



**HAL**  
open science

# Mises en forme pharmaceutiques du bleu de méthylène pour le traitement du paludisme : nanoformulations nucléolipidiques et formes orales adaptées

Koffi Kowouvi

## ► To cite this version:

Koffi Kowouvi. Mises en forme pharmaceutiques du bleu de méthylène pour le traitement du paludisme : nanoformulations nucléolipidiques et formes orales adaptées. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0346 . tel-03266622

**HAL Id: tel-03266622**

**<https://theses.hal.science/tel-03266622>**

Submitted on 22 Jun 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES  
SPÉCIALITÉ GÉNIES DES PROCÉDÉS

Par Koffi Mawussé KOWOUI

**Mises en forme pharmaceutiques de bleu de méthylène  
pour le traitement du paludisme : nanoformulations  
nucléolipidiques et formes orales adaptées**

Sous la direction de : Pascal MILLET  
Co-directeur : Luc GRISLAIN

Soutenue le 13 Décembre 2019

Membres du jury :

M. BARTHELEMY, Philippe  
Mme. BENOIT-VICAL, Françoise  
M. DOLLO, Gilles  
M. PRADINES, Bruno  
M. CREPPY, Edmond  
M. CROS, Jean  
M. GRISLAIN, Luc  
M. MILLET, Pascal

Professeur Université de Bordeaux  
Professeur Université de Toulouse  
MCU-PH Université de Rennes 1  
Docteur, IHU Méditerranée Infection, Marseille  
Professeur Université de Bordeaux  
Professeur Université de Toulouse  
Professeur Université de Bordeaux  
MCU-PH Université de Bordeaux

Président  
Rapportrice  
Rapporteur  
Examineur  
Invité  
Invité  
Co-directeur  
Directeur



# CHEMBIOPHARM

Équipe ChemBioPharm

Directeur : Professeur Philippe Barthélémy

Laboratoire ARNA (ARN : Régulations Naturelle et Artificielle) INSERM U1212 –  
CNRS UMR 5320, Université de Bordeaux

Bâtiment de Pharmacie, 3<sup>ème</sup> tranche, 4<sup>ème</sup> étage, 146 Rue Léo Saignat – 33076  
Bordeaux cedex, France



Équipe LTPiB

Directeur : Professeur Luc GRISLAIN

Bâtiment de Pharmacie, 1<sup>ère</sup> tranche, 3<sup>ème</sup> étage, 146 Rue Léo Saignat – 33076  
Bordeaux cedex, France





## **Remerciements :**

Je tiens à remercier le Professeur Philippe Barthélémy, directeur de l'unité ARNA INSERM U1212, CNRS UMR 5320 et de l'équipe ChemBioPharm, pour son accueil au sein de son équipe, mais aussi d'avoir accepté être membre de mon jury de thèse.

Mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse, Dr Pascal Millet, qui m'a fait l'honneur de diriger ce travail, et qui a su être présent pour moi tout au long de mon Doctorat, tout en plaçant en moi une totale confiance, en me laissant une grande autonomie et une certaine liberté dans mon travail. Un grand Merci pour toutes les qualités humaines et professionnelles dont vous avez fait preuve à mon égard, et c'est un vrai bonheur de travailler à vos côtés !

Je souhaite, de la même façon, remercier le Pr Luc Grislain, qui m'a fait l'honneur de co-diriger ce travail de thèse. Je vous suis très reconnaissant pour votre accueil et toutes ces années passées au sein de votre équipe, équipe qui a fait de moi le galéniste que je suis. Je n'oublierai pas tous ces moments d'échanges et vos bons conseils.

Je suis reconnaissant envers mon jury de thèse, le Pr Françoise Benoit-Vical, le Dr Gilles Dollo ainsi que le Dr Bruno Pradines. Merci d'avoir accepté juger ce travail et de siéger à ce jury de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon respect.

Je souhaite de plus exprimer ma gratitude au Pr Edmond Creppy et au Pr Jean CROS pour les différents conseils et la confiance placée en moi.

Un grand merci à la Fondation Pierre Fabre pour avoir soutenu et financé ce projet, mais aussi pour tout le soutien apporté à la filière pharmacie de l'Université de Lomé.

Je remercie l'ensemble du laboratoire ChemBioPharm, et plus particulièrement le Dr Alexandra Gaubert pour son expertise en analytique, ses « relectures sévères » (pour la bonne cause) comme le dirait Sébastien, et sa bonne humeur, le Dr Bruno Aliès pour ces conseils. Je remercie également le Dr Sébastien Benizri (coloc de bureau) pour ces bons moments de partages et de rigolades, le Dr Geoffrey Prévot et le Dr Aladin Hamoud pour la bonne ambiance, Julie Baillet et Guillaume Bouguéon pour leur sympathie, à vous le tour bientôt.

Je remercie également l'ensemble du laboratoire LTPIB, pour toutes ces années passées avec les membres, pour toute cette expérience accumulée. Un grand merci à mon mentor Gilles pour son soutien permanent, ses conseils, sa sagesse, son recul permanent, sa transmission de connaissances, ces années de missions au Togo et le partage de tous ces moments. Merci à Emilie « Poupinator », Catherine « Mme qualité », Christine « Mama Vador », Gaele, Emmanuelle « Eh ! Manu... », Angela « JJ swing » et Tina, pour tous ces moments de partages pendant les pauses déjeuner, le soutien, la disponibilité, la bonne ambiance et le sourire lorsque moi je ne l'avais pas quelquefois. Je n'oublie pas Pascale et Denis, merci pour vos conseils.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de pharmacie galénique de l'Université de Rennes 1, pour l'accueil et de m'avoir donné du temps pour la rédaction de ce document. J'espère pouvoir réaliser de grandes choses avec vous.

