'appareil est constitué par :

☞ Un récipient cylindrique à fond hémisphérique, transparent, muni d'un couvercle évitant ainsi l'évaporation et comportant un orifice central destiné au passage de la tige de l'agitateur, d'autres orifices permettant quant à eux le passage du thermomètre et les prélèvements du liquide. Le récipient à une capacité de 1000 ml.

☞ Un agitateur constitué par une tige verticale à la partie inférieure de laquelle est fixée une palette dont la forme correspond à celle de la portion d'un cercle délimitée par 2 plans parallèles. La partie supérieure de la tige de l'agitateur est reliée à un moteur muni d'un régulateur de vitesse ; la rotation de l'agitateur est uniforme, sans oscillation importante.

☞ Un bain d'eau thermostaté qui permet de maintenir la température du milieu de dissolution à $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant l'essai.

Ce test peut avoir lieu dans de l'eau ou dans un suc digestif artificiel. Il s'agit de reproduire *in vitro*, le phénomène de biodisponibilité du principe actif. Ce qui est observé, d'une manière générale c'est la vitesse à laquelle le principe actif passe en solution quels que soient la forme étudiée.



Figure 30 : appareil de contrôle de dissolution : système à palettes¹⁹⁶

Les temps de délitement pour chaque type de comprimés sont résumés dans le **tableau 17** :

Tableau 17 : temps de délitement des comprimés selon leur type¹⁶⁵

Types de comprimés	Nombres de comprimés requis	Temps de délitement
Comprimés non enrobés	6	moins de 15 minutes
Comprimés enrobés	6	moins de 15 minutes
Comprimés effervescents	1	moins de 5 minutes.
Comprimés solubles	6	moins de 3 minutes
Comprimés dispersibles	2	moins de 3 minutes
Comprimés à gastrorésistants	6	2h à 3h

Tous les tests de désagrégation obéissent aux mêmes conditions, à savoir être réalisés dans un milieu aqueux, les différences se situent au niveau de la température essentiellement et du nombre de comprimés requis pour l'essai.

Ainsi, les comprimés non enrobés doivent être désintégrés en moins de 15 minutes, dans un milieu aqueux à $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, pour satisfaire aux exigences de la Pharmacopée Européenne.

Le test de désagrégation des comprimés enrobés, pelliculés, doit durer 30 minutes, pour le reste ils doivent satisfaire aux mêmes conditions que pour les comprimés non enrobés.

Les comprimés effervescents, quant à eux, sont désagrégés dans l'eau, à température ambiante ($15-25^{\circ}\text{C}$). Les comprimés satisfont à l'essai si chacun des six unités utilisées se désagrège en moins de 5 minutes.

Les comprimés solubles et dispersibles se désagrègent en moins de 3 minutes, dans de l'eau à température ambiante (15° à 25°C).

Les comprimés à libération modifiés tels que les gastro résistants sont soumis au même test que les comprimés non enrobés, sauf que le milieu liquide est constitué d'acide chlorhydrique à 0,1M.

III.5. Le contrôle macroscopique : par un examen visuel, on vérifie l'homogénéité de couleur en surface puis dans la masse du comprimé cassé. Sa surface doit être lisse et brillante. Elle ne doit pas présenter de point de collage ni de stries sur ses bords.

III.6. La dureté ou la résistance à la rupture : l'essai consiste à faire subir au comprimé une pression constante jusqu'à écrasement. L'appareil est constitué de deux mâchoires se faisant face, l'une se déplaçant vers l'autre. La surface plane des mâchoires est perpendiculaire au sens du déplacement. La surface d'écrasement des mâchoires est plane et plus grande que la zone de contact avec le comprimé. L'appareil est étalonné à l'aide d'un système précis à 1 newton près.

III.7. La friabilité : si le comprimé présente une surface endommagée ou bien des signes d'abrasion ou de rupture, survenus sous l'effet de chocs mécaniques ou d'une attrition, le comprimé est dit friable. Pour mesurer ce phénomène, nous disposons d'un appareil à tambour rotatif. A chaque rotation les comprimés sont projetés du centre du tambour vers la paroi extérieure selon une trajectoire curviligne à une vitesse de rotation de 25 tours/min (**figure 31**).

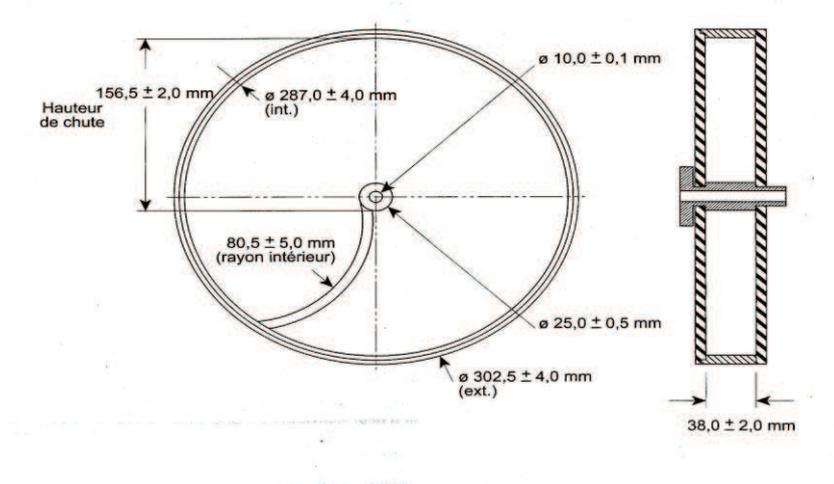


Figure 31: Appareil de détermination de la friabilité des comprimés¹⁶⁵.

Le test est effectué sur 20 comprimés, conformément aux normes Pharmacopée. La perte de masse doit être inférieure à 1%.

Formulation: Aspects techniques

I. Introduction

Les analyses par IRTF et UV de certains mélanges, ont mis en évidence une hétérogénéité de ces derniers. De plus l'étude de la granulométrie du principe actif a révélée que la taille de ses particules variait entre 20µm et supérieure à 800µm.

Les excipients choisis ayant une granulométrie homogène, il convient de réduire la taille des particules du principe actif afin d'obtenir un mélange principe actif / excipients encore plus homogène, condition nécessaire à l'étape de compression.

Après broyage du principe actif dans un broyeur à boulets, nous avons réalisé de nouvelles mesures de granulométrie par voie humide telles qu'elles ont été décrites précédemment (chapitre II, section granulométrie laser). La mesure a été réalisée trois fois.

L'obscurisation est de 19,1%, condition idéale pour effectuer la mesure.

$D[v, 0,5] = 208,78 \mu\text{m}$, d'où 50% de l'échantillon a une taille inférieure à 208,78 µm et 50% de l'échantillon à une taille supérieure à 208,78 µm.

Nous observons, après broyage, une réduction de la taille des particules du principe actif de 50% environ. La taille moyenne des particules ($D[v, 0,5]$ était avant broyage de 422,86µm est devient après broyage égale à 208,78 µm.

$D[v, 0,1]$ est la taille de particules pour laquelle 10% de l'échantillon se trouve en dessous de cette dimension, $D(V, 0,1) = 31,81 \mu\text{m}$, d'où 10% de l'échantillon se trouve en dessous de 31,81 µm.

$D[v, 0,9]$ est la taille de particules pour laquelle 90% de l'échantillon se trouve en dessous de cette dimension, $D(V, 0,9) = 542,89 \mu\text{m}$, d'où 90% de l'échantillon se trouve en dessous de 542,89 µm.

$D[4, 3]$ est le diamètre moyen (volume), dans le cas du BG 637, il a une valeur de = 251,80 µm.

Les particules du BG 637 ont bien été affinées de manière homogène. les particules comprises entre 1,0 et 10,00 µm ont ainsi pu être détectées.

Après l'étude du BG 637 nous avons choisi une forme orale, un comprimé nu. Au vu de la faible quantité de principe actif à notre disposition, nous allons dans un premier temps tester la formule choisie en réalisant un placebo afin de vérifier la faisabilité du comprimé pour une faible quantité de principe actif.

I.1. Rappel

La majeure partie d'un comprimé est constituée par les excipients lesquels jouent un rôle déterminant dans la libération du principe actif dans le milieu biologique. Nous rappelons leurs principales classes.

➤ **Les désagrégeants:** ont pour fonction d'amener l'eau à l'intérieur du comprimés et de provoquer le relâchement des forces de cohésion.

➤ **Les diluants:** ont un rôle de remplissage lorsque la quantité de principe actif est insuffisante pour concevoir un comprimé de taille suffisante. Leur nature doit être examiné d'autant plus que le comprimé est faiblement dosé. Les diluants hydrosolubles ont l'avantage de favoriser l'hydrophilie de la préparation.

➤ **Les liants:** ils ont pour rôle de lier entre elles les particules qui ne peuvent l'être sous la seule action de la compression. Leur incidence sur la biodisponibilité est difficile à déterminer, mais des d'aggrégats ralentissent souvent la dissolution à des concentrations élevées. Dans certains cas, les liants permettent de compenser une mauvaise mouillabilité.

➤ **Les lubrifiants:** ils donnent un aspect brillant et non poussiéreux aux comprimés, souvent hydrophobes, ils peuvent freiner le processus de dissolution en formant un film hydrofuge autour des particules du principe actif.

I.2. Formulation du placebo

Nous choisissons de procéder par compression directe. Les excipients de la formule sont alors déterminer en fonction de ce procédé. Pour un comprimé de 100 mg, la formule choisie est la suivante :

➤ Cellulose microcristalline (Avicel [®] PH 102)	désintégrant	30%
➤ Lactose (supertab [®] Spraydried)	diluant	60%
➤ Croscarmellose sodique (Acdisol [®])	désintégrant	4%
➤ Polyvinylplasdone (PVPK30 [®])	liant	5%
➤ Stéarate de magnésium	lubrifiant	1%

tous les excipients sont passés au tamis afin d'éliminer d'éventuels amas de poudre et d'obtenir un mélange homogène. Par la suite, ils sont mélangés dans un mélangeur simple type turbula, pendant 5 minutes environ.

Dans le cas des milieux pulvérulents, on peut, en fonction de la contrainte de compression, observer trois phénomènes : Ecoulement, tassement et cohésion.

Avant de procéder à la compression, il est nécessaire de vérifier ces derniers.

I.2.1. Ecoulement

Le temps d'écoulement du mélange doit être évolué afin de déterminer l'aptitude du mélange à s'écouler verticalement.

La coulabilité est la conséquence de trop nombreuses propriétés, elle est évaluée à travers ses manifestations principales : la facilité avec laquelle la poudre se met en mouvement et la vitesse à laquelle se poursuit l'écoulement, une fois qu'il est amorcé. L'aptitude à l'écoulement est exprimée en seconde et dixième de secondes pour 100g. A travers un entonnoir normalisé, on laisse le mélange s'écouler. Nous observons un écoulement en cheminée. Si le temps t est inférieur à 10 secondes, l'écoulement n'est pas optimal et des irrégularités de répartition sont observées au niveau de la matrice, pouvant entraîner des variations de masse des comprimés.

Pour le cas du mélange placebo, le temps d'écoulement mesuré selon la méthode décrite ci-dessus est égal à 5 secondes. Nous pouvons en déduire après avoir répété cette mesure trois fois, que le mélange s'écoule bien et donc que la répartition dans la matrice sera régulière.

I.2.2. Tassement ou volume apparent :

Cette mesure permet de déterminer les volumes apparents avant et après tassement, l'aptitude au tassement, ainsi que les masses volumiques apparents. On dispose d'un appareil de tassement appelé voluménomètre de tassement (250 chutes/min. d'une hauteur de 3 mm), d'une éprouvette graduée de 250 ml et de 100g d'échantillon. La méthodologie est la suivante :

On mesure le volume apparent avant le tassement V_0 , puis le volume de tassement après 10 coups noté V_{10} . On effectue ensuite 490 coups supplémentaires pour arriver à 500 coups de tassement et le nouveau volume obtenu V_{500} est noté.

La différence $V_{10}-V_{500}$ est un marqueur de la capacité d'écoulement du produit pulvérulent. Celui-ci sera d'autant meilleur que la différence sera faible.

Idéalement l'aptitude au tassement c'est-à-dire le $V_{10}-V_{500}$ doit être inférieur à 20 ml. Si la valeur est trop importante, il faudra densifier la poudre en changeant la qualité des excipients ou en effectuant une granulation (humide ou sèche).

Avant tassement, le mélange placebo a un volume de 145 ml, après 10 coups de tassement on obtient un volume de 166 ml. On complète à 500 coups de tassement puis on fait la différence.

$$V_0 = 145 \text{ ml}$$

$$V_{10} = 166 \text{ ml}$$

$$V_{500} = 147 \text{ ml}$$

$$V_{10} - V_{500} = 19 \text{ ml}$$

La valeur obtenue est dans les normes, nous pouvons considérer que le tassement est bon.

Pour réaliser le comprimé, nous utiliserons les poinçons de taille D5P, ce sont des poinçons plats de 5 mm de diamètre. Nous avons convenu d'un poids idéal de 65 mg pour cette taille de poinçon avec la formule mise en œuvre.

Les comprimés placebo obtenus sont plats avec un bel aspect lubrifié. Les contrôles de routine sont alors effectués à savoir :

- ☒ le temps de désagrégation,
- ☒ La dureté,
- ☒ L'uniformité de masse,
- ☒ La friabilité.

Les résultats obtenus sont conformes aux normes de la Pharmacopée.

II. Formulation du comprimé avec le principe actif

La formule du placebo nous ayant permis d'obtenir des caractéristiques rhéologiques requises, nous réalisons la même formule en incorporant le P A. La quantité de P A rajoutée est compensée par la quantité du lactose (diluante). La formule mise en œuvre est la suivante :

II.1. premier essai : Formule 1

La formule est la suivante :

Tableau 18 : Les différents composants du comprimé

Composants	Fonction	Pourcentage (%)	Poids (mg)
Principe actif	BG637	7,7	5,0 mg
Lactose	diluant	53,3	34,65 mg
Avicel [®]	désintégrant	30,0	19,50 mg
Ac-di-sol [®]	désintégrant	3,0	1,95 mg
PVPK30	liant	5,0	3,25 mg
Stéarate de magnésium	lubrifiant	1,0	0,65 mg

Nous réalisons des comprimés de 65 mg théoriques et la compression se fait sur machine alternative de type Frogerais OA.

La taille du lot est de 50 g (**tableau 19**) car nous disposons d'une quantité de P A très limitée. Les tests rhéologiques ont été réalisés et sont conformes aux spécificités requises par la Pharmacopée européenne.

Tableau 19 : poids en gramme des différents composants du comprimé pour un poids total de 50g.

produits	composants	gramme
PA	BG 637	3,85
diluant	Lactose	26,65
désintégrant	Avicel	15
désintégrant	Acdisol	1,5
liant	PVP K30	2,5
lubrifiant	Stéarate de magnésium	0,5

Une fois le comprimé fabriqué, les contrôles pharmacotechniques sont alors effectués.

II.1.1. Uniformité de masse des comprimés

Vingt comprimés sont pesés individuellement, puis la moyenne des poids est calculée. Selon la Pharmacopée Européenne, pour un comprimé de poids égal ou inférieur à 80 mg, la masse individuelle de 2 au plus des 20 unités ne peut s'écarter de la masse moyenne d'un pourcentage plus élevé que 10 %.

Masse en mg	des comprimés testés	Masse en mg	des comprimés testés
64	63	62	62
61	63	64	63
62	62	62	62
64	64	62	64
64	64	62	64

La moyenne des masses obtenue est égale à 62,9 mg. Les comprimés sont conformes à la Pharmacopée Européenne, à savoir, l'écart de deux comprimés par rapport à la moyenne est inférieur à 10 %¹⁶⁵.

II.1.2. Résistance à la rupture :

Cet essai est destiné à déterminer, dans des conditions définies, la résistance à la rupture des comprimés, en mesurant la force nécessaire pour provoquer leur rupture par écrasement. On note au moment de la rupture, la force exercée à un newton près. L'appareil utilisé est le VK 200 Vanderkamp tablet hardness tester.

La mesure est effectuée sur 10 comprimés. Les comprimés sont placés individuellement entre chaque mâchoire, puis la mesure est effectuée et la force exercée est notée en newton.

Dureté des comprimés	testés en Newton
32	31
38	33
37	28
35	31
31	31

VI.1.3. Friabilité des comprimés non enrobés

Vingt comprimés sont prélevés. Ils sont dépoussiérés puis pesés de manière précise. Ils sont ensuite placés dans le tambour. Le test est effectué sur l'appareil ERWEKA TAR, effectuant 20-40 tours/ min. L'appareil est réglé pour effectuer 100 rotations. Les comprimés sont récupérés dépoussiérés de nouveau et repesés, à condition qu'aucun comprimé ne présente de fêlure, de cassure, ou de fissure. En général l'essai est effectué sans répétition, sauf en cas de résultat ambiguë ou d'une perte de masse supérieure à 1 %.

Masse avant le test : 1.259g

Masse après le test : 1.254g

Perte de masse en % : 0,40 %

La perte de masse est inférieure à 1 %. Les comprimés sont conformes aux normes de la Pharmacopée Européenne .