Mes remerciements vont également au laboratoire Provepharm Life Solutions pour la mise à disposition du BM, aux différents membres du pôle électronique du BIC notamment au Dr Etienne Gontier, Sabrina Lacomme et Mélina Petrel pour la formation et la disponibilité pendant les séances de MET.

Un grand merci également à toute l'équipe de l'IRBA Marseille, notamment Matthieu et Joel pour toute l'aide pendant la réalisation des essais *in vitro* et leur bonne humeur.

Mes remerciements à tous mes amis de l'école de danse ADSL, du groupe de percussion TIM'BODÉ pour tous ces moments de partage et de bonne humeur. Je pense également à la famille Plumard pour leur précieux passage dans ma vie et pour toutes les parties de pétanque de jour comme de nuit. Merci à la famille ORTAL pour l'accueil à mon arrivée en France.

Merci à mes parents, Koffi « moi en plus âgé » et Afiwoa « la dame de fer », mes frères et ma sœur, mes cousins et mes cousines (pour éviter de faire une liste), pour le soutien, la présence, l'aide et tout simplement d'être toujours là pour moi.

Enfin je renouvelle toute mon amitié et ma sympathie à ceux qui m'ont accordé du temps et m'ont témoigné un soutien constant pendant la réalisation de cette thèse.

## Communications orales :

### **Place du Bleu de méthylène (BM) dans le traitement du paludisme : vers une trithérapie pour lutter contre le développement des chimiorésistances ?**

**K. Kowouvi**, G. Lemagnen, B. Alies, J. Dormoi, M. Madamet, D. Malvy, P. Barthelemy, K. Gaudin, L. Grislain, B. Pradines, P. Millet. XXIIèmes Actualités du Pharo, Marseille, France, 5 – 7 Octobre 2016.

### **Molécule miracle dans le traitement du paludisme : le Bleu de Méthylène ?**

M. Gendrot, **K. Kowouvi**, P. Millet, B. Pradines. XXV<sup>èmes</sup> Actualités du Pharo, Marseille, France, 2 - 4 octobre 2019.

### **Approche galénique du Bleu de méthylène pour permettre son utilisation dans le traitement du paludisme.**

**K. Kowouvi**, B. Alies, M. Gendrot, A. Gaubert, G. Vacher, K. Gaudin, J. Mosnier, B. Pradines, P. Barthelemy, L. Grislain and P. Millet. SOAPGI, Abidjan, Cote d'Ivoire, 27-29 Novembre 2019.

## Publication :

**Nucleoside-lipid-based nanocarriers for methylene blue delivery : potential application as anti-malarial drug**, K. Kowouvi, B. Alies, M. Gendrot, A. Gaubert, G. Vacher, K. Gaudin, J. Mosnier, B. Pradines, P. Barthelemy, L. Grislain and P. Millet, RSC Adv., 2019, 9, 18844–18852.

## Brevet :

Une prise de brevet est en cours par l'Université de Bordeaux pour la forme orale gastro-résistante.



# Table des matières

Table des figures .....	12
Table des tableaux .....	14
Table des annexes.....	16
Liste des abréviations .....	17
Introduction générale.....	19
I. Le paludisme.....	21
A. Cycle du paludisme.....	22
1. Étape de l’anophèle.....	22
2. Étape humaine .....	23
B. Évolution de la chimiothérapie contre le paludisme .....	23
C. Traitement préventif du paludisme .....	27
II. Le bleu de méthylène .....	27
A. Historique .....	27
B. Les caractéristiques physicochimiques .....	27
C. La pharmacocinétique .....	28
D. Développement actuel : indications thérapeutiques, recherche clinique, amélioration de la substance active (Exemple de Proveblue®).....	29
E. BM et paludisme .....	30
1. Mécanisme d’action .....	30
2. Efficacité contre les formes asexuées du paludisme .....	31
3. Efficacité contre les gamétocytes (forme sexuée) .....	38
4. Effets secondaires et tolérance .....	38
5. Place du BM dans l’arsenal thérapeutique en développement pour la lutte contre le paludisme .....	39
6. Revue des différentes formes de BM disponibles et en développement.....	41
III. Les objectifs de la thèse .....	44
IV. Les nucléolipides .....	48
A. Nucléolipides naturels.....	49
B. Les nucléolipides synthétiques.....	50
C. Les nucléolipides et les nanoparticules.....	52
V. La lyophilisation .....	53
A. Les différentes étapes du processus de lyophilisation .....	53
1. La congélation .....	54
2. Dessiccation primaire ou étape de sublimation.....	55
3. Dessiccation secondaire .....	55