II.1.4. Désagrégation des comprimés

L'appareil utilisé est le SOTAX DT 3, CH-4008 Basel, tel qu'il est décrit plus haut. Six comprimés placés au niveau des 6 tubes cylindriques à raison d'un comprimé par tube, sont plongés dans un bain marie à $37,5\text{ °C} \pm 0,5\text{°C}$. A partir du moment où les comprimés sont plongés dans le bain marie et que les tubes commencent leur mouvement de va et vient, le temps est chronométré jusqu'à la désagrégation complète des comprimés. Le temps indiqué par le Pharmacopée Européenne doit être inférieur ou égale à 15 minutes.

Le temps de désagrégation des 6 comprimés testés est inférieur à 1 minute. Le délitement est beaucoup trop rapide. Le test de dissolution ne sera pas entrepris dans ce cas là, car il ne nous permettra pas d'évaluer la libération du P A au cours du temps.

II.1.5. Conclusion

Nous décidons de changer la formule 1 afin d'augmenter le temps de désagréation tout en veillant à rester conforme aux normes de la Pharmacopée. Cela nous permettra de suivre la libération du principe actif au cours des tests de dissolution.

II.2. deuxième essai : Formule 2

La formule 1 a été reprise en changeant la proportion du liant afin d'augmenter la cohésion des grains lors de la compression et peut aussi compenser une faible mouillabilité du comprimé et celle du lubrifiant qui par ses propriétés hydrophobes va augmenter le temps de délitement.

La quantité du PVP K30 (liant) est doublée par rapport à celle de la formule 1 et celle du stéarate de magnésium (lubrifiant) est augmentée de la moitié. La proportion du principe actif, quant à elle, ne change pas et reste toujours de 5 mg par comprimé et le poids finale du comprimé est ramené à 68,56 mg.

Nous procédons de la même façon que pour la formule 1 et une fois la compression finie, nous réalisons les mêmes tests.

II.2.1. Uniformité de masse des comprimés

Comme pour la formule 1, vingt comprimés sont pesés individuellement puis la moyenne des poids est calculée.

Masse en mg	des comprimés testés	Masse en mg	des comprimés testés
69	67	66	68
67	69	68	66
67	69	69	67
69	68	65	66
70	68	68	68

La moyenne des masses obtenue est égale à 67,7 mg et l'écart type est de 1,06 %. Les comprimés sont conformes à la Pharmacopée Européenne, l'écart de deux comprimés par rapport à la moyenne est inférieur à 10 %.

II.2.2. Résistance à la rupture

Pareillement, la mesure est effectuée sur 10 comprimés et la force exercée est notée en newton.

Dureté des comprimés testés en Newton	
49	48
48	47
49	44
53	49
40	44

II.2.3. Friabilité des comprimés non enrobés

Masse avant le test : 1.299g

Masse après le test : 1.296g

Perte de masse en % : 0,23 %

La perte de masse est inférieure à 1 %. Les comprimés sont conformes aux normes de la Pharmacopée Européenne.

II.2.4. Désagrégation des comprimés

Le temps de désagrégation des six comprimés testés est compris entre 9 et 10 minutes. Le temps de délitement est assez long pour permettre de réaliser le test de dissolution sur ces comprimés.

II.2.5. Test de dissolution

Cet essai permet de déterminer la vitesse de dissolution du principe actif contenu dans le comprimé, dans des conditions proches du corps humain. L'appareil est relié à un spectrophotomètre qui permettra l'analyse UV du comprimé dans le milieu de dissolution. Ce dernier est à pH 1,2 (ce pH simule in vitro le milieu gastrique).

L'appareil de dissolution utilisé est le Distek dissolution system 2100A. Le spectrophotomètre est le même que celui utilisé pour l'analyse UV du BG 637, à savoir UV-2401 PC Shimadzu, UV-Vis recording spectrophotometer.

Le test est réalisé sur une durée de deux heures. L'appareil est programmé pour effectuer des mesures UV toutes les deux minutes trente sur les six cuves.

Les six récipients cylindriques sont remplis avec 1L de milieu de dissolution à pH 1,2. La température du milieu aqueux est de $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Une fois l'appareil paramétré, le blanc est réalisé afin d'éliminer toute interférence éventuelle avec les mesures suivantes.

Avant d'être introduits dans le milieu de dissolution, les six comprimés sont pesés, puis l'appareil commence ses mesures selon la programmation antérieure. Nous obtenons ainsi six courbes de dissolution, correspondant chacune à un comprimé (**figure 32**).

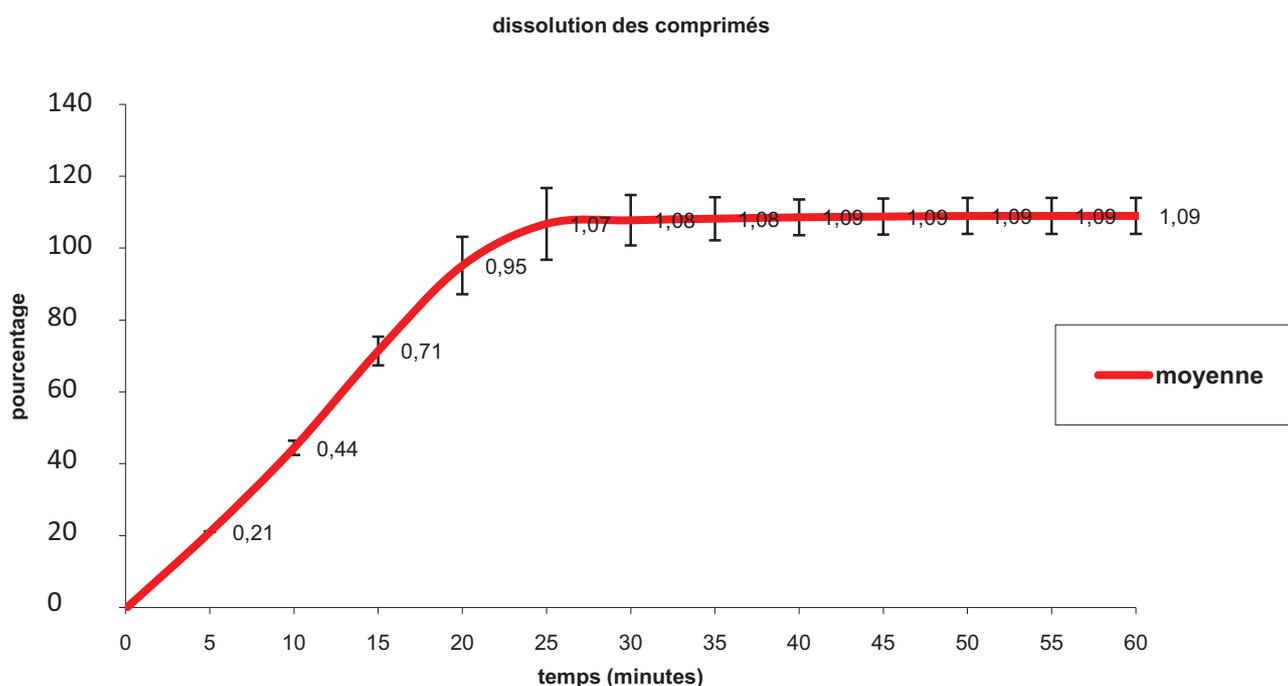


Figure 32 : courbe de dissolution du BG 637 à pH 1,2

Au temps 25 minutes le plateau est atteint. Cela correspondrait au 100 % de principe actif libéré dans le milieu de dissolution. L'absorbance correspondant à 25 minutes est d'environ 1,10.

III. Conclusion

Après quelques essais de formulation, nous avons mis au point une formule pour un comprimé à libération immédiate répondant à toutes les normes dictées par la P.E.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail, nous avons ainsi réalisé d'un point de vue physico-chimique l'étude du principe actif synthétique, en essayant de le caractériser le plus conformément possible à la Pharmacopée européenne.

Ainsi les caractéristiques spectrales les plus usuelles UV, IRTF, SM et DSC ont été réalisées, sans oublier les essais de solubilité et de stabilité dans différentes conditions. La granulométrie du principe actif, paramètre important pour la réalisation de la forme galénique finale, a également été étudiée par la microscopie électronique et la granulométrie laser.

Par la suite et avant de procéder à sa mise en forme galénique, des études d'interactions avec les excipients, les plus communément utilisés en formulation sèche, ont été réalisées afin de déterminer leur nature physico-chimique (synergie ou incompatibilité) et cela à la seule fin de nous guider dans le choix des excipients à incorporer avec le principe actif dans le mélange final afin de réaliser le comprimé, la forme galénique choisie.

Nous avons ainsi pu émettre une hypothèse selon laquelle le principe actif n'étant pas dégrader lors des études d'interactions, qu'il y aurait formation de liaisons hydrogènes entre ce dernier et certains excipients de l'étude.

Nous avons mis au point deux formules se différenciant par leur teneur en liant et en lubrifiant.

La formule 1 présente un temps de désagrégation très rapide (< à 1 minute). Elle pourrait servir à formuler des comprimés de type orodispersibles, par exemple, nécessitant une libération immédiate du produit. La formule 2 ayant un pourcentage de liant et lubrifiant un peu plus élevé que la formule 1, permet d'obtenir un comprimé plus classique, dont le temps de délitement est inférieure à 15 minutes.

Ainsi, nous avons pu mettre au point deux types de formules pour un même principe actif et il serait intéressant d'essayer d'aller plus loin en réalisant d'autres formes différentes du comprimé par exemples, les gélules, les injections et pourquoi pas les formes micellaires qui cibleraient plus spécifiquement la zone à traiter, surtout pour les traitements anticancéreux, où l'objectif est de détruire les cellules atteintes tout en épargnant les cellules saines.

Nous pouvant également, après cette étape de mise en forme galénique, envisager de pratiquer des tests sur les animaux et d'observer ainsi l'activité thérapeutique *in vivo* du BG 637, afin de récolter les informations nécessaires et indispensables pour une future possible administration chez l'homme.

Finalement, l'objectif de ce travail a été atteint, à savoir démontrer les différentes étapes que suit un principe actif défini, de sa synthèse à sa mise en forme galénique. Les phases des essais cliniques n'ont pas été abordées car elles constituent un aspect différent de ce que subit un principe actif avant d'être mis sur le marché.

LES ANNEXES

Exemples d'excipients utilisés en compression directe

<p>Diluants / liants</p>	<p>Acide alginique Amidons natifs, Amidons pregelatinisés Béta-cyclodextrine (betadex) Bicarbonate de sodium Calcium hydrogenophosphate Carbomeres Carbonate de calcium ou magnésium Carmellose sodique (CMCS) Carmellose calcique Gélatine Glucose, Glucose liquide Saccharose Sorbitol Mannitol</p> <p>Lactose monohydrate, Lactose anhydre Methylcellulose Kaolin Macrogols (PEG) Malitol, Maltodextrine Hydromellose (HPMC)</p>
<p>Délitants / désintégrants</p>	<p>Gomme arabique, Gomme adragante Silicate de magnésium ou d'aluminium Acide alginique Acide polyméthacrylique / DVB et sels Amidons natifs, Amidons pregelatinisés Carboxyméthylamidon sodique (CMA) Carmellose sodique (CMCS), Cellulose Copovidone Croscarmellose sodique Silices colloïdales Sulfate de calcium Xylitol</p>

Régulateurs d'écoulement / anti-mottants	Macrogols (PEG) Silices colloïdales Talc
Absorbants	Carbonates de magnésium Kaolin Silices colloïdales
Mouillants / solubilisants	Béta-cyclodextrine (betadex) Laurylsulfate de sodium Palmitostéarates de saccharose Polysorbates Povidone
Pigments / opacifiants	Dioxyde de titane
Aromatisants	Acide citrique Gomme arabique

Edulcorants	Glucose Lactose Mannitol Sorbitol Xylitol
Masquant du goût	Beta-cyclodextrine (BETATEX) Methylcellulose (MC) Silicate de magnésium ou d'aluminium

Colorants solubles	Jaune de quinoleine Jaune orange Riboflavine tartrazine
Correcteurs de pH	Acide citrique Bicarbonates de sodium Carbonate de calcium ou de magnésium Phosphate disodique (DSP)

BIBLIOGRAPHIE

¹ **S. R. Meshnick,**

Why does quinine still work after 350 years of use,
Parasitology Today, 13 (3), **1997**, 89-90.

² **C. Matias,**

Synthèse de dérivés de la pyrodi[3,2-g]quinoléine. Etude de l'activité trypanocide, antimalarique et de la réversion de la MDR.,
Faculté de Pharmacie de Marseille, Université de la méditerranée, **1997**.

³ *Cancer multidrug resistance,*

Nature biotechnology; vol 18, **supplement 2000**.

⁴ **E. Teodori, S. Dei.S. Scapecchi, F. Gualtieri,**

The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs,
Il Farmaco, 57 (5), **2002**, 385-415.

⁵ **M. Dietel,**

What's new in cytostatic drug resistance and pathology,
Patho. Res. Prac. 187 (7), **1991**, 892-905.

⁶ **K. Dano,**

Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells,
Biochem. Biophys. Acta. 323 (3), **1973**, 466-483.

⁷ **W. T. Beck,**

Mechanisms of multidrug resistance in human tumor cells. The role of P-glycoprotein, DNA topoisomerase II, and other factors,
Cancer Treat. Rev., 17 (suppl A), **1990**, 11-20.

⁸ **C. S. Morrow, K. H. Cowan,**

Gluyhatione S-transferase and drug resistance,
Cancer Cells, 2 (1), **1990**, 15-22.

⁹ **J. R. Hammond, R. M. Johnstone, P. Gros ,**

Enhanced efflux of [3H] vinblastine from Chinese hamster ovary cells transfected with a full-length complementary DNA clone for mdr1 gene,

Cancer Res., 49(14), **1989**, 3867-3871.

¹⁰ **Y. A. Hannun,**

Apoptosis and dilemma of cancer chemotherapy,

Blood 89, **1977**, 1845-1853.

¹¹ **Y. Y. Liu, T. Y. Han, A. E. Giuliano, M. C. Cabot,**

Ceramide glycosilation potentiates cellular multidrug resistance,

FASEB J, 15 (3), **2001**, 719-730.

¹² **R. L. Juliano, V. Ling,**

A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants,

Biochem. Biophys. Acta, 455 (1), **1976**, 152-162.

¹³ **D. Nielsen, C. Maare, T. Skovsgaard,**

Influx of daunorubicin in multidrug resistant Ehrlich ascites tumor cells: correlation to expression of p-glycoprotein and efflux. Influence of verapamil,

Biochem. Pharmacol., 50 (4), **1995**, 443-450.

¹⁴ **A. R. Safa,**

Photoaffinity labeling of p-glycoprotein in multidrug resistant cells,

Cancer Invest., 10 (4), **1992**, 295-305.

¹⁵ **R. G. Deeley, S. P. Cole,**

Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP),

Cancer Biol. 8 (3), **1997**, 193-204.

¹⁶ **R. J. Scheper, H. J. Broxterman, G. L. Scheffer; P. Kaaijk, W. S. Dalton, T.H. van Heijningen., C. K. van Kalken, M. L. Slovak, E. G. de Vrie, P. van der Valk, C. J. L. M. Meijer, H. M. Pinedo,**

Overexpression of a M^R 100,000 vesicular protein in non-p-glycoprotein-mediated multidrug resistance,

Cancer Res., 53 (7), **1993**, 1475-1479.

¹⁷ **D. D. Ross, W. Yang, L. V. Abruzzo, W. S. Dalton, E. Schneider, H. Lage, M .Dietel, L. Greenberger, S. P. Cole, L. A. Doyle,**

Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone selected cell lines,

J. Nat. Cancer Inst., 91 (5), **1999**, 429-433.

¹⁸ **J. M. Croop,**

Evolutionary relationships among ABC transporters,

Methods in Enzymol., 292, **1998**, 101-116.

¹⁹ **P. M. Jones, A. M. Geoges,**

A new structural model for p-glycoprotein,

J. Membrane Biol., 166 (2), **1998**, 133-147.

²⁰ **J. Robert ,**

Multidrug resistance reversal agent,

Drug Future, 22, **1997**, 149-158.

²¹ **M. F. Rosenberg, R. Callaghan, R. C. Ford, C. F. Higgins,**

Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis,

J. Biol. Chem., 272 (16), **1997**, 10685-10694.

²² **T. W. Loo, D. M. Clarke,**

Merck Frosst Award Lecture 1998. Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein,

Biochem. Cell Biol., 77 (1), **1999**, 11-23.

²³ **P. M. Jones, A. M. Georges,**

Symmetry and structure in P-glycoprotein and ABC transporters: what goes around comes around,
Eur. J. Biochem / FEBS, 267 (17), **2000**, 5298-5305.

²⁴ **M. M. Gottesman, T. Fojo, S. E. Bates,**

Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters;

Nature Reviews Cancer, 2 (1), **2002**, 48-58.

²⁵ **Marie Jean-Pierre,**

Le phénomène de résistance multiple aux anticancéreux : les gènes MDR et la P-gp
médecine/Sciences, 6, **1990**, 443-448.

²⁶ **M. Dong, L. Ladavière, F. Penin, G. Deléage, L. G. Baggetto,**

Secondary structure of P-glycoprotein investigated by circular dichroism and amino acid sequence analysis,

Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes., 1371 (2), **1998**, 317-334.

²⁷ **S. P. Cole, G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan, R. G. Deeley,**

Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line, Sciences., 258 (5088), **1992**, 1650-1654.

²⁸ **D. R. Hipfner, R. G. Deeley, S. P. C. Cole,**

Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1,

Biochem. Biophys. Acta- Biomembranes., 1461 (2), **1999**, 359-376.

²⁹ **P. Borst, R. Evers, M. Kool, J. Wijnholds,**

A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins,

J. Nat. Cancer Inst., 92 (16), **2000**, 1295-1302.

³⁰ **T. Litman, T. E. Druley, W. D. Stein, S. E. Bates,**

From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance,

Cell. Mol. life Sci., 58 (7), **2001**, 931-959.

³¹ **J. M. Ford, W. N. Hait,**

Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer,

Pharmacol. Rev., 42 (3), **1990**, 155-199.

³² **F. Frézard, E. Pereira-Maia, P. Quidu, W. Priebe, A. Garnier-Suillerot,**

P-glycoprotein preferentially effluxes anthracyclines containing free basic versus charged amine, Eur.

J. Biochem., 268 (6), **2001**, 1561-1567.

³³ **G. C. Wang, R. Pincheira, J. T. Zhang,**

Dissection of drug-binding-induced conformational changes in P-glycoprotein,

Eur. J. Biochem., 255 (2), **1998**, 383-390.

³⁴ **S. Dey, M. Ramachandra, I. Pastan, M. M. Gottesman, S. V. Ambudkar,**

Photoaffinity labeling of human P-glycoprotein: effect of modulator interaction and ATP hydrolysis on substrate binding,

Methods Enzymol., 292, **1998** 318-328.

³⁵ **R. Abramson, A. Bhushan, E. Dolci, T. Tritton,**

The structure of the multidrug resistance P-glycoprotein and its similarity to other proteins,

Ann. Rep. Med. Chem. ,25, **1990**, 253-260.

³⁶ **E. E. Zheleznova, P. Markham, R. Edgar, E. Bibi, A. A. Neyfakh, R. G. Brennan,**

A structure-based mechanism for drug binding by multidrug transporters,

Trends Biochem. Sci., 25 (2), **2000**, 39-43.

³⁷ **M. M. Gottesman, I. Pastan,**

Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter,

Annu. Rev. Biochem., 62, **1993**, 385-427

³⁸ **C. F. Higgins, M. M. Gottesman,**

Is the multidrug transporter a flippase ?

Trends. Biochem. Sci., 17 (1), **1992**, 18-21.

³⁹ **W. D. Stein,**

Kinetics of the multidrug transporter (p-glycoprotein) and its reversal,

Physiol. Rev., 77 (2), **1997**, 545-590.

⁴⁰ **P. D. Roepe,**

What is the precise role of human, MDR1 protein in the chemotherapeutic drug resistance ?

Curr. Pharmaceut. Des., 6 (3), **2000**, 241-260.

⁴¹ **P. D. Roepe,**

Indirect mechanism of drug transport by P-glycoprotein,

Trends Pharmacol. Sci., 15 (12), **1994**, 445-446.

⁴² **U. A. Germann,**

P-glycoprotein- A mediator of multidrug resistance in tumor cells,

Eur. J. Cancer, 32A (6), **1996**, 927-944.

⁴³ **E. H. Abraham, A. G. Prat, L. Gerweck, T. Seneveratne, R. J. Arceci, R. Kramer, G. Guidotti, H. F. Cantiello,**

The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90 (1), **1993**, 312-316.

⁴⁴ **L. L. Lu, F. Leonessa, R. Clarke, I. W. Wainer,**

Competitive and allosteric interactions in ligand binding to P-glycoprotein as observed on an immobilized P-glycoprotein liquid chromatographic stationary phase,

Mol. Pharmacol., 59 (1), **2001**, 62-68.

⁴⁵ **M. Garrigos, L. M. Mir, S. Orlowski,**

Competitive and non-competitive inhibition of the multidrug-resistance-associated P-glycoprotein ATPase-further experimental evidence for a multisite model,

Eur. J. Biochem / FEBS., 244 (2), **1997**, 664-673.

⁴⁶ **K. Ueda, A. Yoshida, T. Amachi,**

Recent progress in P-glycoprotein research,

Anti-Cancer Drug Des., 14 (2), **1999**, 115-121.

⁴⁷ **A. Seelig,**

How does P-glycoprotein recognize its substrates?,

Int. J. Clin. Pharmacol. Ther., 36 (1), **1998**, 50-54.

⁴⁸ **A. Seeli, X. Li Blatter, F. Wohnsland,**

Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: A comparison,

Int. J. Clin. Pharmacol. Ther., 38 (3), **2000**, 111-121.

⁴⁹ **F. J. Sharom, X. Yu, C. A. Doige,**

Functional reconstitution of drug transport and ATPase activity in proteoliposomes containing partially purified P-glycoprotein,

J. Biol. Chem., 268 (32), **1993**, 24197-24202.

⁵⁰ **A. F. Castro, J. K. Horton, C. G. Vanoye, G. A. Altenberg,**

Mechanism of inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport by protein kinase C blockers.

Biochem. Pharmacol., 58 (11), **1999**, 1723-1733.

⁵¹ **G. Conseil, J. M. Perez-Victoria, J. M. Jault, F. Gamarro, A. Goffeau, J. Hofmann, A. Di Pietro,**

Protein kinase C effectors bind to multidrug ABC transporters and inhibit their activity,

Biochem., 40 (8), **2001**, 2564-2571.

- ⁵² **R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, M. J. Smyth,**
Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein?
Trends Biochem. Sci., 25 (1), **2000**, 1-6.
- ⁵³ **M. King, W. Su, A. Chang, A. Zukerman, G.W. Pasternak,**
transport of opioids from brain to the periphery by P-glycoprotein : peripheral actions of central drugs,
Nature Neurosci., 4 (3), **2001**, 268-274.
- ⁵⁴ **X. D. Liu, G. Q. Liu,**
P-glycoprotein regulated transport of glutamate at blood –brain barrier,
Acta Pharmacol. Sinica, 22 (2), **2001**, 111-116.
- ⁵⁵ **F. Ushigome, H. Takanaga, H. Matsuo, S. Yanai, K. Tsukimori, H. Nakano, T. Uchiumi, T. Nakamura, M. Kuwano, H. Ohtani, Y. Sawada,**
Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone : contribution of P-glycoprotein,
Eur. J. Pharmacol., 408 (1), **2000**, 1-10.
- ⁵⁶ **G. Bradley, P. F. Juranka, V. Ling,**
Mechanism of multidrug resistance,
Biochim. Biophys. Acta, **1988**, 948 (1), 87-128.
- ⁵⁷ **M. M. Gottesman,**
Mechanisms of cancer drug resistance,
Annu. Rev. Med., 53, **2002**, 615-627.
- ⁵⁸ **M. M. Gottesamn, T. Fojo and S. Bates,**
Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters,
Nature Reviews Cancer, 2, **2002**, 48-58.

⁵⁹ **R. J. Arceci,**

Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug malignancies.
Blood., 81 (9), **1993**, 2215-2222.

⁶⁰ **Samlee Mankhetkorn, Arlette Garnier-Suillerot,**

The ability of verapamil to restore intracellular accumulation of anthracyclines in multidrug resistance cells depend on the kinetics of their uptake,
Eur. J. Pharm., 343 (2/3), **1998**, 313-321.

⁶¹ **W. Priebe, R. Perez-Soler,**

Design and tumor targeting of anthracyclines able to overcome multidrug resistance : a double-advantage approach,
Pharmac. Ther., 60 (2), **1993**, 215-234.

⁶² **I. M. Maze, P. Clair, C. Rousselle, P. Vidal, J. M. Scherrmann, D. Mathieu, J. Temsamani,**

Doxorubicin-peptide conjugates overcome multidrug resistance,
Anti-Cancer Drugs., 12 (2), **2001**, 107-116.

⁶³ **T. Tsuruo, H. Lida, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai,**

Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil,
Cancer Res., 41 (5), **1981**, 1967-1972.

⁶⁴ **V. Sandor, T. Fojo, S. E. Bates,**

Future perspectives for the development of P-glycoprotein modulators,
Drug Resist. Updates, 1 (3), **1998**, 190-200.

⁶⁵ **A. R. Safa, C. J. Glover, I. J. L. Sewel, M. B. Meyers, J. L. Biedler, R. L. Feldster,**

Identification of the multidrug-resistant-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers,
J. Biol. Chem., 262 (16), **1987**, 7884-7888.

⁶⁶ **P. R. Twentyman,**

A possible role for cyclosporins in cancer chemotherapy.

Anticancer Res., 8 (5A), **1988**, 985-993.

⁶⁷ **T. Tsuruo, H. Lida, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai,**

Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors,

Cancer Res., 42 (11), **1982**, 4730-4733.

⁶⁸ **T. Skovsgaard, K. Dano, N. I. Nissen,**

Chemosensitizers counteracting acquired resistance to anthracyclines and vinca alkaloids in vivo. A new treatment principle,

Cancer Treat. Rev., 11 (suppl A), **1984**, 63-72.

⁶⁹ **C. P. H. Yang, S. G. De Pinho, L. M. Greenberger, R. J. Arcedi, S. B. Horwitz,**

Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus,

J. Biol. Chem., 264 (2), **1989**, 782-788.

⁷⁰ **H. Hosoyama, H. Shigemori, A. Tomida, T. Tsuruo, J. Kobayashi,**

Modulation of multidrug resistance in tumor cells by taxinine derivatives,

Bioorg. Med. Chem. Lett., 9 (3), **1999**, 389-394.

⁷¹ **A. H. Dantzig, K. L. Law, K. L. Cao, J. J. Starling,**

Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator LY335979, from the bench to the clinic,

Curr. Med. Chem., 8 (1), **2001**, 39-50.

⁷² **N. Dodic, B. Dumaitre, A. Daugan, P. Pianetti,**

Synthesis and activity against multidrug resistance in Chinese hamster ovary cells of new acridone-4-carboxamides,

J. Med. Chem., 38 (13), **1995**, 2418-2426.

- ⁷³ **B. Chauffert, M. Martin, A. Hammann, M. F. Michel, F. Martin,**
Amiodarone-induced enhancement of doxorubicin and 4'-deoxydoxorubicin cytotoxicity to rat colon cancer cells in-vitro and in-vivo
cancer Res., 46 (2), **1986**, 825-830.
- ⁷⁴ **M. P. Gosland, B. L. Lum, B. I. Sikic,**
Reversal by cefoperazone of resistance to etopodide, doxorubicin, and vinblastine in multidrug resistance human sarcoma cells,
Cancer Res., 49 (24 Pt 1), **1989**, 6901-6905.
- ⁷⁵ **J. M. Ford, W. C. Prozialeck, W. N. Hait,**
Structural features determining activity of phenothiazines and related drugs for inhibition of cell growth and reversal of multidrug resistance,
Mol. Pharmacol., 35 (1), **1989**, 105-115.
- ⁷⁶ **W. N. Hait, N. H. Pierson,**
Comparison of the efficacy of phenothiazine and bisquinaldinium calmodulin antagonist against multidrug resistant P388 cell lines. ,
Cancer Res., 50 (4), **1990**, 1165-1169.
- ⁷⁷ **W. Peter,**
Chemotherapy and drug resistance in Malaria,
Academic Press, London, **1970**.
- ⁷⁸ **P. J. Rosenthal, S. R. Meshnick,**
Hemoglobine catabolism and iron utilization by malaria parasites,
Molecular and Biochemical Parasitology, 83 (2), **1996**, 131-139.
- ⁷⁹ **M. Foley and L. Tilley,**
Quinoline antimalarials : mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. Pharm. Ther. 79 (1), **1998**, 55-87.

⁸⁰ **P. A. Wood, and J. W. Eaton,**

Hemoglobin catabolism and host parasite heme balance in chloroquine-sensitive and chloroquine-resistance Plasmodium berghei infections,

Am. J. Trop. Med. And Hyg., 48 (4), **1993**, 465-472.

⁸¹ **T. G. Geary, J. B. Jensen, H. Ginsburg,**

Uptake of [³H] chloroquine by drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite Plasmodium falciparum,

Biochem. Pharmacol., 35 (21), **1986**, 3805 -3812.

⁸² **H. Ginsburg, E. Nissani and M. Krugliak,**

Alkalinization of the food vacuole of malaria parasite by quinoline drugs and alkylamines is not correlated with their anti-malarial activity,

Biochem. Pharmacol., 38 (16), 1989, 2645-2654.

⁸³ **C. D. Fitch,**

Plasmodium falciparum in owl monkey: drug resistance and chloroquine binding capacity,

Science, 169 (942), **1970**, 289-290.

⁸⁴ **S. A. Ward, P. G. Bray, S. R. Hawley,**

Quinoline resistance mechanisms in Plasmodium falciparum: the debate goes on,

Parasitology, 114 (suppl), **1997**, 125-S136.

⁸⁵ **D. J. Krogstad, I. Y. Gluzman, D. E. Kyle, A. M. Oduola, S. K. Martin, W. K. Milhous, P. H. Schlesinger,**

Efflux of chloroquine from Plasmodium falciparum: mechanism of chloroquine resistance,

Science, 238 (4831), **1987**, 1283-1285.

⁸⁶ **D. J. Krogstad, P. H. Schlesinger, B. L. Herwaldt,**

Antimalarial agents: mechanism of chloroquine resistance,

Antimicrob. Agents Chemother, 32 (6), **1988**, 799-801.

- ⁸⁷ **S. K. Martin, A. M. J. Oduola and W. K. Milhous,**
Reversal of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum by verapamil,
Science, 235 (4791), **1987**, 899-901.
- ⁸⁸ **C. M. Wilson, A. E. Serrano, A. Wasley, M. P. Bogenschutz, A. H. Shankar, D. F. Wirth,**
Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug-resistant Plasmodium falciparum
Science, 244 (4909), **1989** 1184-1186.
- ⁸⁹ **D. A. Barnes, S. J. Foote, D. Galatis, D. J. Kemp, A. F. Cowman,**
Selection for high-level chloroquine resistance results in deamplification of the pfmdr1 gene and increased sensitivity to mefloquine in Plasmodium falciparum.
EMBO J, 11 (8), **1992**, 3067-3075.
- ⁹⁰ **T. E. Wellems, L. J. Panton, I. Y Gluzman, V. E do Rosario, R.W. Gwadz, A. Walker-Jonah, D. J. Krogstad,**
Chloroquine resistance not linked to mdr-like genes in a Plasmodium falciparum cross.
Nature, 345 (6272), **1990**, 253-255.
- ⁹¹ **X. Su, L. A. Kirkman, H. Fujioka, T. E. Wellems,**
Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant P. falciparum in Southeast Asia and Africa,
Cell, 91 (5), **1997**, 593-603.
- ⁹² **J. Carlton, M. Mackinnon, D. Walliker,**
A chloroquine resistance locus in the rodent malaria parasite Plasmodium chabaudi,
Mol. Biochem. Parasitol., 93 (1), **1998**, 57-72.
- ⁹³ **L. M. B. Ursos, S. M. Dzekunov, P. D. Roepe,**
Digestive vacuolar pH of intact intraerythrocytic P. falciparum either sensitive or resistant to chloroquine,
Mol. Biochem. Parasitol, 110, **2000**, 107-124.

- ⁹⁴ **A. B. Sidhu, D. Verdier-Pinard, D. A. Fidock,**
Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum malaria parasites conferred by pfcr1 mutations,
Science, 298 (5591), **2002**, 210-213.
- ⁹⁵ **L. M. B. Ursos, K F. DuBay, P. D. Roepe,**
Antimalarial drugs influence the pH dependent solubility of heme via apparent nucleation phenomena,
Mol. Biochem. Parasitol., 112 (1), **2001**, 11-17.
- ⁹⁶ **A. M. Oduola, R. S. Moyou-Somo, D. E. Kyle, S. K. Martin, L. Gerena, W. K. Milhous,**
Chloroquine resistant Plasmodium falciparum in indigenous residents of Cameroon ;
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 83 (3), **1989**, 308-310.
- ⁹⁷ **K. Tanabe, M. Kato, A. Izumo, A. Hagiwara, S. Doi,**
Plasmodium chabaudi: in vivo effects of Ca²⁺ antagonists of chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive parasites,
Exp. Parasitol., 70 (4), **1990**, 419-426.
- ⁹⁸ **A. Miki, K. Tanabe, T. Nakayama, C. Kiryon, K. Ohsawa,**
Plasmodium chabaudi: association of reversal chloroquine resistance with increased accumulation of chloroquine in resistant parasites,
Exp. Parasitol., 74 (2), **1992**, 134-142.
- ⁹⁹ **A. J. Bitonti, P. P. McCann,**
Desipramine and cyproheptadine for reversal of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum,
Lancet, 334 (8674), **1989**, 1282-1283.
- ¹⁰⁰ **L. K. Basco, J. Le Bras,**
Reversal of chloroquine resistance with desipramine in isolates of Plasmodium falciparum from Central and West Africa,
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 84 (4), **1990**, 479-481.

¹⁰¹ **L. K. Basco, J. Le Bras,**

In vitro activities of chloroquine in combination with chlorpromazine and prochlorperazine against isolates of Plasmodium falciparum,

Antimicrob. Agents Chemother., 36 (1), **1992**, 209-213.