B.	Les différentes classes d'excipients.....	56
1.	Les agents de masse.....	56
2.	Les agents stabilisants.....	56
3.	Les agents tampons.....	56
4.	Les agents isotonisants.....	57
5.	Les agents tensioactifs.....	57
6.	Les agents antioxydants.....	57
7.	Les agents antimicrobiens.....	57
C.	Les équipements.....	57
D.	Cycle de lyophilisation et paramètres importants.....	58
VI.	Les comprimés.....	59
A.	Les différents types de comprimés.....	59
1.	Les comprimés non enrobés.....	60
2.	Les comprimés enrobés.....	60
3.	Les comprimés spéciaux.....	60
B.	Les excipients.....	61
1.	Les diluants.....	62
2.	Les liants.....	62
3.	Les désintégrants.....	62
4.	Les lubrifiants.....	63
5.	Les autres excipients de compression.....	64
C.	Les voies de fabrication des comprimés.....	65
1.	La compression directe.....	65
2.	La granulation.....	65
D.	Les différentes presses.....	67
1.	La presse alternative.....	68
2.	La presse rotative.....	69
E.	Le pelliculage.....	70
1.	Les solutions ou suspensions filmogènes.....	71
2.	Préparation de la suspension filmogène.....	73
3.	Le process de pelliculage.....	73
	Nanoformulations nucléolipidiques de bleu de méthylène.....	77
I.	Matériel et méthodes.....	80
A.	Formulation des nanoparticules de Bleu de Méthylène.....	80
1.	Les différentes techniques de formulation des NPs à base de nucléolipides.....	80
2.	Etapas de formulation des NPs de BM.....	83

B.	Caractérisation des nanoparticules de BM .....	84
1.	Analyse de la taille et du potentiel Zéta .....	85
2.	Analyse en spectroscopie UV-Visible et rendement d'encapsulation .....	85
3.	Microscopie Electronique à Transmission (MET) et analyse des rayons X à dispersion d'énergie (EDX).....	86
4.	La FT-IR spectroscopie .....	87
C.	Etudes de stabilité .....	87
1.	Stabilité colloïdale dans le NaCl et le RPMI .....	87
2.	Stabilité colloïdale en fonction de la température de conservation.....	87
3.	Évaluation de la bio-réduction .....	88
4.	Évaluation de la photosensibilité .....	88
D.	Les activités <i>in vitro</i> .....	88
1.	Les produits testés.....	89
2.	Test de chimio-sensibilité de <i>P. falciparum</i> .....	89
3.	Détermination des concentrations inhibitrices 50 % (CI <sub>50</sub> ) .....	90
E.	La lyophilisation des NPs .....	90
F.	Les analyses statistiques.....	93
II.	Résultats et discussions.....	94
A.	Études physicochimiques .....	94
1.	Essais de formulation des NPs à base de nucléolipides .....	94
2.	La formulation des BM/diC16dT NPs .....	94
3.	Formulation des BM-NPs.....	102
B.	Études de stabilité des BM-NPs.....	107
1.	Impact de la température sur la stabilité colloïdale des NPs.....	107
2.	Evaluation de la bio-réduction .....	108
3.	Évaluation de la photo-sensibilité .....	109
C.	Évaluation de l'activité antipaludique <i>in vitro</i> des BM-NPs .....	110
D.	Lyophilisation des NPs.....	112
III.	Conclusion .....	118
	Formulation des comprimés gastro-résistants de BM .....	121
I.	Matériels et méthodes .....	124
A.	Matériels.....	124
1.	Les produits .....	124
2.	Les appareillages .....	127
B.	Méthodes .....	127
1.	La préparation de l'environnement de travail .....	127

2.	La préparation du BM.....	127
3.	Fabrication des comprimés nus de BM .....	128
4.	Le pelliculage des comprimés.....	133
5.	Les contrôles pharmacotechniques.....	138
II.	Résultats et discussions.....	142
A.	Le prétraitement du BM.....	142
B.	La fabrication des comprimés nus de BM .....	143
1.	La voie de fabrication par compression directe du BM .....	143
2.	La voie de fabrication par granulation humide suivie d'une compression du BM.....	145
3.	La formulation des comprimés placébos .....	150
C.	L'étape de pelliculage.....	151
1.	Le pelliculage des comprimés placébos .....	151
2.	Le pelliculage des comprimés de BM .....	153
III.	Conclusion .....	156
	Conclusion et perspectives .....	159
	Annexes.....	165
	Références .....	180

## Table des figures

Figure 1 : Cycle de vie du plasmodium.....	23
Figure 2 : Le chlorure de méthylthionium et ses impuretés (EDQM, 2018).....	28
Figure 3 : Le bleu de méthylène et le leucométhylène bleu (Garavito, 2007).....	28
Figure 4 : Catabolisme de l'hème par le glutathion (Garavito, 2007).....	31
Figure 5 : Aperçu du portefeuille global des molécules à visée antipaludique y compris celles soutenues par MMV à différentes étapes de la découverte et du développement (Tse et al., 2019).....	40
Figure 6 : Structure générale d'un nucléolipide (Hamoud, 2018).....	49
Figure 7 : Exemples de nucléolipides naturels, cytidine diphosphodiacylglycérol (A), tunicamycine (B) et liposidomycine (C) (Tonelli, 2013).....	50
Figure 8 : Exemples de structures de nucléolipides synthétisés au laboratoire ChemBioPharm (Gissot et al., 2008).....	51
Figure 9 : Nucléolipide cationique DOTAU (A) et nucléolipide anionique diC16dT (B).....	52
Figure 10 : Diagramme d'état de l'eau pure.....	54
Figure 11 : Mise en évidence du phénomène de surfusion (Bogdani, 2011).....	55
Figure 12 : Lyophilisateur de paillasse Advantage (Biopharma Technologie France).....	58
Figure 13 : Cycle de compression d'une presse alternative.....	69
Figure 14 : Cycle de compression d'une presse rotative (Le Hir et al., 2016).....	70
Figure 15 : Pelliculeuse à turbine perforée Procept®.....	74
Figure 16 : Technique du film lipidique.....	81
Figure 17 : Technique de la nanoprécipitation.....	82
Figure 18 : Technique combinatoire : film lipidique et nanoprécipitation.....	83
Figure 19 : Spectres de la diC16dT (vert), du BM (bleu) et de BM/diC16dT NPs (rouge).....	96
Figure 20 : Signature spectrales des formulations à différents ratios molaires diC16dT / BM.....	96
Figure 21 : Image MET des BM/diC16dT NPs avec acétate d'uranyle (a) et sans agent de contraste (b) (barre d'échelle de 0,5 µm).....	97
Figure 22 : Image MET et spots EDX (a) (barre d'échelle 1 µm) et spectres des spots EDX (b) des BM/diC16dT NPs.....	98
Figure 23 : Spectres des BM/diC16dT NPs et d'une solution BM dans l'EtOH après passage au bain à ultrasons.....	99
Figure 24 : Courbe d'étalonnage du BM dans l'EtOH.....	100
Figure 25 : Analyse spectrale des BM/diC16dT NPs à différentes concentrations de NaCl.....	102
Figure 26 : Spectres des formulations à différents ratios molaires entre diC16dT et DOTAU.....	103
Figure 27 : Image MET des BM-NPs sans agent de contraste (barre d'échelle 500 nm).....	104
Figure 28 : Spectres de la diC16dT (vert), de la DOTAU (orange), d'une solution de BM (bleu) et de BM-NPs (rouge) dans l'eau distillée.....	105
Figure 29 : Spectres des BM-NPs et d'une solution BM après préparation d'échantillon.....	105
Figure 30 : Analyse spectrale des BM-NPs à différentes concentrations de NaCl... ..	106
Figure 31 : Stabilité colloïdale taille et PDI (a), et Zêta (b) des BM-NPs en fonction de la température.....	108

Figure 32 : Evaluation de la bio-réduction des solutions de BM-NPs et de BM.....	109
Figure 33 : Photosensibilité des solutions de BM-NPs et de BM .....	110
Figure 34 : Graphique du cycle de lyophilisation Essai A.....	113
Figure 35 : Contenu des flacons avant et après lyophilisation Essai A .....	114
Figure 36 : Contenu des flacons avant et après lyophilisation Essai B.....	115
Figure 37 : Cycle de lyophilisation de l'essai C .....	117
Figure 38 : Process de fabrication par compression directe du BM.....	129
Figure 39 : Process de granulation humide et de compression du BM .....	130
Figure 40 : Process de compression directe des comprimés placébos .....	133
Figure 41 : Préparation de la suspension d'Eudragit® S100 .....	134
Figure 42 : Préparation de la suspension de Kollicoat® MAE 100P .....	135
Figure 43 : Préparation de la suspension d'Opadry® II .....	136
Figure 44 : Préparation de la suspension de Sureteric® .....	137
Figure 45 : L'analyse granulométrique des grains .....	146
Figure 46 : Floculations observées avec le mélange binaire BM et croscarmellose dans l'eau .....	147
Figure 47 : Aspects des comprimés F9b .....	150
Figure 48 : Aspects des comprimés placébos pelliculés .....	152
Figure 49 : Aspect d'un comprimé F6 pelliculé avec Vivacoat® Protect E .....	153
Figure 50 : Aspects des comprimés pelliculés F9b (sous couche et couche gastro-résistante) .....	155