¹⁰² **W. Peters, R. Ekong, B. L. Robinson, D. C. Warhurst, X. Q. Pan,**

The chemotherapy of rodent malaria. XLV. Reversal of chloroquine resistance in rodent and human Plasmodium falciparum by antihistaminic agents,

Ann. Trop. Med. Parasitol., 84 (6), **1990**, 541-551.

¹⁰³ **L. K. Basco, P. Ringwald, J. Le Bras,**

Chlorquine potentiating action of antihistaminics in Plasmodium falciparum in vitro,

Ann. Trop. Med. Parasitol., 85 (2), **1991**, 223-228.

¹⁰⁴ **A. M. J. Oduola, A. Sowunmi, W. K. Milhous, T. G. Brewer, D. E. Kyle, L. Gerena, R. N. Rossan, L. A. Salako, B. G. Schuster,**

In vitro and in vivo reversal of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum with promethazine,
Am. J. Trop. Med. Hyg., 58 (5), **1998**, 625-629.

¹⁰⁵ **L. K. Basco, C. Ruggeri, J. Le Bras,**

Molécules antipaludiques : mécanismes d'action, mécanismes de résistance et relations structure-activité des schizontocides sanguins,

ed. Masson, **1994**, pp (5-10) et 26.

¹⁰⁶ **S. Vidal,**

Modélisation des interactions β lactamines/porines : description d'un mécanisme de résistance des bactéries Gram négatif aux antibiotiques par défaut de perméation de la paroi.

Thèse de Doctorat, **7 juillet 2004**.

¹⁰⁷ **J. Gluysen,**

la paroi bactérienne,

Microbiologie générale, **1974**, Grasser : Paris.

¹⁰⁸ **J.C. Barna and D.H. William,**

The structure and mode of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group,
Annu. Rev. Microbiol., 38, 1984, 339-57.

¹⁰⁹ **V. Jarlier and H. Nikaido,**

Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics.
FEMS Microbiol. Lett., 123 (1-2), 1994, 11-18.

¹¹⁰ **S. B. Levy,**

Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance,
Antimicrob. Agents. Chemother., 36 (4), 1992, 695-703.

¹¹¹ **H. Nikaido,**

Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance.
Antimicrob. Agents Chemother, 33 (11), 1989, 1831-1836.

¹¹² **L. Gutmann, R. Williamson, N. Moreau, M. D. Kitzis, E. Collatz, J. F. Acar, and F. W. Goldstein,**

Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of Klebsiella, Enterobacter, and Serratia.
J. Infect. Dis., 151 (3), 1985, 501-507.

¹¹³ **K. Bush, G. A. Jacoby, A. A. Medeiros,**

A functional classification scheme for beta-lactamase and its correlation with molecular structure,
Antimicrob. Agents Chemother., 39 (6), 1995, 1211-1233.

¹¹⁴ **C. C. Sanders, and W. E. Jr Sanders,**

Type I beta-lactamases of gram-negative bacteria: interactions with beta-lactam antibiotics.
J. Infect. Dis., 154 (5), 1986; 792-800.

¹¹⁵ **P. Courvalin and A. Philippon,**

Mécanisme biochimique de la résistance bactérienne aux agents antibactériens,
Bactériologie Médicale, 1989, Flammarion, Paris.

¹¹⁶ L. J. Piddock and M. Zhu,

Mechanism of action of sparfloxacin and mechanism of resistance in gram-negative and gram-positive bacteria,

Antimicrob. Agents. Chemother. 35 (11), **1991**, 2423-2427.

¹¹⁷ E. Cambau and L. Gutmann,

Mechanisms of resistance to quinolones,

Drugs, 45 (suppl 3), **1993**, 15-23.

¹¹⁸ A. Meier, P. Kirschner, F. C. Bange, U. Vogel, and E. C. Bottger,

Genetic alterations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis: mapping of mutations conferring resistance.

Antimicrob. Agents Chemother., 38 (2), **1994**, 228-233.

¹¹⁹ I. T. Paulsen, M. H. Brown, R. A. Skurray,

Proton-dependent multidrug efflux systems,

Microbiol Rev., 60 (4), **1996**, 575-608.

¹²⁰ M. Marger, M. H. Saier, H. Jr, Milton.

A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport, Trends. Biochem. Sci., 18 (1), **1993**, 13-20.

¹²¹ M. H. Jr Saier, R. Tam, A. Reizer, J. Reizer,

Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport,

Mol. Microbiol., 11 (5), **1994**, 841-847.

¹²² I. T. Paulsen, R. A. Skurray, R. Tam, M. H. Jr Saier, R. J. Turner, J. H. Weiner, E. B. Goldberg, L. L. Grinius,

The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs,

Mol. Microbiol., 19 (6), **1996**, 1167-1175.

¹²³ **D. Grundemann, V. Gorboulev, S. Gambaryan, M. Veyhl, H. Koepsell,**

Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter,
Nature, 372 (6506), **1994**, 549-552.

¹²⁴ **S. Schuldiner, A. Shirvan, M. Linial,**

Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans,
Physiol Rev, 75 (2), **1995**, 369-392.

¹²⁵ **T. G. Littlejohn, I. T. Paulsen, M. T. Gillespie, J. M. Tennent, M. Midgley, I. G. Jones, A. S. Purewal, R. A. Skurray,**

Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in Staphylococcus aureus,
FEMS Microbiol. Lett., 74 (2-3), **1992**, 259-265.

¹²⁶ **I. T. Paulsen, M. H. Brown, S. J. Dunstan, R. A. Skurray,**

Molecular characterization of the staphylococcal multidrug resistance export protein QacC,
J. Bacteriol, 177 (10), **1995**, 2827-2833.

¹²⁷ **I. T. Arkin, W. P. Russ, M. Lebendiker, S. Schuldiner,**

Determining the secondary structure and orientation of EmrE, a multi-drug transporter, indicates a transmembrane four-helix bundle,
Biochemistry, 35 (22), **1996**, 7233-7238.

¹²⁸ **I. T. Arkin, W. P. Russ, M. Lebendiker, S. Schuldiner,**

Determining the secondary structure and orientation of EmrE, a multi-drug transporter, indicates a transmembrane four-helix bundle,
Biochemistry, 35 (22), **1996**, 7233-7238.

¹²⁹ **H. W. van Veen, W. N. Konings,**

Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function,
Seminars in Cancer Biology, 8 (3), **1997**, 183-191.

- ¹³⁰ **R. Prasad, P. De Wergifosse, A. Goffeau, E. Balzi,**
Molecular cloning and characterization of a novel gene of Candida albicans, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals,
Curr. Genet, 27 (4), **1995**, 320-329.
- ¹³¹ **E. Balzi, M. Wang, S. Letreme, L. van Dyck, A. Goffeau,**
Pdr5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by transcription regulator PDR1,
J. Biol. Chem., 269 (3), **1994**, 2206-2214.
- ¹³² **A. Decottignies, L. Lambert, P. Catty, H. Degand, E.A. Epping, W. S. Moye-Rowley, E. Balzi, A. Goffeau,**
Identification and characterization of SNQ2, a new multidrug ATP binding cassette transporter of the yeast plasma membrane.
J. Biol. Chem, 270 (30), **1995**, 18150-18157.
- ¹³³ **H. W. van Veen, K. Venema, H. Bolhuis, I. Oussenko, J. Kok, B. Poolman, A. J. Driessen, W.N. Konings,**
Multidrug resistance mediated by bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1,
Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 93 (20), **1996**, 10668-10672.
- ¹³⁴ **G. E. Tusnady, E. Bakos, A. V Radi, B. Sarkadi,**
Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters,
FEBS Lett., 402, **1997**, 1-3.
- ¹³⁵ **Z. Cui, D. Hirata, E. Tsuchiya, H. Osada, T. Mijakawa,**
The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (Yrs1 / Yor1) of Saccharomyces cerevisiae is important for the tolerance to a broad range of organic anions,
J. Biol. Chem, 271 (25), **1996**, 14712-14716.

- ¹³⁶ **D. Molenaar, H. Bolhuis, T. Abee, B. Poolman, W. N. Konings,**
The efflux of a fluorescent probe is catalysed by an ATP-driven extrusion system in Lactococcus lactis,
J. Bacteriol. 174 (10), **1992**, 3118-3124.
- ¹³⁷ **H. Bolhuis, H. W. van Veen, D. Molenaar, B. Poolman, A. J. Driessen, W. N. Konings,**
Multidrug resistance in Lactococcus lactis: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet to the cytoplasmic membrane,
EMBO J. 15 (16), **1996**, 4239-4245.
- ¹³⁸ **H. Bolhuis, H. W. van Veen, J. R. Brands, M. Putman, B. Poolman, A. J. Driessen, W. N. Konings,**
Energetics and mechanism of drug transport mediated by the lactococcal multidrug transporter LmrP,
J. Biol. Chem., 271 (39), **1996**, 24123-24128.
- ¹³⁹ **H. Mefetah, P. Brouant, A. M. Galy, J. P. Galy, J. Barbe,**
Potentiel anticancer benzo-naphthyridones with fused ring: a theor. model for predicting orientation in the cyclization of intermediates,
Med. Chem. Res., 5 (7), **1995**, 522-533.
- ¹⁴⁰ **J. Barbe, G. Boyer, I. Carignano, J. Elguero, J. P. Galy, S. Morel, R. Oughedani,**
Thiazodo[5,4-a]acridines.
Tetrahedron Lettre, 32 (26), **1991**, 6709-6710.
- ¹⁴¹ **L. Ngadi, N. Bsiri, A. Mahamoud, J. P. Galy, J. C. Soyfer, J. Barbe, M. Placidi, J. L. Rodriguez-Santiago, C. Mesa-Valle, R. Lombardo, C. Mascaro, A. Osuna,**
Synthesis and antiparasitic activity of new 1-nitro, 1-amino and 1-acetomido-9-acridinones.,
Azneimmittel-Forschung. 43 (4), **1993**, 480-483.
- ¹⁴² **C. Matias, A. Mahamoud, J. Barbe,**
Synthesis and antimalarial activity of new 4,6-diathoxy and 4,6-bis(alkylthio) pyrido[3,2-g] quinoline derivatives,
Heterocycles, 43(8), **1996**, 1621-1632.

¹⁴³ **F. H. Case,**

Substitued 1,10-phenanthrolines. I. The synthesis of certain mono and polymethyl-1,10-phenanthrolines,

J. Amr. chem. Soc., 70, **1948**, 3994-3996.

¹⁴⁴ **Y. Hamada, I. Takeuchi, M. Hirotan,**

Synthesis of nitrogen-containgn heterocyclic compounds. XX. Improvement of one-step synthesis of phenanthrolines and some reactions of 4,6-phenanthroline,

Chem. Pharm., Bull, 22(3), **1974**, 485-492.

¹⁴⁵ **U. Jordis, F. Sauter, M. Rudolf, G. Cari,**

Syntheses of novel quinolone chemotherapeutics. I. Pyridoquinolines and pyridophenanthrolines as derivatives of «Lin-benzo-nalidixic acid»,

Monatshefte fuer Chemie. 119 (6-7), **1988**, 761-780.

¹⁴⁶ **J. Moron, C. Huel, E. Bisagni,**

Synthesis of various pyrido- and indolo[g] fused 1H-quinolin-4-one derivatives,

Heterocycles, 36(12), **1993**, 2753-2764.

¹⁴⁷ **Z. H. Skraup, G.Vortmann,**

Uber derivate der dipyridyls,

Monatsh, 4, **1883**, 569-603.

¹⁴⁸ **J. Mlochowski, W. Sliwa, L. Archremowicz,**

Extension of some quinolines and isoquinolines by a pyridine ring,

Ann. Soc. Chem.; Polonorum, 48(5), **1974**, 787-791.

¹⁴⁹ **A. Godard, G. Queguiner,**

Synthesis of benzonaphthyridines,

J. Heterocyclic. Chem., 19(6), **1982**, 1289-1296.

¹⁵⁰ **H. Quast, N. Shön,**

Synthesis and reactions of some pyrido[3,2-g] quinolines (1,8-diazaanthracene),
Liebigs Ann. Chem., **1984**, 133-146.

¹⁵¹ **R. Snyder ,H.E. Freier,**

Some substituted 1,10-phenanthrolines. II.
J. Amer. Chem. Soc., 68, **1946**, 1320-1322.

¹⁵² **F. F. Molock, D. W. Boykin,**

The synthesis of pyridoquinolines with dialkyaminopropylamine side chains.
J. Heteocyclic Chem., 20(3), **1983**, 681-686.

¹⁵³ **M. Croisy-Delecy, E. Bisagni,**

Aza analogues of lucanthone : Synthesis and antitumor and bactericidal properties,
J. Med chem., 26(9), **1983**, 1329-1333.

¹⁵⁴ **C. Antonello, E. Uriarte, M. Palumbo, S. Valisena, C. Parolin, G. Palu,**

Synthesis and biological activity of new quinolone derivatives,
Eur. J. Med. Chem., 28(4), **1993**, 291-296.

¹⁵⁵ **C.M. Hall, J.B. Wright, H.G. Johnson, A.J. Taylor,**

Quinoline derivatives as antiallergiy agents. 2. Fused-ring quinaldic acids.
J. Med; chem., 20(10), **1977**, 1337-1343.

¹⁵⁶ **R. Smolders, J. Hanuise, R. Coomans, V. Proietto, N. Voglet, A. Waefelaer,**

Thiation with tetraphosphorus decasulfide in hexamethyl phosphoric triamide : synthesis of thioacronycine and acridanethione.

Synthesis, 1982,483-495

¹⁵⁷ **J. P. Galy, J. Elguero, E. J. Vincent, A. M. Galy, J. Barbe,**

A convenient synthesis of N-alkyl-acridanones using phase-transfert catalysis,
Synthesis, 12, **1979**, 944-946.

-
- ¹⁵⁸ **A. Mahamoud, M. Kayirere, J. P. Galy, J. Barbe, D. Sharples, M. Richardson, G. Atassi,**
*Synthesis, intercalation into DNA and anticancer activity of some 4,6-dialkoxy-10-methylpyrido[3,2-g]
quinolines,*
Heterocyclic Comm., 1 (1), **1994**, 47-50.
- ¹⁵⁹ **H. Koga, A. Itoh, S. Murayama, S. Suzue, T. Irikura,**
*Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-substitued 1-alkyl-1,4-dihydro-4-
oxoquinoline-3-carboxylic acids,*
J. Med. Chem, 23, **1980**, 1358-1363.
- ¹⁶⁰ **J. M. Domagala, S. E. Hagen, C. L. Heifetz, M. P. Hutt, T. F. Mich, J. P. Sanchez, A. K.
Trehan,**
*7-substitued 5-amino-1-cyclopropyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acids:
synthesis and biological activity of new class of quinolone antibacterial,*
J. Med. Chem., 31, **1988**, 503-506.
- ¹⁶¹ **Y. Picó, G. Font, P. Balaña Fonce, C. Ordeóñez, D. Abbas, J. Barbes,**
*Analysis of pyridoquinoline derivatives by liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical
ionization mass spectrometry,*
Rapid Communication in Mass Spectrometry, 15, **2001**, 862-866.
- ¹⁶² **J.M. Aiache, S. Aiache, Y. Cohen, R. Renoux,**
Initiation à la connaissance du médicament : texte imprimé,
4 édition, Paris : Masson, **2001**.
- ¹⁶³ **G. Arnold Kreig, E. Bushmann,**
Du laboratoire à l'usine,
Pour la science, 241, **1997**, 98-105.
- ¹⁶⁴ **D. Pradeau, Association de pharmacie hospitalière de l'île-de-France.**
L'analyse pratique du médicament,
chapitre 4. Editions Médicales Internationales, **1992**, Cachan (France).
- ¹⁶⁵ **Pharmacopée Européenne, 2003**, 4 édition.

¹⁶⁶ **R. M. Atkinson, C. Bedford, K. J. Child, E. G Tomich,**

Effect of particle size on blood griseofulvin-levels man,
Nature, 193, **1962**, 588-589.

¹⁶⁷ **M. P. Summers, R. P. Enever, J. E. Carless,**

The influence of crystal form on the radial stress transmission characteristics of pharmaceutical materials,
J. Phar. & Pharmacol, 28 (2), 1976, 89-99.

¹⁶⁸ **T. J. Macek,**

The physical and chemical problems inherent in the formulation of dosage forms for new pharmaceuticals,
Amer. J. Pharm., 137, **1965**, 217-239.

¹⁶⁹ **E. Doelker,**

Caractères physico-chimiques des principes actifs leurs conséquences sur la faisabilité et la stabilité des formes galéniques,
STP Pharma Pratique 9(5), **1999**, 399-409.

¹⁷⁰ **T.L. Threlfall,**

Analysis of organic polymorphs. A review,
Analyst., 121(2), **1996**, 2435-2460.

¹⁷¹ **H.K. Chan,**

Polymorphic transformation of drug under mechanical treatment,
Thèse, Université de Genève, **1986**.

¹⁷² **L. Borka,**

Review of crystal polymorphism of substances in the European Pharmacopoeia,
Phar. Acta Helv., 66(1), **1991**, 16-22.

¹⁷³ **A. J. Aguiar, J. Jr Krc, A. W. Kinkel, J. C. Samyn,**

Effect of polymorphism on the absorption of chloramphenicol from chloramphenicol palmitate,
J. Pharm. Sci., 56(7), **1967**, 847-853.