## Table des tableaux

Tableau 1 : Année d'introduction des antipaludiques et année de déclaration de 1 <sup>er</sup> cas de résistance (Fairhurst and Dondorp, 2016; Kindhauser and Organization, 2003) ..	26
Tableau 2 : Etudes in vitro sur la bithérapie entre le BM et les divers composés antipaludiques .....	33
Tableau 3 : Résumé des différentes études récentes sur le BM pour le traitement du paludisme (Dicko et al., 2018; Lu et al., 2018; Mendes Jorge et al., 2019) .....	35
Tableau 4 : Exemples d'études qui ont utilisées différentes nanotechnologies dans la lutte contre le paludisme.....	43
Tableau 5 : Analyse MOFF de la situation du Bleu de méthylène .....	45
Tableau 7 : Ratios molaires testés pour la formulation BM/diC16dT NPs .....	84
Tableau 8 : Préparations testées pendant les essais de lyophilisation .....	91
Tableau 9 : Cycle de lyophilisation de l'essai A.....	92
Tableau 10 : Cycle de lyophilisation de l'essai B .....	92
Tableau 11 : Cycle de lyophilisation de l'essai C .....	93
Tableau 12 : Caractéristiques physicochimiques des NPs obtenues par l'approche combinatoire.....	94
Tableau 13 : Analyse DLS et Zêta des formulations à différents ratios molaires diC16dT/BM.....	95
Tableau 14 : Analyses DLS des BM/diC16dT NPs à différentes concentrations de NaCl .....	101
Tableau 15 : Analyse DLS et Zêta des formulations à différents ratios molaires diC16dT/DOTAU.....	103
Tableau 16 : Analyses DLS des BM-NPs à différentes concentrations de NaCl.....	106
Tableau 17 : Nombres d'onde des liaisons chimiques du BM, du diC16dT, de la DOTAU et des BM-NPs.....	107
Tableau 18 : Résultats des tests in vitro des BM-NPs .....	111
Tableau 19 : Résultats de la lyophilisation des BM-NPs essai A .....	114
Tableau 20 : Résultats de la lyophilisation des BM-NPs essai B .....	116
Tableau 21 : Résultats de la lyophilisation des BM-NPs essai C .....	118
Tableau 22 : Comparaison physico-chimique des celluloses microcristallines testées .....	124
Tableau 23 : Les produits de pelliculage .....	126
Tableau 24 : Les formulations réalisées en compression directe.....	128
Tableau 25 : Les formules des grains F5, F6, F7 et F9 .....	130
Tableau 26 : Paramétrage du granulateur et les conditions de granulation .....	131
Tableau 27 : Les mélanges de grains de BM et d'excipients (phase externe) avant compression .....	132
Tableau 28 : Formule des comprimés placébos .....	132
Tableau 29 : Formule pour la préparation d'Eugragit® S100.....	134
Tableau 30 : Formule pour la préparation de Vivacoat® Protect E.....	135
Tableau 31 : Formule pour la préparation du Kollicoat® MAE 100P .....	135
Tableau 32 : Formule pour la préparation d'Opadry® II.....	136
Tableau 33 : Formule pour la préparation de Sureteric®.....	136
Tableau 34 : Les paramètres de pelliculage des comprimés placébos et des comprimés F6.....	137
Tableau 35 : Les paramètres de pelliculage des comprimés F9a et F9b .....	138
Tableau 36 : Echelle d'aptitude à l'écoulement ((EDQM, 2018).....	139

Tableau 37 : Ecartés limites en fonction de la masse des comprimés non enrobés (EDQM, 2018).....	140
Tableau 38 : Préparation de 2 L de solution pH 2.....	141
Tableau 39 : Préparation de la solution pH neutre à partir de 800 mL de solution pH 2 .....	142
Tableau 40 : Homogénéité et écoulement des mélanges avant compression.....	143
Tableau 41 : Les contrôles pendant et après compression directe des mélanges...	144
Tableau 42 : Les contrôles réalisés sur les grains F5, F6 et F7 .....	147
Tableau 43 : Les contrôles réalisés sur le grain et le mélange final F9.....	148
Tableau 44 : Les contrôles réalisés sur les comprimés nus F5, F6, F7 et F8.....	149
Tableau 45 : Les contrôles réalisés sur les comprimés nus F9a et F9b .....	149
Tableau 46 : Les contrôles des comprimés pelliculés F9a.....	154
Tableau 47 : Les contrôles des comprimés pelliculés F9b.....	155



## Table des annexes

Annexe 1 : Formule chimique de l'acétate d'uranyle .....	165
Annexe 2 : Centrifugation des NPs avec obtention d'un culot .....	165
Annexe 3 : Certificat d'analyse du bleu de méthylène.....	166
Annexe 4 : Liste des appareils.....	167
Annexe 5 : Les courbes CI <sub>50</sub> des tests in vitro .....	168
Annexe 6 : Publication des travaux dans RSC Advances .....	171

## Liste des abréviations

AMO	Amodiaquine
ARN	Artémisinine
ARS	Artésunate
ART	Artéméther
Asc	Acide ascorbique
ATO	Atovaquone
ATV	Atorvastatine
BM	Bleu de méthylène
CI <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice 50
CQ	Chloroquine
CTA	Combinaison thérapeutique à base d'Artémisinine
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DHA	Dihydroartémisinine
diC16dT	Thymidine 3'-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphate)
DLS	Diffusion Dynamique de la lumière ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DOPC	Dioléoylphosphatidylcholine
DOTAU	2',3'-dioleoyl-5'-déoxy-5'-triméthyl-ammonium-uridine
DOX	Doxycycline
EtOH	Ethanol absolu
GRs	Globules rouges
HPMC	Hydroxypropylméthyl cellulose
HR	Humidité résiduelle
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
IRBA	Institut de Recherche Biomédicale des Armées
LUM	Luméfantine
MEF	Méfloquine
MOFF	Menaces Opportunités Forces et Faiblesses
NLs	Nucléolipides
NPs	Nanoparticules
OMS	Organisation Mondiale pour la Santé
PDI	Indice de polydispersité
PG	Proguanil
PPQ	Pipéraquine
PQ	Primaquine
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PYR	Pyriméthamine
QN	Quinine
QSP	Quantité suffisante pour
R&D	Recherche et développement
RCPA	Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>

SNALPs	Particules lipidiques stables d'acide nucléique ( <i>Stable Nucleic Acid Lipid Particles</i> )
SP	Sulfadoxine–pyriméthamine
T <sub>f</sub>	Température de fusion
T <sub>g</sub> '	Température de transition vitreuse
T <sub>sN</sub>	Température d'apparition des premiers cristaux de glace

# **Introduction générale**



## I. Le paludisme

Le paludisme est une infection parasitaire des globules rouges (GRs) potentiellement mortelle, transmise par la piqûre d'un moustique anophèle femelle hématophage. Le paludisme reste l'une des maladies les plus meurtrières au monde, principalement dans les pays situés sur la ceinture équatoriale du globe.

Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) au niveau mondial, le nombre de cas de paludisme était estimé à 219 millions en 2017. La plupart des cas (200 millions ou 92 %) ont été enregistrés dans la région Afrique de l'OMS, loin devant la région Asie du Sud-Est (5 %) et la région Méditerranée orientale (2 %). Les pays les plus touchés par rapport au nombre total de cas sont le Nigéria (25 %), la République démocratique du Congo (11 %), le Mozambique (5 %), l'Inde (4 %) et l'Ouganda (4 %) (Organisation mondiale de la santé, 2018).

C'est la maladie parasitaire la plus fréquente chez l'homme et souvent la cause la plus fréquente de fièvre sous les tropiques. Les infections palustres humaines sont causées par *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi* (White, 2014). *P. falciparum* est le parasite le plus prévalent dans la région Afrique de l'OMS ; il est en effet à l'origine de 99,7 % des cas de paludisme estimés en 2017, tout comme dans les régions Asie du Sud-Est (62,8 %), Méditerranée orientale (69 %) et Pacifique occidental (71,9 %). *P. vivax* prédomine dans la région Amériques de l'OMS, représentant 74,1 % des cas de paludisme (Organisation mondiale de la santé, 2018).

Au niveau mondial, le nombre de décès dus au paludisme a été estimé à 435 000 en 2017, contre 451 000 en 2016. À elle seule, la région Afrique de l'OMS a enregistré 93 % des décès liés au paludisme au niveau mondial en 2017. Les enfants de moins de 5 ans représentent la tranche d'âge la plus vulnérable face au paludisme. En 2017, ils ont représenté 61 % (266 000) des décès associés au paludisme dans le monde.

Chez un sujet non immunisé, les symptômes apparaissent généralement au bout de 10 à 15 jours après la piqûre de moustique infectante. Les manifestations cliniques du paludisme sont la fièvre, l'anémie et la splénomégalie. La plupart des décès sont dus aux infections à *P. falciparum* qui en l'absence de traitement, peuvent évoluer vers un

coma cérébral profond, une acidose, une anémie sévère, ou/et un dysfonctionnement rénal et un œdème pulmonaire.

Les éléments clés du contrôle du paludisme sont un dépistage précoce suivi d'un traitement médicamenteux efficace. La prévention de la maladie vise à réduire les contacts entre les individus et l'Anophèle femelle porteuse de sporozoïtes, par le déploiement de moustiquaires imprégnées d'insecticide et, le cas échéant, la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent intra-domiciliaire. Ces actions sont, dans certaines zones géographiques, complétées par des traitements préventifs intermittents et une chimio prévention de masse donnée à une population cible.

Les obstacles à l'élimination du paludisme ont toujours été liés à l'évolution permanente des résistances des parasites aux antipaludiques et des Anophèles vecteurs aux insecticides. Un seul vaccin, le RTS,S développé par le laboratoire GSK, a été introduit après 30 ans de recherche et développement (R&D) dans 3 pays pilotes (Malawi, Ghana et Kenya) en 2019. Dans les essais cliniques préalables, ce vaccin a permis de prévenir environ 4 cas de paludisme sur 10, dont 3 cas de paludisme grave potentiellement mortel. Compte tenu de sa limite d'efficacité vaccinale, la recherche sur les nouvelles thérapies reste au premier plan dans la lutte contre le paludisme.

## **A. Cycle du paludisme**

*Plasmodium spp.* sont des protozoaires parasites de la famille des *Plasmodiidae*. Leur cycle de vie comprend une multiplication asexuée chez un hôte vertébré intermédiaire, et un cycle de reproduction sexuée chez un moustique, de l'espèce *Anopheles spp.*, hôte définitif (Figure 1).

### **1. Étape de l'anophèle**

Après avoir infecté l'Anophèle femelle par l'intermédiaire d'un repas sanguin sur une personne parasitée porteuse de gamétocytes, les formes mâles et femelles s'accouplent dans l'estomac du vecteur et produisent un ookinète. L'ookinète traverse la paroi de l'estomac et va se multiplier en sporozoïtes, qui à leur tour vont migrer vers les glandes salivaires, dans l'attente d'être inoculés lors d'un repas sanguin. Le délai nécessaire varie avec la température et dans une moindre mesure, avec l'espèce de *plasmodium* et avec l'humidité. Il est généralement de 15 à 18 jours.

## 2. Étape humaine

Les sporozoïtes (stade infectant pour l'homme) sont injectés dans le sang avec la salive du moustique lors de la pique. Ils atteignent le foie où ils se multiplient et portent le nom de schizontes. Pendant une période de 7 à 12 jours, ils s'y multiplient jusqu'à l'éclatement de la cellule hépatique infectée. Pour les espèces *P. vivax* et *P. ovale*, il y a formation d'hypnozoïtes qui restent quiescents dans les cellules hépatiques et qui seront responsables des accès de reviviscence en se développant tardivement en schizontes (possibilités de rechutes pendant 3 à 4 ans). A maturité, les schizontes se lysent et libèrent des mérozoïtes qui passent dans le sang et infectent des hématies à l'intérieur desquels ils se multiplient à nouveau. Les GRs infectés sont détruits et les parasites libérés envahissent de nouveaux GRs et y recommencent leur multiplication. Après un certain nombre de cycles, ils se transforment en gamétocytes qui sont des formes sexuées (mâles et femelles) qui, ingérées par le moustique, permettent la poursuite du cycle.