¹⁷⁴ **S. Miyazaki, T. Arita, R. Hori, K. Ito,**

Effect of polymorphism on the dissolution behaviour and gastrointestinal absorption of chlortetracycline hypochloride;
Chem. Pharm. Bull, 22 (3), **1974**, 638-642.

¹⁷⁵ **E. Leverd,**

Qualité des matières premières et mise en œuvre galénique,
S.T.P. Pharma, 4 (4), **1988**, 327-329.

¹⁷⁶ **A. LE HIR,**

Pharmacie Galénique texte imprimé : Bonnes pratiques de fabrication des médicaments,
8 édition rev. Et augm. Paris : Masson ; **2001**.

¹⁷⁷ **M. C. Rand, A. E. Greenberg, M. J. Taras,**

Standart Method for the examination of water and waster water,
15ème edition; American Health Association Washington, D.C., **1980**, 60-70.

¹⁷⁸ **L. F. Prescott, R. F. Steel, W. R. Ferrier,**

The effect of particles size on the absorption of phenacetin in man. A correlation between plasma concentration of phenacetin and effects on the central nervous system,
Clin. Pharmacol. Ther., 11(4), **1970**, 496-504.

¹⁷⁹ **P. Buri,**

Préformulation : pKa et coefficient de partage,
Labo-pharma – problèmes et techniques, 307, **1981**, 181-186.

¹⁸⁰ **A. Albert, E.P. Serjeant,**

The determination of ionization constants: A laboratory manual,
2nd ed. London: Chapman and Hall; **1971**, 115pp.

¹⁸¹ **M Antignac, I. Peyron, A. Bellanger, A. Thuillier,**

Préparation dans le cadre d'un essai clinique : formulation et étude de stabilité de sprays et de gélules de chlorhydrate d'éphédrine,

Journal de Pharmacie Clinique, 21 (1), **2002**, 71-77.

¹⁸² **S. Roy, A.T. Riga, K. S. Alexander,**

Experimental design aids the development of a differential scanning calorimetry standard test procedure for pharmaceuticals,

Thermochimica acta, 392-393, **2002**, 399-404

¹⁸³ **Francis Rouessac, Annick Rouessac,**

Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes,

cours et exercices résolus, 5^e édition, DUNOD

¹⁸⁴ **A. Boza-Rivera, R. Gonzalez Hernandez, H. Novoa de Armas, M. Dulce, E. Cuéllar, Valdés M. Losada**

Physico-chemical and solid-state characterization of secnidazole.

Il Farmaco, 55 (11-12), **2000**, 700-707.

¹⁸⁵ **M. Hamon, F Pellerin, M Guernet, G Mahuzier,**

Abregé chimie analytique tome 3, méthodes spectrales et analyse organique,

2^e édition, Masson

¹⁸⁶ **J. Likforman,**

L'analyse pratique du médicament, chapitre 7, spectrométrie de résonance magnétique nucléaire,

éditions médicales internationales, **1992**.

¹⁸⁷ **J. P. Eberhart,**

analyse structurale et chimique des matériaux,

Dunod, **1989**

¹⁸⁸ **Ann. W Newman and Stephen R. Byrn,**

Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products,
Drug Development Today, 8, **2003**, 898-905.

¹⁸⁹ **R. Ouahes, B. Devallez,**

chimie générale, chapitre 14 : les solutions ioniques acides et bases,
3^e édition corrigée.

¹⁹⁰ **C. Le Gressus**

Technique de l'ingénieur, techniques d'analyse Microscopie électronique à balayage,
1, **1995**, 865, 1-22.

¹⁹¹ *ICH Harmonised Tripartite Guideline, Pharmaceutical Development, ICH Q8.*

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (CPMP/ICH/167068/04), 2005.

¹⁹² *USP Suncommitee on excipients,*

Pharm. Forum, 187, **1992**, 4387.

¹⁹³ **G. Pifferi, P. Santoro, M. Pedrani,**

quality and functionality of excipients,
Il Farmaco, 54 (1-2), **1999**, 1-14.

¹⁹⁴ **K. Jackson, D. Young, S. Pant,**

Drug-excipients interactions and their affect on absorption,
PSTT, 3 (10), **2000**, 336-345.

¹⁹⁵ **P. J. Crowley,**

Excipients as stabilizers,
PSTT, 2 (6), **1999**, 237-243.

¹⁹⁶ **Yves Rossetto**

pharmacotechnie industrielle (φ 41), chapitre 2,
I.M.T édition, **1998**.

¹⁹⁷ **G. N. Kalinkova,**

Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations,

International Journal of Pharmaceutics, 187 (1), **1999**, 1-15.

¹⁹⁸ **A. K. Singla, H. Wadhwa,**

Zinc-indomethacin complex: synthesis, physicochemical and biological evaluation in the rat,

Int. J. Pharm., 120 (2), **1995**, 145-155.

¹⁹⁹ **M. A. Vandelli, G. Salvioli, A. Mucci, R. Panini, L. Malmusi, F. Forni,**

2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation with ursodeoxycholic acid,

Int. J. Pharm., 118 (1), **1995**, 77-83.

²⁰⁰ **F. Veiga, J. J. C. Teixeira-Dias, F. Kedzierewicz, A. Sousa, P. Maincent,**

Inclusion complexation of tlobutamide with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin,

Int. J. Pharm., 129 (1-2), **1996**, 63-71.

²⁰¹ **F. Kedzierewicz, F. Villieras, C. Zinutti, M. Hoffman, P. Maincent,**

A 3 year stability study of tlobutamide solid dispersion and β -cyclodextrin complex,

Int. J. Pharm., 117 (2), **1995**, 274-251.

²⁰² **A. M. Sigurðardóttir, T. Loftsson,**

The effect of polyvinylpyrrolidone on cyclodextrin complexation of hydrocortisone and its diffusion through hairless mouse skin,

Int. J. Pharm., 126 (1-2), **1995**, 73-78.

²⁰³ **S. Büyüktimkin, N. Büyüktimkin, J. H. Rytting,**

Interaction of indomethacin with a new penetration enhancer, dodecyl 2-(N,N-dimethylamino) propionate (DDAIP): its effect on transdermal delivery,

Int. J. Pharm., 127 (2), **1996**, 245-253.

²⁰⁴ **A. Nokhodchi , M. H. Rubinstein, H. Larhrib, J. C. Guyot,**

The effect of moisture content on the energies involved in the compaction of ibuprofen,
Int. J. Pharm., 120 (1), **1995**, 13-20.

²⁰⁵ **G. Damien,**

Mise au point d'une forme galénique solide. Interactions principe actif – excipients.
STP Pharma Pratique, 14 (3), **2004**, 303-310.

²⁰⁶ **G. Pifferi, P. restani**

The safety of pharmaceutical excipients
Il Farmaco, 58, **2003**, 541-550

²⁰⁷ **C. L. Winek,**

History of excipients safety and toxicity,
Drugs Pharm. Sci., 103, **2000**, 59-72.

²⁰⁸ **P. Crowley, C. Martini,**

Drug-excipient interactions,
Pharmaceutical Techn. Europe, **March 2001**, 26-34.

²⁰⁹ **Samuel OUSTRIC.**

Les interactions principes actifs / excipients dans les formes pharmaceutiques solides :exemples d'interactions chimiques et physiques.
thèse : **2002**, université de Toulouse.

²¹⁰ **R. C. Rowe, P. J. Sheskey and P. Weller**

Handbook of pharmaceutical excipients
4^{ème} édition, **2003**

²¹¹ **Herbert A. Lieberman, L. Lachman, J. B. Schwartz,**

Pharmaceutical Dosage Forms,
Tablets, Vol 1, 2^{ème} edition, revised and expanded, **1996**.

- ²¹² **Mira Jivraj, Luigi G. Martini and Carol M. Thomson,**
An overview of the different excipients useful for the direct compression
PSTT, 3, **2000**, 58-63.
- ²¹³ **S. Wissing, Duncan Q. M. Craig, Susan A. Barker,**
An investigation into the use of stepwise isothermal high sensitivity DSC as a mean of detecting drug-excipient incompatibility,
International Journal of Pharmaceutics, 199, **2000**, 141-150
- ²¹⁴ **Rajan K.Verma, Sanjay Garg**
Selection of excipients for extended release formulations of plipizide through drug-excipient compatibility testing,
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 38, **2005**, 633-644.
- ²¹⁵ **A. A. Araujo, S. Storpirtis, L. P. Mercuri, F. M. Carvalho, M. dos Santos Filho and J. R. Matos,**
Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms,
International Journal of pharmaceutics, 260, **2003**, 303-314
- ²¹⁶ **P. Bracconi, C. Andres, A. N'Diaye and Y. Pourcelot,**
Thermal analyses of commercial magnesium stearate pseudopolymorphs,
Thermochimica Acta, 429, **2005**, 43-51.
- ²¹⁷ **S. Sharpe, M. Celik, A. Newman and H. Brittain,**
Physical characterization of the polymorphic variations of magnesium stearate and magnesium palmitate hydrate species,
Structural Chemistry, 8, **1997**, 73-84.
- ²¹⁸ **A. djiane, Y. Bensouda, V. Bettevy, V. Bourgeois, A. Combes, P. Duchêne, N. Fourcroy, V. Gajan, D. Jallut, A. Laurent, P. Louvel, E. Moreau, Rouvet, S. Soulias, N. Zakarian,**
Formulation et générique I. Aspect généraux,
Rapport d'une commission SFSTP, STP Pharma Pratique, **Décembre 2001**.

a: Sciences et Technologie des poudres, Site internet.

DSC AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF A SUBSTITUTED PYRIDOQUINOLINE AND ITS INTERACTION STUDY WITH EXCIPIENTS

D. Abbas¹, J. Kaloustian^{2*}, C. Orneto¹, P. Piccerelle¹, H. Portugal² and A. Nicolay²

¹Laboratoire de Pharmacie Galénique, Pharmacotechnie Industrielle, Biopharmacie et Cosmétologie, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

²Laboratoire de Chimie Analytique, Qualitologie, Nutrition; U.M.R. INSERM 476-INRA 1260, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

The 4,6-bis[2'(diethylamino)ethoxy]2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline (BG 637) is one of the compound from the pyrido[3,2-g]quinolines family. This compound had in vitro activity against the resistant cells and can reverse the multidrug resistance developed during the chemotherapeutic treatments.

To characterize BG 637, techniques such as differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectrometer (FTIR), ultra violet spectrophotometry (UV), gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray powder diffraction (XRPD) were used. Several of them were also used to show the stability of the drug during various storage conditions.

DSC, FTIR and UV were used as screening techniques for assessing the compatibility of BG 637 with several commonly used pharmaceutical excipients. We compared the properties of the pure drug with those of binary mixture drug/excipient. Studied excipients were lactose monohydrate, microcrystalline cellulose, polyvinylpyrrolidone, sodium croscarmellose and magnesium stearate. Melting temperature and enthalpy of BG 637 in binary mixtures were similar to theoretical values. These results showed that BG 637 is a very stable compound and compatible with several pharmaceutical excipients.

Keywords: BG 637, DSC, excipients, interactions, physico-chemical properties, stability

Introduction

In the last years, in chemotherapy, some cures failed because of the appearance of a new phenomenon known as the multidrug resistance (MDR). It is one of the main obstacles to successful cancer chemotherapy and antimicrobial treatments. It can be the result of a variety of mechanisms, which are not all fully understood [1, 2]. The most important one is the alteration of the membrane transport either by decreased drug uptake or by increased drug efflux. One of the methods which were proposed to inhibit it, is the use of a high concentration of cytotoxic drugs to overcome the effects of cell extrusion [1, 3]. Another one consists of a combination of two or more drugs whose aim is to reduce the resistance [3]. Many drugs can inhibit this resistance. These molecules generally are lipophilic, amphiphilic and heterocyclic. Verapamil is the first one found to reverse multidrug resistance in vitro [4]. The phenomenon of MDR led to the necessity to discover new molecules. Thanks to organic chemistry, several molecules were discovered that have a reversal property such as the trimethyl

pyridoquinolines [5]. Some of them present a good activity at a concentration lower than the reference (verapamil, in vitro).

We were interested by one of them. This compound was 4,6-bis[2'(diethylamino)ethoxy]2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline in the following referred to as BG 637 (Fig. 1). Its synthesis and biological activity were investigated by Matias *et al.* [5].

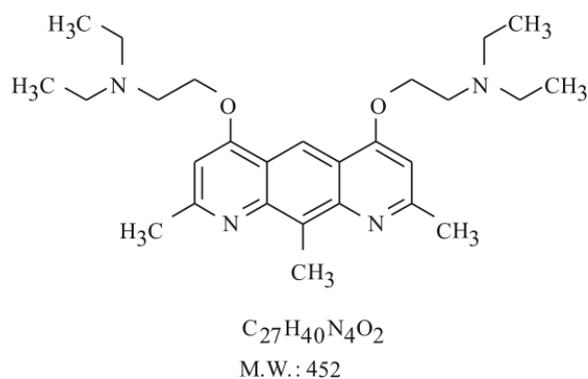


Fig. 1 Chemical structure of BG 637

* Author for correspondence: Jacques.Kaloustian@pharmacie.univ-mrs.fr

In this paper, we proposed a study of physico-chemical properties of this drug, with the aim to establish its properties according to the European Pharmacopoeia. This study was performed by the use of different methods such as differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectrometry (FTIR), X-ray powder diffraction (XRPD) considered generally as reference methods and classical methods as ultra violet (UV) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometries and gas chromatography coupled with mass spectrometer (GC/MS).

The stability of the compound was also investigated in different conditions of storage, according with the International Conference of Harmonization guidelines [6].

For the present work, we selected different excipients in order to realise direct compression formulation with a good free-flowing excipient.

Furthermore, we carried out compatibility studies, mainly by DSC, between BG 637 and several excipients, in order to evaluate physical and chemical interactions and then chose the most proper excipients, with the aim to establish a formulation of tablets.

The study was executed with different excipients [7], which are the following:

- Sodium starch glycolate and sodium croscarmellose, mostly used as disintegrants for tablets,
- Lactose hydrate and mannitol, used as diluents,
- Microcrystalline cellulose widely used as binder and diluent in tablets,
- Hydroxypropylmethylcellulose and polyvinylpyrrolidone (PVP), mostly used as binder,
- Magnesium stearate, working as lubricant during compression,
- Talc was also evaluated that is widely used both as lubricant and diluent.

We analysed drug-excipient mixtures (50:50 mass/mass) stored for different times: time zero, one week, one, two, three, six, twelve and twentyfour months. This work constituted the preformulation study, the necessary step for the preparation of one of the known dosage form of a drug.

Experimental

Physico-chemical characterisation of BG 637

Differential scanning calorimetry (DSC)

The majority of DSC tests were carried out with the use of a DSC Setaram 92 (Scientific and industrial Equipment, Caluire/France) apparatus. Temperatures of DSC cell and enthalpy measurements were calibrated by using indium, tin, bismuth and lead. Samples of about 20 mg were weighed in open aluminium

pans and scanned under static air over a temperature range of 20 to 600°C and a heating rate of 2°C min⁻¹. Pyrolyzed kaolin was used as thermally inert reference product. Any variation of BG 637 placed in experimental crucible was observed by the baseline modifications. Determined temperatures (°C) were: T_{max} (bottom of the peak), T_{onset} (extrapolated). Enthalpy variation was determined for melting peak (ΔH in J g⁻¹) by linear integration according to Setaram software. Temperature accuracy was 0.1°C for melting point and 1°C for other endothermic or exothermic peak.

A second and new apparatus was used (Netzsch DSC 200F3): samples of about 10 mg in an aluminium pan with a lid scanned under static air over a temperature range of 20 to 600°C and various heating rates (1 to 10°C min⁻¹). An empty aluminium pan with a lid was used for reference. Calibration was done as described above. Any difference was not found by authors in the use of open pans and covered pans.

Ultraviolet spectrophotometry (UV)

The UV spectrum was recorded by a Shimadzu UV 2401 apparatus, with 1 cm quartz cell in ethanol solution (Carlo Erba reagent, ACS - for analysis) in the wavelength range of 200 to 400 nm.

Fourier transform infrared spectrometry (FTIR)

FTIR spectrum was recorded on ATI Mattson, Genesis1 spectrophotometer, by mixing the drug with KBr and placed in a cup for diffuse reflectance analysis in the range of 4000–500 cm⁻¹, with a resolution of 4 cm⁻¹. The spectra were scanned by averaging 30 scans for each spectrum.

Gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS)

GC/MS analysis was performed on trace GC DSQ (ThermoFinnigan apparatus). We operated in the electron impact mode under standard conditions (electron energy 70 eV). A thermoTR-5MS column 60 m long×0.33 mm i.d.×0.25 µm film thickness was used with helium as a carrier gas at a linear velocity of 1.5 mL min⁻¹. The injector temperature was set at 250°C. 1 µL of solution (1 g L⁻¹ in methanol) was injected. The column temperature program was monitored from 100 to 300°C at 15°C min⁻¹. Analysis was realized in triplicate.

Nuclear magnetic resonance (NMR)

¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (¹H NMR, ¹³C NMR) spectra were recorded in CDCl₃ using ARX200 and ARX300 Brüker spectrometer. ¹H and

^{13}C nuclear chemical shifts were referred to CDCl_3 (7.24 and 77.0, respectively) as internal standard.