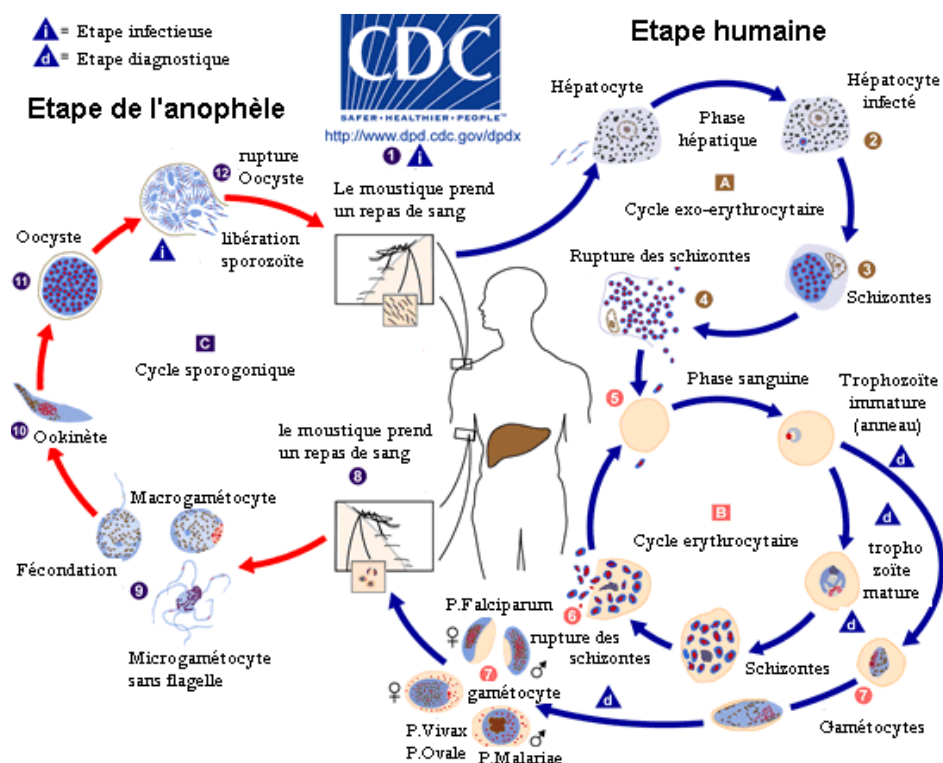


Figure 1 : Cycle de vie du plasmodium

## B. Évolution de la chimiothérapie contre le paludisme

Avant milieu du 20<sup>ème</sup> Siècle, le traitement du paludisme était principalement basé sur une monothérapie avec l'utilisation de différentes familles d'antipaludiques.



Isolée en 1820, la Quinine (QN) est rapidement devenue le traitement privilégié de la fièvre intermittente à travers le monde et représente un traitement important et efficace contre le paludisme dans le monde entier, malgré des observations de résistance qui sont restées sporadiques et instables (Institute of Medicine et al., 2004).

La chloroquine (CQ) a été développée et synthétisée par des chercheurs allemands dans les années 1930, afin de remplacer la quinine pour les troupes engagées dans les conflits dans les pays tropicaux. A la fin de la seconde guerre mondiale, l'ensemble des travaux industriels allemands sur les antipaludiques sera transféré aux Etats Unis, à l'US Army Medical Research, qui va continuer leur développement. La CQ et l'insecticide à base de dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), sont apparus dans les années 1950 comme les deux principales armes dans l'ambitieuse campagne de l'OMS « d'éradication mondiale » du paludisme (Institute of Medicine et al., 2004). L'utilisation de la quinine en traitement et de la chloroquine en prophylaxie est alors recommandée par l'OMS dans tous les pays impaludés. La résistance de *P. falciparum* à la CQ a probablement fait son apparition à partir de quatre endroits géographiques indépendants : la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande vers 1957 (Harinasuta et al., 1965) ; le Venezuela et la vallée de la Magdalena de la Colombie vers 1960 (Moore and Lanier, 1961) et en Papouasie-Nouvelle-Guinée, au milieu des années 1970 (Grimmond et al., 1976). En Afrique, la résistance à la CQ a été découverte pour la première fois en 1978 chez des voyageurs non immunisés au Kenya et en Tanzanie (Lobel et al., 1985) suivi par un élargissement de cette zone de développement, en 1983, au Soudan, en Ouganda, en Zambie et au Malawi (Talisuna et al., 2004).

Face à l'apparition de ces cas de résistance, des recherches actives sont menées afin de développer de nouveaux antipaludiques qui seront utilisés en monothérapie (sulfadoxine-pyriméthamine (SP), méfloquine (MEF), atovaquone (ATO) et artémisinine (ARN)). La résistance des parasites entraîne une élimination tardive ou incomplète des parasites dans le sang du patient lorsque la personne est traitée par un antipaludique. Le problème de la résistance aux médicaments antipaludiques se complique lorsqu'il y a présence d'une résistance croisée, à savoir que la résistance à un médicament rend le parasite résistant à d'autres médicaments de la même famille chimique ou ayant un mode d'action comparable.