X-ray powder diffraction (XRPD)

XRPD was obtained with an INEL CPS 120 apparatus. The same batch of BG 637 was analysed in different conditions: the first one without any manipulation, the second one, after pulverisation and the third one, after crystallization.

Laser granulometry

This measurement has been performed using a Mastersizer laser granulometer. The sample was placed in the cell which contained water. The particles size between 0.05 to 880 μm , were detected by the lens (300 RF).

Stability study

BG 637 was placed in a hermetic flask according:

- with International Conference of Harmonization (ICH) conditions of storage:
 - * accelerated: at 40°C under 75% relative humidity during six months,
 - * long term: at 5°C during 12 months,
- and out of ICH conditions:
 - * at 25°C without any conditions of relative humidity,
 - * under light (150 Watts), solar radiations and daylight.

Analyses by NMR and UV were done every month during one year and GC/MS after synthesis and at 6 and 12 months. The corresponding spectra and chromatograms were compared with the first one done.

Interaction study between BG 637 and excipients

The study of the interactions of excipients with drug is the essential step in the preformulation stage for the

development of all dosage forms. The physical and chemical interactions between the active substance and excipients can affect the chemical nature, the stability and the bioavailability of drug and consequently its therapeutic efficacy and safety.

Excipients have been classified according to the functions they perform in a formulation, although many excipients perform multiple functions. Diluents, for example, can form a large proportion by mass of a formulated product [8]. Disintegrants tend to swell when wetted, so they are good candidates for the dosage form like granules and powder particles [9, 10]. Binders provide cohesiveness to a powder mixture to ensure that a tablet formulation will be compressible [11, 12]. Lubricants usually are hydrophobic substances that act by coating particles to prevent sticking of the tablet into the tableting machine [12, 13].

DSC is a rapid analytical technique commonly used for evaluating drug-excipient interactions. Any shift of endothermic or exothermic peak and/or variation in the enthalpy values reflects a possible interaction [14]. The interpretation of the thermal data is not always straightforward. To avoid misinterpretation of DSC result, the use of other analytical techniques such as UV and FTIR, as complementary tools, is advisable. We compared the new UV and/or IR spectrum with the spectrum of BG 637 alone and any changes in the first one could be the result of interactions [15].

We have chosen eight excipients which have different functions (two binders, two disintegrants, two diluents and two lubricants). They are described in European Pharmacopeia [16] and usually used in pharmaceutical process technology. Some of them have two different functions. Commercial names, functions and suppliers are presented in Table 1. The mixtures of drug/excipient (200 mg BG 637/200 mg excipient) were stored at 25°C and 60% relative humidity under different conditions of light [10, 17].

Samples were analysed by DSC, UV and FTIR, at different times: zero, one week, one, two, three, six,

Table 1 Pharmaceutical excipients used in the interaction study

Excipient	Commercial name	Function	Supplier
Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)	Methocel E15 LV	Binder	Colorcon
Talc	No name	Lubricant and diluent	Cooper
Mannitol	Pearlitol DC 400	Diluent	Roquette
Crospovidone	Kollidon CL	Binder and diluent	BASF
Lactose monohydrate	Supertab spray dried	Diluent	Seppic
Sodium starch glycolate	Primojel	Desintegrant	Unipex DMV
Magnesium stearate	No name	Lubricant	Cooper
Polyvinylpyrrolidone	Kollidon PVP K 90	Binder	BASF
Polyvinylpyrrolidone	Kollidon PVP K 30	Binder	BASF
Sodium croscarmellose	AcDiSol	Desintegrant	FMC Europe

twelve and twentyfour months, after making the mixture, in order to observe an eventual interaction [18, 19].

Results and discussion

Physico-chemical characterisation of BG 637

DSC analysis

Some attempts were carried out in different heating rates of 1, 2, 5 and 10°C min⁻¹ in order to search any impurities or polymorphic forms. In each test, we performed a first heating, followed by a cooling and at least by another heating. The DSC curve of BG 637 (Table 2 and Fig. 2) shows one endothermic peak corresponding to the fusion. The T_{onset} is constant but the T_{max} increases with an increasing heating rate. The average T_{onset} of the four tests is 139.3°C; the standard deviation is 0.746°C and the relative standard deviation is 0.569%. Similar values were obtained with each DSC apparatus.

UV spectrophotometry analysis

The maximum absorption wavelength was obtained at 256 nm. This analysis was repeated three times with

Table 2 DSC data of BG 637: temperature and enthalpy values of melting (heating) and crystallisation (cooling)

Tests		1	2	3	4
Heating rate/ °C min ⁻¹		1	2	5	10
1 st heating	$T_{\text{onset}}/^{\circ}\text{C}$	139.7	138.7	140.1	140.2
	$T_{\text{max}}/^{\circ}\text{C}$	142.6	142.7	144.2	145.1
	$\Delta H/\text{J g}^{-1}$	-35.7	-34.5	-35.6	-37.1
Cooling	$T_{\text{max}}/^{\circ}\text{C}$	135.0	136.2	134.7	133.2
2 nd heating	$T_{\text{onset}}/^{\circ}\text{C}$	139.3	138.8	139.2	138.0
	$T_{\text{max}}/^{\circ}\text{C}$	142.1	142.3	144.1	145.0
	$\Delta H/\text{J g}^{-1}$	-33.3	-32.3	-34.5	-36.3

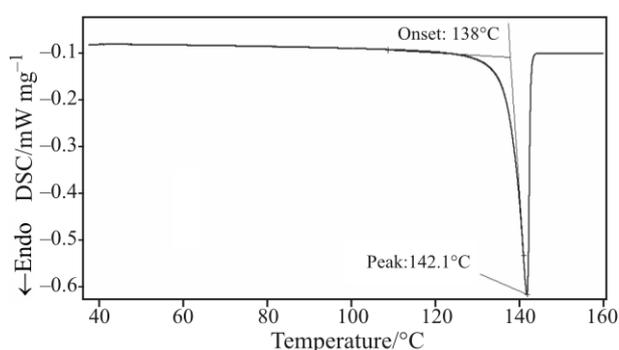


Fig. 2 DSC curves of BG 637 (test done on Netzsch apparatus; heating rate 2°C min⁻¹; heating range 30–160°C; sample 11.6 mg; under static air)

three different batches of the BG 637. Six diluted aqueous standard solutions of BG 637 (1.0 to 6.0 mg L⁻¹) were prepared twice a day during three days. Experimental data measured at 256 nm were used to determine the required analytical parameters such as selectivity (against excipients), range (1.0 to 6.0 mg L⁻¹), linearity ($r=0.997$ in the range 1.0 to 6.0 mg L⁻¹), repeatability (CV=1.13%) intermediate precision (CV=1.92%) and accuracy (101.2±1.5%) [16].

FTIR analysis

The FTIR analysis shows specific peaks: 2600–3000, 1625, 1300–1050 cm⁻¹ correspond to CH₂ and CH₃ aliphatic and CH₃ aromatic, to C=C aromatic and C–O aromatic, respectively (Fig. 3).

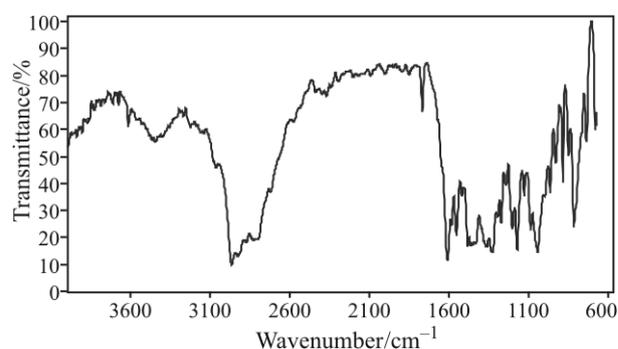


Fig. 3 FTIR spectrum of BG 637 by diffuse reflectance analysis

GC/MS analysis

The chromatogram shows only one peak corresponding to our sample with a retention time of 20.80 min. The mass spectrum (Fig. 4) was characterized by two major m/z peaks: 86 and 100 corresponding respectively to the lateral chains [CH₂N(C₂H₅)₂] and [CH₂CH₂N(C₂H₅)₂]. The molecular structure allows the fragmentation of the lateral chain with two possibilities.

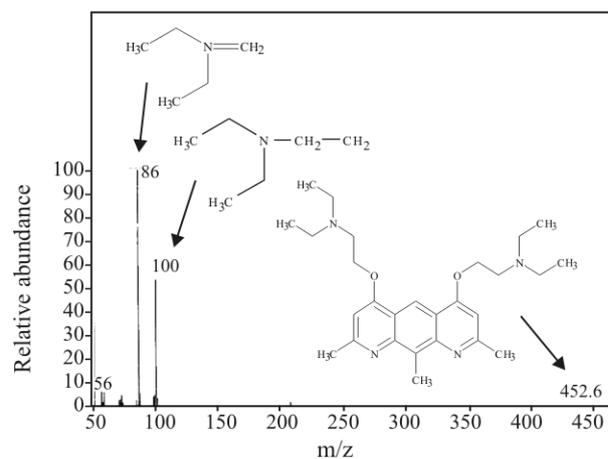


Fig. 4 Mass spectrum of BG 637

Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis

The results were:

- for ^1H NMR (CDCl_3): 1.10 (t, 12H, $J=7.1$, CH_3); 2.70 (m, 14H, 8H CH_2 , 6H, CH_3); 3.10 (t, 4H, $J=6.1$, $\text{CH}_2\text{-N}$); 3.30 (s, 3H, CH_3); 4.25 (t, 4H, $J=6.1$, O-CH_2); 6.55 (s, 2H, H Ar); 8.85 (s, 1H, H Ar).
- for ^{13}C NMR (CDCl_3): 12.26 (CH_3); 12.55 (10-CH_3); 26.87 (2.8-CH_3); 48.07 (CH_2); 51.36 ($\text{CH}_2\text{-N}$); 67.30 (O-CH_2); 99.35 (C-3, C-7); 112.90 (C-5); 118.10 (C-5a, C-5b); 132.36 (C-10); 146.45 (C-10a, C-10b); 160.32 (C-2, C-8); 162.01 (C-4, C-6).

These chemical shifts confirmed the structure of BG 637.

X-ray powder diffraction (XRPD)

The sample treatment does not exert any visible effect on XRPD pattern (Fig. 5). The result suggests that firstly the active substance didn't change and secondly the BG 637 does not form polymorphs.

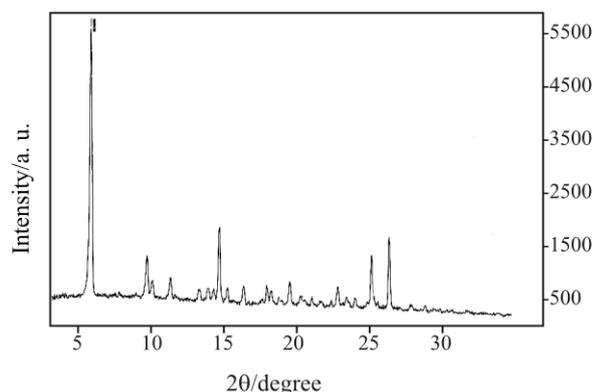


Fig. 5 X-ray powder diffraction pattern of BG 637

Stability study

By the use of NMR, we observed that BG 637 never changed during its stocking as well as at 40°C and at 75% relative humidity and at 4°C in the dark, at 25°C or under solar radiations and daylight. The comparison between the ^1H NMR spectra shows the same spectra as the first one established. So BG 637 seems

to be stable in the studied conditions. These results were confirmed, first by the UV analysis in the same conditions where the spectra were superimposable with the first one established, and secondly by GC/MS where only one peak was observed in every case the same retention time.

The water content was always less than 3% and residual solvents were always less than International Conference Harmonization recommendation Q3C (R3) [20].

Laser granulometry analysis

The average size of particles is $422.86\ \mu\text{m}$ ($D[v, 0.5]$) and $D[v, 0.9]$ is $695.95\ \mu\text{m}$). The graph corresponding to this analysis is a Gaussian curve, confirming the dimensional homogeneity of particles. Some of them can reach $878.67\ \mu\text{m}$.

Interactions study between BG 637 and excipients

DSC analysis

DSC tests were carried according to two steps. First, we analysed all the excipients by DSC at heating rate of 2°C min^{-1} . Results presented in Table 3, concerned the excipients chosen for formulation. The DSC curve of lactose shows an endothermic peak corresponding to the dehydration (bound water) at $T_{\text{max}} 144.2^\circ\text{C}$ and $\Delta H = -72.0\ \text{J g}^{-1}$, a small exothermic event due to the crystalline transition (peak temperature T_{max} at 169.8°C , $\Delta H < 1\ \text{J g}^{-1}$), and a melting point at $T_{\text{onset}} 189.4^\circ\text{C}$, followed by a beginning of oxidation at 224°C . The DSC curve of microcrystalline cellulose, of polyvinylpyrrolidone PVP K30, of sodium croscarmellose and of magnesium stearate show a broad endothermic peak due to the dehydration (humidity loss) at $T_{\text{max}} = 81.7, 75.6, 70.8$ and 73.2°C , respectively.

Based on structural data, it is currently assumed that commercial magnesium stearate consists of either crystalline hydrates (di- or trihydrate, or a mixture there of), or a poorly crystallised anhydrate [15, 21–23]. Even commercial magnesium stearate

Table 3 Peak temperature and enthalpy values of excipients (tests done on Setaram apparatus; heating rate 2°C min^{-1})

Excipients	Characteristic peaks
Lactose monohydrate	Endothermic peak (dehydration): $T_{\text{onset}}=136.5^\circ\text{C}$, $T_{\text{max}}=144.2^\circ\text{C}$, $\Delta H=-72.0\ \text{J g}^{-1}$ Exothermic peak: $T_{\text{onset}}=167.0^\circ\text{C}$, $T_{\text{max}}=169.8^\circ\text{C}$, $\Delta H=+0.81\ \text{J g}^{-1}$ Endothermic peak (fusion): $T_{\text{onset}}=189.4^\circ\text{C}$, $T_{\text{max}}=206.3^\circ\text{C}$, $\Delta H=-134.6\ \text{J g}^{-1}$
Microcrystalline cellulose	Endothermic peak (humidity): $T_{\text{max}}=81.7^\circ\text{C}$, $\Delta H=-52.9\ \text{J g}^{-1}$
Polyvinylpyrrolidone PVP K 30	Endothermic peak (humidity): $T_{\text{max}}=75.6^\circ\text{C}$, $\Delta H=-161.8\ \text{J g}^{-1}$
Sodium croscarmellose	Endothermic peak (humidity): $T_{\text{max}}=70.8^\circ\text{C}$, $\Delta H=-107.9\ \text{J g}^{-1}$
Magnesium stearate	Endothermic peak (dehydration): $T_{\text{max}}=73.2^\circ\text{C}$, $\Delta H=-13.2\ \text{J g}^{-1}$ Endothermic peak: $T_{\text{onset}}=95.6^\circ\text{C}$, $T_{\text{max}}=105.3^\circ\text{C}$, $\Delta H=-13.3\ \text{J g}^{-1}$

contains several hydrates (mono-, di- or trihydrates). Each water molecule is volatilised from about 60 to 110°C. DSC curve shows a second endothermic peak at $T_{max}=105.3^{\circ}C$. In our case, none of observed peak could be due to melting.

For microcrystalline cellulose, polyvinyl- pyrrolidone PVP K 30, sodium croscarmellose and magnesium stearate, we observed a thermal oxidation at 270, 175, 213 and 155°C, respectively.

Each DSC binary mixture BG 637/excipient test (about 20 mg) was carried out like described above. The values of the melting peak temperature and enthalpy, of other peaks for the studied binary mixtures are listed in Table 4. DSC curves show the endothermic peak of humidity in the range of 50 to 71°C, excepted for the lactose. After homogenization of binary mixtures, a part of the moisture volatilized, so this endothermic peak had decreased.

For the mixture BG 637/lactose monohydrate we obtained $T_{max}=141.7^{\circ}C$ and $\Delta H=-55.0 J g^{-1}$ of the 1st endothermic peak corresponding to the half of the sum $\Delta H BG 637+\Delta H$ lactose monohydrate $(-72.0-34.5)/2=-53.3 J g^{-1}$. This observed theoretical mean value of $-53.3 J g^{-1}$ is near of that obtained practically for the mixture $(-55.0 J g^{-1})$. So, no interaction between lactose and BG 637 could be observed at about 141°C. The 2nd endothermic melting peak temperature and enthalpy are lower than the pure lactose monohydrate, due probably to a eutectic formation.

BG 637 in binary mixture (50:50) with the other excipients shows ΔH values $(-17.8$ to $-21.0 J g^{-1})$ near of the theoretical value of $-17.3 J g^{-1}$.

We can conclude that the BG 637 was not degraded and its molecular structure was not changed. Interactions between BG 637 and chosen excipients

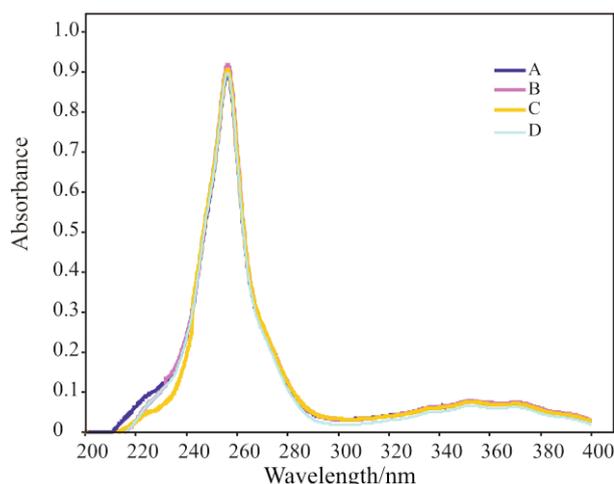


Fig. 6 UV spectra of binary mixture BG 637/mannitol during time (A=time zero, B=after one week, C=after one month in light, D=after one month in darkness)

were not observed. These data will be completed with UV and FTIR analyses.

UV spectrophotometry analysis

For the UV curves obtained in absolute alcohol at time zero, no change was observed with the UV spectrum of BG 637 during two years. These samples were stored and analysed during the storage. The absorption maximum of binary mixture spectra was the same of pure BG 637 (at 256 nm), even with another sugar like mannitol (Fig. 6). There is no degradation peak and no secondary peak appeared.

FTIR analysis

FTIR is one technique used in drug investigation, and has significance in investigations of interactions be-

Table 4 Temperature and enthalpy values of binary mixture BG 637/excipients (lactose, microcrystalline cellulose, polyvinylpyrrolidone PVP K30, sodium croscarmellose, magnesium stearate) (tests done on Setaram apparatus; heating rate $2^{\circ}C min^{-1}$)

Binary mixture	Lactose monohydrate	Microcrystalline cellulose	Povidone PVP K30	Sodium croscarmellose	Magnesium stearate
Endothermic peak (humidity)					
$T_{max}/^{\circ}C$	none	51.5	70.9	52.7	70.6
Endothermic peak					
$T_{onset}/^{\circ}C$	136.8	136.8	137.5	137.1	137.4
$T_{max}/^{\circ}C$	141.7	142.6	142.5	142.4	141.0
$\Delta H/J g^{-1}$	-55.0	-19.1	-17.8	-21.0	-21.0
Endothermic peak					
$T_{onset}/^{\circ}C$	186.8	none	none	none	none
$T_{max}/^{\circ}C$	191.5				
$\Delta H/J g^{-1}$	-16.7				
Exothermic peak					
$T_{onset}/^{\circ}C$	196.0	none	137.5	none	none
$T_{max}/^{\circ}C$	198.4		176.0		
$\Delta H/J g^{-1}$	+29.6		+3.0		

tween drugs and excipients in pharmaceutical formulations. Appearance of new IR absorption band(s); broadening of band(s); alteration in intensity are the main characteristics which provide interactions between drug and excipients. We proceed like it was described above. For each sample mixture (in light and darkness), we obtained a specific spectrum. For each mixture, the spectra were superimposed with BG 637 spectrum in order to see the changes. There is no new IR absorption band, no alteration in intensity or other changes observed.

Conclusions

A review of the literature on drug-excipient interactions shows that the mechanism of the interaction is often not clear. Excipients have traditionally been thought to be an inert support for drugs, but this is outdated, because they often contain reactive functional groups. These functions can involve some chemical transformations. The physical interactions can affect the speed of dissolution or the uniformity of the dosage of a solid formulation. The chemical interactions can involve the degradation of the active substance, with formation of impurities, for example [19, 24]. For example, lactose with alcohol functions could interact with amine functions of the BG 637. DSC curves, UV and FTIR spectra showed no changes. No interactions between the BG 637 and the chosen excipients were observed. So, these studied compounds could be integrated in a tablet formulation.

The physical characterization of the active substance is crucial to the successful development of the final drug. The full characterization of the active substance is necessary in order to understand the chemical and physical properties of the material [25]. The spectroscopic techniques became an integral part of the physico-chemical characterization of pharmaceutical solids [26].

Studies of drug-excipients compatibility represent an important step in the formulation stage for the development of all dosage forms (ICH Q8) [27]. The success of the formulation depends not only on the physical and chemical properties of the active substance but also on the excipients, which are typically the major component of any solid-state formulation. Different excipients were tested for their compatibility with the active substance. The results confirmed how useful can be DSC for evaluating the drug-excipient interactions at the earliest stage of formulation studies. The presence of solid-solid interaction does not necessarily indicate pharmaceutical incompatibility, the use of other analytical techniques, such as FTIR helps in the interpretation of DSC results, in order to confirm the interpretation, of the DSC results.

In the present case the DSC results, supported by UV and FTIR analyses, showed that all the tested excipients are compatible with BG 637. Interaction studies between drugs and excipients are more and more performed by thermal analysis techniques [28, 29].

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Miss Florence Chaspoul (Faculty of Pharmacy, Marseille), Mrs Jean-Pierre Astier and Dr Stéphane Veessler (Research Center in Condensed Mater, Faculty of Sciences, Marseille Luminy) for their helpful discussions and suggestions.

References

- 1 E. Teodori, S. Dei, S. Scapecchi and F. Gualtieri, *Il Farmaco*, 57 (2002) 385.
- 2 M. Volm and J. Mattern, *Crit. Rev. Oncog.*, 7 (1996) 227.
- 3 P. Olliaro, *Pharmacol. Ther.*, 89 (2001) 207.
- 4 T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi and Y. Sakurai, *Cancer Research*, 41 (1981) 1967.
- 5 C. Matias, A. Mahamoud, J. Barbe, B. Pradine and J. C. Doury, *Heterocycles*, 43 (1996) 1621.
- 6 ICH Harmonised Tripartite Guideline, Stability Testing of New Drug Substances and Products, ICH Q1A(R2). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (CPMP/ICH/2736/99), 2003.
- 7 R. C. Rowe, P. J. Sheskey and P. J. Weller, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4th Ed., Pharmaceutical Press (PhP) and American Pharmaceutical Association (APhA), London and Chicago 2003.
- 8 A. R. Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Mack Publishing Company., Easton PA 1990.
- 9 A. E. Aboutaleb, A. M. Attia and F. S. Habib, *Pharmazie*, 38 (1983) 473.
- 10 H. A. Liebermann, L. Lachman and J. B. Schwartz, *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, 2nd Revised and Expanded Ed., 1996.
- 11 O. A. Itiola and N. Pilped, *Int. J. Pharm.*, 31 (1986) 99.
- 12 S. Y. Lin, *J. Pharm. Sci.*, 77 (1988) 229.
- 13 Z. T. Chowhan, *Pharm. Technol.*, 17 (1993) 72.
- 14 P. C. Mora, M. Cirri and P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 42 (2006) 3.
- 15 A. A. Araujo, S. Storpirtis, L. P. Mercuri, F. M. Carvalho, M. dos Santos Filho and J. R. Matos, *Int. J. Pharm.*, 260 (2003) 303.
- 16 EDQM and European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, *European Pharmacopoeia*, 6th Ed., Council of Europe, Strasbourg 2008.
- 17 I. I. Jivraj, L. G. Martini and C. M. Thomson, *Pharm. Sci. Technol. Today*, 3 (2000) 58.
- 18 United States Pharmacopoeia-National Formulary, *USP 30 - NF 25*, Rockville 2007.
- 19 C. L. Winek, *Drugs Pharm. Sci.*, 103 (2000) 59.

- 20 ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities: Residual Solvents, ICH Q3C(R3). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (CPMP/ICH/283/95), 1997.
- 21 P. Bracconi, C. Andres, A. N'Diaye and Y. Pourcelot, *Thermochim. Acta*, 429 (2005) 43.
- 22 P. Bracconi, C. Andres and A. N'Diaye, *Int. J. Pharm.*, 262 (2003) 109.
- 23 S. Sharpe, M. Celik, A. Newman and H. Brittain, *Struct. Chem.*, 8 (1997) 73.
- 24 P. Crowley and L. Martini, *Pharm. Technol. Eur.*, 13 (2001), 26–28 see also 30–32, 34.
- 25 S. Byrn, R. Pfeiffer, M. Ganey, C. Hoiberg and G. Poochikian, *Pharm. Res.*, 12 (1995) 945.
- 26 H. G. Brittain, S. J. Bogdanowich, D. E. Bugay, J. DeVincentis, G. Lewen and A. W. Newman, *Pharm. Res.*, 8 (1991) 963.
- 27 ICH Harmonised Tripartite Guideline, Pharmaceutical Development, ICH Q8. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (CPMP/ICH/167068/04), 2005.
- 28 G. G. G. Oliveira, H. G Ferraz and J. S. R. Matos, *J. Therm. Anal. Cal.*, 79 (2005) 267.
- 29 M. Laszcz, B Kosmacinska, K. Korczak, B. Simigielska, M. Glice, W. Maruszak, A. Groman, H. Beczkowicz and L. Zelazko, *J. Therm. Anal. Cal.*, 88 (2007) 305.

Received: February 18, 2008

Accepted: April 15, 2008

DOI: 10.1007/s10973-008-9062-7

Analysis of pyridoquinoline derivatives by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry

Y. Picó^{1*}, G. Font¹, R. Balaña-Fouce², C. Ordóñez², D. Abbas³ and J. Barbe³

¹Laboratori de Toxicologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, Spain

²Departamento de Farmacología y Toxicología (INTOXCAL), Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

³GERCTOP-UMR CNRS 6009, Faculté de Pharmacie, 27 Bd J. Moulin, Université de la Méditerranée 13385, Marseille cedex 5, France

Received 16 February 2001; Revised 26 March 2001; Accepted 27 March 2001

A method using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC/APCI-MS) has been developed for the characterization and determination of pyridoquinoline derivatives 4,6-bis(dimethylaminoethylamino)-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline, 4,6-bis(dimethylaminoethoxy)-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline and 4,6-bis[(dimethylaminoethyl)thio]-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g] quinoline, all with potential antitumor properties. LC separation was performed on a conventional C₁₈ column using a binary mobile phase composed of acetonitrile and 50 mM aqueous ammonium formate at pH 3. The APCI mass spectra obtained showed that proton addition giving [M + H]⁺ was the common mode of ionization to the amino- and thiopyridoquinolines, whereas the alkoxy pyridoquinoline was identified by the main formation of the [M – (C₂H₅)N(CH₃)₂ + H]⁺, followed by the [M + H]⁺ ion. The LC separation conditions and MS detection parameters were optimized for the determination. The analytical method was also applied to the determination of these pyridoquinoline derivatives in fetal calf serum using liquid-liquid extraction with dichloromethane. Acceptable recovery values were obtained, ranging between 45 and 98%. Copyright © 2001 John Wiley & Sons, Ltd.

Understanding drug action mechanisms is fundamental to the design of new molecules with good pharmacological potential and low toxicity.^{1,2} Quinoline derivatives have long been used as antiparasitic agents.^{3,4} Chloroquine and amodiaquine belong to the same group of 4-aminoquinolines and have many pharmacological and clinical characteristics. They have saved millions of lives and prevented hundreds of millions of malaria cases.⁵

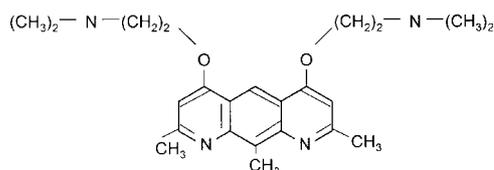
Pyridoquinoline derivatives are less well known, but their antimalarial and antihelmintic activities have been described.^{6,7} Recent unpublished preclinical use of 4,6-dialkoxy-, 4,6-bis(alkylamino)- and 4,6-bis(alkylthio)pyrido[3,2-g]quinoline derivatives, currently under development for their potential antimalarial, diuretic, clastogenic and antimicrobial characteristics, has also suggested that these compounds have antitumor properties.⁸ In these studies, which verify antiproliferative activity by cytotoxic assays in the cell types CHO-K1 and A-Mel-3, three compounds (see Fig. 1) showed optimal properties. Pyridoquinolines are planar molecules bearing protonable groups that can intercalate between the base pairs of DNA. Similarly to aminoacridines, these compounds are potential inhibitors of DNA replication and transcription machinery, such as DNA

topoisomerase I, the enzyme responsible for supercoiled DNA relaxation.⁹

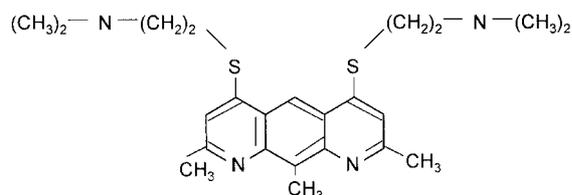
Although the initial data are promising, more complex animal tests are needed to determine whether the antitumor properties of these compounds can be useful in therapies applied to human beings. Pharmacokinetic studies are the next step in the development of useful compounds, and the information they generate is regarded as necessary before proceeding with long-term and carcinogenicity testing. A knowledge of the concentrations of the parent compounds and of any metabolites in plasma and tissue, combined with the rate of change of further dose or cessation of administration, makes it possible to identify the most appropriate animal species for testing a compound.^{2,3}

It must be emphasized at the outset that the key to successful kinetic studies is the development of highly specific analytical methods that measure the concentration of a chemical without interference from metabolites, and are sensitive enough to define the terminal slope accurately. LC methods for quantifying other quinoline derivatives with some structural similarities have recently been reported.^{10–12} Aminoimidazoquinoline and -quinoxaline derivatives have been successfully determined in a commercial beef extract using electrochemical, fluorescence, electrospray-MS and atmospheric pressure chemical ionization MS detection.^{10–12} The sorption coefficient of quinoline to humic acid was directly determined at different pH values by means of LC,

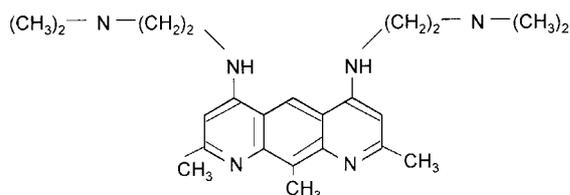
*Correspondence to: Y. Picó, Laboratori de Toxicologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, Spain.
Email: pico@uv.es



4,6-Bis(dimethylaminoethoxy)-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline
Alkoxy pyridoquinoline



4,6-Bis(dimethylaminoethylthio)-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline
Thiopyridoquinoline



4,6-Bis(dimethylaminoethylamino)-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline
Aminopyridoquinoline

Figure 1. Chemical structures of pyridoquinoline derivatives that exhibit antitumor properties.

demonstrating that the application of a humic acid stationary phase is a valuable complement to other techniques.¹³ Metabolic studies have also been conducted with five mono- and difluorinated 4-methylquinolines. The LC analytical data showed the metabolic patterns of these five compounds.¹⁴ The few reports available indicate that LC is

the technique of choice for determining these compounds, but, to our knowledge, no further attempts have been made to apply this technique to any other type of quinoline derivatives.

It should be emphasized that the development of automated analytical techniques with high sensitivity and specificity, such as LC/MS, has allowed us to reach the full potential of pharmacokinetics as a source of information on in vivo drug absorption, distribution and elimination, and thus has resulted in these techniques being applied increasingly to pharmacological problems in laboratory animals.^{15,16}

The purpose of the present study was to develop a reliable quantitative analytical method for the determination of 4,6-bis(dimethylaminoethylamino)-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline, 4,6-bis(dimethylaminoethoxy)-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline and 4,6-bis(dimethylaminoethylthio)-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline (Fig. 1) in bovine serum, using MS techniques that will be utilized in future animal experiments with these novel therapeutic substances.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

4,6-Bis(dimethylaminoethylamino)-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline, 4,6-bis(dimethylaminoethoxy)-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline and 4,6-bis(dimethylaminoethylthio)-2,8,10-trimethylpyrido[3,2-g]quinoline were supplied by Dr. J. Barbe, Study and Research Group in Therapeutic, Organic and Physical Chemistry (GERCTOP), Faculty of Pharmacy, University of the Mediterranean, France. Stock solutions (100 µg mL⁻¹) of each pyridoquinoline, and working solutions and mixtures, were prepared in distilled water and stored at 4 °C.

Bovine fetuin from newborn calf serum collected from bovine calves aged 10 days old or less was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile and dichloromethane (HPLC grade) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was prepared by ultrafiltration of distilled water with a Milli-Q system (Millipore; Bedford, MA, USA). Ammonium formate (97%) was obtained from Aldrich (Madrid, Spain) and ammonium hydroxide (30%) was from Panreac (Barcelona, Spain).

Table 1. Important mass spectral fragments and their relative abundances (RA%) obtained by LC/APCI-MS at different fragmentor voltages

Compound	M (Da)	Molecular formula	Fragmentor at 80 V		Fragmentor at 120 V	
			<i>m/z</i> & tentative ion assignments	RA%	<i>m/z</i> & tentative ion assignments	RA%
Alkoxy pyridoquinoline	396	C ₂₃ N ₄ O ₂ H ₃₂	397 [M + H] ⁺	60	397 [M + H] ⁺	60
			326 [M - (CH ₃) ₂ N(C ₂ H ₅) + H] ⁺	100	326 [M - (CH ₃) ₂ N(C ₂ H ₅) + H] ⁺	100
					255 [M - (C ₂ H ₅)N(CH ₃) ₂ - (C ₂ H ₅)N(CH ₃) ₂ + H] ⁺	60
Thiopyridoquinoline	428	C ₂₃ N ₄ S ₂ H ₃₂	429 [M + H] ⁺	100	429 [M + H] ⁺	100
					326 [M - SHC ₂ H ₂ N(CH ₃) ₂ + H] ⁺	10
					255 [M - SHC ₂ H ₂ N(CH ₃) ₂ - (C ₂ H ₅)N(CH ₃) ₂ + H] ⁺	10
Aminopyridoquinoline	394	C ₂₃ N ₆ H ₃₄	395 [M + H] ⁺	100	395 [M + H] ⁺	100
					350 [M - HN(CH ₃) ₂ + H] ⁺	15

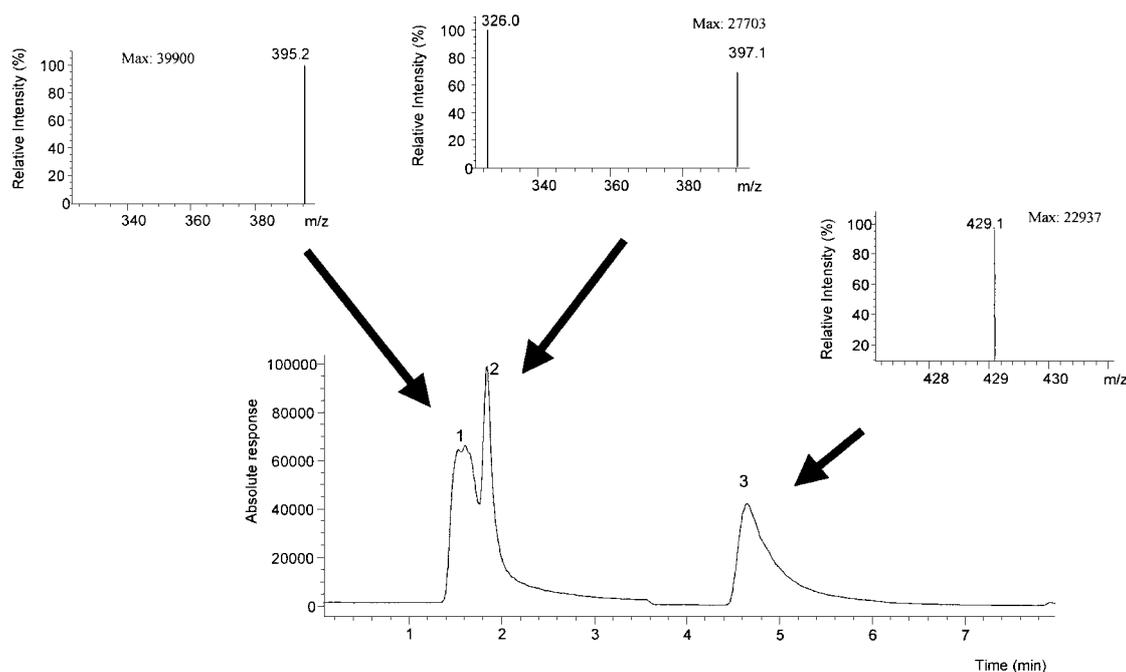


Figure 2. LC/APCI-MS chromatograms and full scan mass spectrum of a mixture of three compounds. Peak identification: 1. aminopyridoquinoline; 2. alkoxypridoquinoline; and 3. thiopyridoquinoline.

All the solvents and solutions were passed through a 0.45- μm cellulose filter from Scharlau (Barcelona, Spain) before use.

Sample preparation

Between 5 and 50 μL (corresponding to 10 to 5000 ng) of the stock solutions were added to 1 mL of serum in 10-mL glass tubes, basified with 100 μL of ammonium hydroxide (9 M) and extracted with 1 mL of dichloromethane. The tubes were vortexed for 2 min and centrifuged at 3500 rpm for 15 min. The organic phase (lower phase) was transferred to another glass tube and evaporated under a steam of nitrogen at room temperature. The residue was reconstituted with 200 μL of the mobile phase.

Instrument and conditions

A Hewlett Packard (Palo Alto, CA USA) HP-1100 Series LC/MSD system equipped with a binary solvent pump, an autosampler, and an MSD coupled to an analytical workstation, was used. The MSD consisted of a standard API source configured as APCI. A Luna C_{18} (150 \times 4.6 mm i.d., 5 μm) stainless steel column connected to a guard cartridge C_{18} (4 \times 3 mm i.d., 5 μm) were both from Phenomenex

(Macclesfield, UK). The solvents used as mobile phase were methanol and water. The mobile phase selected for LC/APCI-MS at the flow rate of 1 mL/min was acetonitrile 15% and 85% ammonium formate (50 mM) at pH 3.

Typical operating conditions of the APCI interface in positive mode were: vaporizer temperature, 400 $^{\circ}\text{C}$; nebulizer gas, nitrogen at a pressure of 60 bar; drying gas, also nitrogen, at a flow rate of 8 L/min and temperature of 350 $^{\circ}\text{C}$; needle voltage 4000 V, and corona current 4 μA .

Full-scan LC/MS chromatograms were obtained by scanning from m/z 240–440 with a scan time of 0.68 s. Time-scheduled selected-ion monitoring (SIM) of the most abundant ion of each compound was used for quantification. The dwell time for ions was set at 199 ms for the two ions monitored simultaneously (m/z 326 and 295) and at 400 ms for the m/z 429 ion. The SIM was performed using the 'high resolution' setting of the instrument.

RESULTS AND DISCUSSION

To optimize the LC/MS conditions, different parameters that can influence mass spectra were checked in APCI positive mode. The drying and nebulizer nitrogen flow rates,

Table 2. Precision of pyridoquinolines determination at different concentrations

Compound	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (n = 10)					
	0.5		1		2	
	Mean recovery (%)	CV (%)	Mean recovery (%)	CV (%)	Mean recovery (%)	CV (%)
Alkoxypridoquinoline	65	6.7	87	4.0	92	3.3
Thiopyridoquinoline	76	7.0	93	4.2	98	4.0
Aminopyridoquinoline	45	6.0	65	4.4	71	2.8

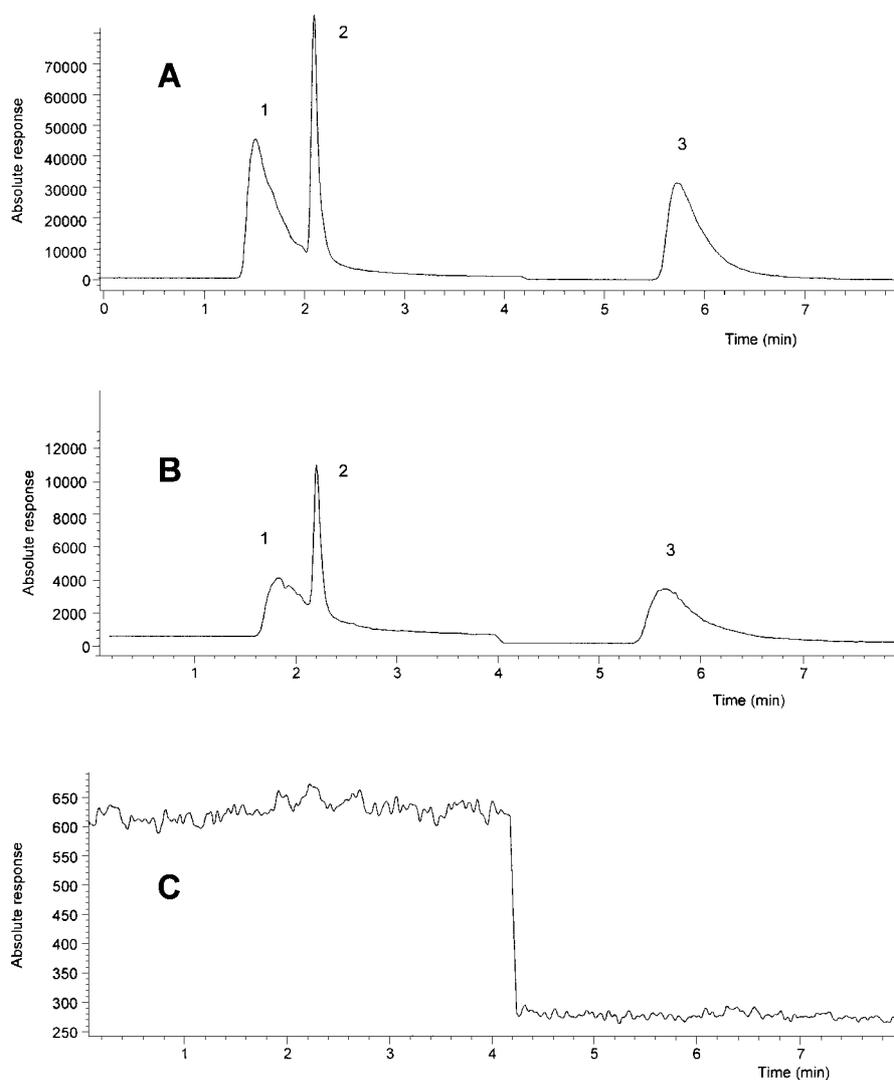


Figure 3. Representative chromatograms in SIM mode of pyridoquinolines in serum extracts: (A) spiked serum at $2 \mu\text{g mL}^{-1}$; (B) spiked serum at $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$; and (C) unspiked serum. Peak identification as in Fig. 2.

the vaporizer and drying temperatures, and the corona and cone potential, were varied in flow injection analysis (FIA) experiments with the pure analytes ($5 \mu\text{L}$ of 10 mg L^{-1} individual standard solutions). Although modification of these parameters did not drastically improve the sensitivity, the optimal working conditions were those reported in the Experimental section.

For the evaluation of spectral information, FIA was also used and mass spectra were obtained in full-scan mode. The fragmentor voltage was varied from 10 to 120 V in order to find the maximum sensitivity using the optimum LC/MS conditions. The effect of modifying the fragmentor voltage on the production of diagnostic ions is illustrated in Table 1. The APCI ionization of the thiopyridoquinoline and aminopyridoquinoline compounds was characterized by predominant formation of the $[\text{M} + \text{H}]^+$ ion, whereas the alkoxythiopyridoquinoline was identified by the main formation of the $[\text{M} - (\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5) + \text{H}]^+$, followed by the $[\text{M} + \text{H}]^+$ ion. The highest response for most of these compounds was obtained at 90 V, so for maximum sensitivity this value was chosen for quantification. Additional fragment ions were

observed (Table 1) when the fragmentor voltage was increased to 120 V. The other pyridoquinolines exhibited different fragmentation patterns (Table 1).

In order to establish the chromatographic conditions for separating the pyridoquinoline derivatives, variables such as pH and the composition of the mobile phase were studied. Different binary phases of acetonitrile/50 mM ammonium formate, or methanol/50 mM ammonium formate, at different pH values, were tested. With methanol in the mobile phase instead of acetonitrile there was a broadening of the peaks, resulting in a peak shape that was inadequate for quantitation. For this reason an acetonitrile/50 mM ammonium formate composition was chosen for the determination. The mixtures contained between 2 and 25% acetonitrile and the pH varied from 3 to 7. At neutral pH, pyridoquinoline derivatives (except aminopyridoquinoline) were retained in the stationary phase because they are not ionizable. At pH 3.0 all the compounds can be separated, as shown in Fig. 2, which shows the chromatogram of a standard solution of these compounds at this pH with a mobile phase containing 15% acetonitrile. The LC peak shapes are

disappointing. Different gradients were assessed, but no improvement in the peak shape, resolution or analysis time was obtained.

The response as a function of concentration was measured by a 5-point calibration curve with a dynamic range that extended over 3 orders of magnitude ($0.5\text{--}500\ \mu\text{g mL}^{-1}$). The data were obtained in triplicate for each concentration. The instrumental detection limits (LODs) were calculated from ($3S_b/\text{slope of the calibration curve}$), where S_b is the standard deviation of a blank measurement. LODs were 1.0, 0.25, and $0.5\ \text{ng}$ for aminopyridoquinoline, alkoxypridoquinoline and thiopyridoquinoline, respectively. The volume injected was $5\ \mu\text{L}$. If lower concentrations must be determined this may be possible by injecting a larger volume (up to $5\ \mu\text{L}$). The detector response was linear over the studied range, with correlation coefficients that were always better than $r^2\ 0.9994$.

The next step was to develop a quantitative protocol for these target analytes that could readily be applied to a pharmacokinetic study. To achieve the optimal method detection limits, selected ion monitoring (SIM) was used. The following mass-to-charge (m/z) values were chosen: $m/z\ 326$ (alkoxypridoquinoline), $m/z\ 395$ (aminopyridoquinoline) and $m/z\ 429$ (thiopyridoquinoline). The first two ions were monitored during the initial 4 min and the last one for 4.1 min to the end of the chromatographic run (8 min). In spite of the use of a single step liquid-liquid extraction, with neither a primary clean-up step nor solid-phase extraction, the detection limits were satisfactory. Figure 3 illustrates representative chromatograms of blank serum and of serum samples spiked to different concentrations. No interference from endogenous substances was observed in any of the samples. The limits of quantification (LOQs) were determined as the lowest concentration of compound that gave a response that could be quantified with a inter-assay standard deviation (RSD) of less than 26% and ranged from 0.05 to $0.2\ \text{mg mL}^{-1}$ (extraction procedures provided a factor concentration of 5-fold). Moreover, Fig. 3(B) shows that $0.25\ \mu\text{g mL}^{-1}$ of each studied compound in bovine serum is well above the LOQ. The relevant pharmacological levels for these compounds in plasma are under study. However, for most substances, these levels usually range from $0.2\text{--}2\ \mu\text{g mL}^{-1}$.

Bovine serum samples spiked with different concentrations ($0.5\text{--}10\ \mu\text{g mL}^{-1}$) of a standard mixture of compounds studied were extracted and analyzed to determine the recoveries (Table 2). The recoveries were between 45.0 and 98.0%, and CV values were between 2.8 and 7.0%; the lower recovery values were always obtained for the amino compound. Although the results are satisfactory for determining these compounds in pharmacokinetic studies, the recoveries showed a strong dependence on concentration. Because of this finding, the use of an internal standard would be recommended. In real pharmacological studies, focused on one of the compounds, the others could be used as internal standards.

Matrix effects derived from bovine serum were also tested. The lack of interference caused by matrix components was assessed by running in parallel matrix-extracted and

solvent-based standards of the same concentration. The calibration curves were constructed using a least-squares linear regression. The slopes obtained with standards and spiked extracts were almost the same, and the covariance analysis showed that the calculated F values were lower than the tabulated one indicating that these linear plots were parallel ($P < 0.05$), thus demonstrating that coextracted compounds do not seriously influence the ionization process.

The results show acceptable recoveries, adequate performance and good detection limits for determining the three compounds in serum samples.

CONCLUSIONS

This report presents a simple isocratic reversed-phase LC assay for pyridoquinoline derivatives in serum using a rapid single-step liquid-liquid extraction technique. This method has a short analysis time per sample, with a detection limit acceptable for pharmacokinetic studies.

Moreover, the pyridoquinoline derivatives studied were characterized by APCI-MS. The interface gives primarily molecular weight information and does not promote fragmentation. APCI spectra of pyridoquinolines typically provided intense molecular ions in positive-ion mode, except in the case of alkoxypridoquinoline, for which the fragment $[M - (C_2H_2)_2N(CH_3)_2 + H]^+$ is the major one.

Although the specificity of the proposed method seems adequate, future work will focus on the characterization of these compounds by LC/MS/MS, which allows a more reliable identification of the detected and unknown compounds.

REFERENCES

- Dorato MA, Vodcnik MJ. In *Principles and Methods in Toxicology*. Hayes AW (ed). Raven Press: New York, 1994; 189–219.
- Lin JH. *Drug Met. Dispos.* 1998; **26**: 1202.
- Gringauz A. *Introduction to Medicinal Chemistry. How Drugs Act and Why*, Wiley-VCH: New York, 1997; chap 7.
- Wermuth CG. *The Practice of Medicinal Chemistry*, Academic Press: San Diego, 1999; chap 10.
- Wahlgren M, Perlmann P. *Malaria. Molecular and Clinical Aspects*, Harwood Academic Publishers: Holland, 1999; chap 1.
- Matias C, Mahamoud A, Barbe J, Pradines B, Doury JC. *Heterocycles* 1996; **43**: 1621.
- Singh J, Seth M, Fatma N, Sharma S, Bhaduri AP, Chatterjee RK. *Z. Naturforsch* 1990; **45**: 1210.
- Ordoñez C. PhD Thesis, University of Leon, Spain, 2000.
- Galceran MT, Pais P, Puignou L. *J. Chromatogr. A* 1996; **719**: 203.
- Pérez Y, Ordóñez C, Cubría JC, Villa H, Balaña-Fouce R, Ordóñez D. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 1999; **21** (Suppl. A): 143.
- Galceran MT, Moyano E, Puignou L, Pais P. *J. Chromatogr. A* 1996; **730**: 185.
- Pais P, Moyano E, Puignou L, Galceran MT. *J. Chromatogr. A* 1997; **778**: 207.
- Nielsen T, Siigur K, Helweg C, Jorgensen O, Hansen PE, Kirso U. *Environ. Sci. Technol.* 1997; **31**: 1102.
- Kato T, Hakura A, Mizutani T, Saeki K. *Mut Res. Genetic. Toxicol. Environ. Mut.* 2000; **465**: 173.
- Niessen WMA. *J. Chromatogr. A* 1999; **856**: 179.
- Lee MS, Kerns EH. *Mass Spectrom. Rev.* 1999; **18**: 187.