La combinaison SP, antipaludique antifolinique le plus largement utilisé, est introduit en Thaïlande en 1967 et les premiers cas de résistance à cette combinaison sont rapportés cette même année en Thaïlande (Wernsdorfer and Payne, 1991). La résistance des parasites à la combinaison SP s'est répandue rapidement dans toute l'Asie du Sud-Est mais elle est restée faible en Afrique jusqu'à il y a 20 ans. Depuis lors, elle s'est répandue rapidement dans toute l'Afrique (Institute of Medecine et al., 2004).

La mise au point de la MEF est le fruit d'une collaboration entre le U.S. Army Medical Research and Development Command, l'OMS et Hoffman-La Roche. Elle a été développée dans le but de remplacer la quinine (Institute of Medecine et al., 2004). L'efficacité de la MEF en traitement préventif contre le *P. falciparum* a été signalée pour la première fois en 1974 (Rieckmann et al., 1974). L'année suivante, elle a démontré son efficacité dans le traitement curatif du paludisme (Trenholme et al., 1975). L'apparition des cas de résistance à la MEF a rapidement été documentée en Asie du Sud Est.

Isolé en 1972 par des scientifiques chinois, l'efficacité de l'ARN a été reconnue par l'OMS dans les années 1990, et représente actuellement avec l'ensemble de ses dérivés, la principale ligne de défense contre le paludisme dans le monde. La résistance aux dérivés de l'artémisinine, apparue au début des années 2000, a entraîné son utilisation en bi-thérapie, et les combinaisons à base d'artémisinine (CTA), sont aujourd'hui utilisées dans le monde.

Toutes les molécules utilisées en monothérapies ont donc vu apparaitre des résistances par rapport à leur action antipaludique (Tableau 1). Des souches multirésistantes ont rapidement fait leur apparition, et nous assistons aujourd'hui à l'émergence de résistances aux CTA.

Tableau 1 : Année d'introduction des antipaludiques et année de déclaration de 1<sup>er</sup> cas de résistance (Fairhurst and Dondorp, 2016; Kindhauser and Organization, 2003)

Antipaludique	Introduction	1 <sup>er</sup> cas de résistance
<b>QN</b>	1632	1910
<b>CQ</b>	1945	1957
<b>Proguanil (PG)</b>	1948	1949
<b>SP</b>	1967	1967
<b>MEF</b>	1977	1982
<b>ATO</b>	1996	1996
<b>ARN</b>	Isolé 1972	2009

À ce jour, la résistance du parasite a été observée chez 2 des 5 espèces de *plasmodium* connues pour parasiter l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*. L'OMS recommande les CTA pour le traitement du paludisme sans complications causé par *P. falciparum*. Les CTA ont été un élément essentiel des récents succès remarquables obtenus dans la lutte mondiale contre le paludisme, et il est largement reconnu que la protection de l'efficacité de ces combinaisons thérapeutiques est une priorité absolue. L'OMS recommande 5 CTA dans le cas des traitements du paludisme simple à *P. falciparum* avec un temps de traitement sur 3 jours (Organisation mondiale de la santé, 2015):

- artémether (ART) + lumefantrine (LUM)
- artésunate (ARS) + amodiaquine (AMO)
- ARS + MEF
- dihydroartémisinine (DHA) + pipéraquline (PPQ)
- ARS + SP

Le choix de la CTA par pays est fonction du degré de résistance des souches plasmodiales retrouvées au deuxième antipaludique associé au dérivé d'artémisinine.

Une réduction de sensibilité aux dérivés de l'artémisinine et aux médicaments utilisés en association essentiellement est observée actuellement en Asie du Sud-Est (Noedl et al., 2008), de même au Kenya (Borrmann et al., 2011). Il est donc important de développer de nouvelles stratégies pour protéger les CTA. L'une des stratégies proposées est de rajouter une troisième molécule possédant un mécanisme d'action qui lui est propre. Dans cette optique, l'OMS recommande l'ajout de gamétocytocide tel que la primaquine aux CTA recommandés afin de mettre en place un programme

d'élimination du plasmodium dans les zones de pré-élimination (Organisation mondiale de la santé, 2015).

### **C. Traitement préventif du paludisme**

Les traitements utilisés dans les programmes de chimioprophylaxie sont basés sur des molécules à  $\frac{1}{2}$  vie plasmatique de plusieurs jours. La SP et l'AMO, malgré les résistances avérées, restent des traitements qui ont gardés leur efficacité dans les zones sahéliennes et sub-sahariennes de transmission saisonnière où la chimioprophylaxie saisonnière est appropriée. La SP reste la prophylaxie de choix chez la femme enceinte, car c'est le seul antipaludique disposant de données suffisantes démontrant l'absence d'effets indésirables chez la femme enceinte après les 3 premiers mois de grossesse.

En dehors des femmes enceintes, la chimioprophylaxie n'est aujourd'hui plus recommandée dans les pays impaludés, et est réservée aux voyageurs non immuns de manière à éviter l'extension des résistances contre les thérapies efficaces : l'association ATO-PG, la MEF et la doxycycline (DOX).

## **II. Le bleu de méthylène**

### **A. Historique**

Synthétisé en 1876 comme teinture à base d'aniline pour l'industrie du textile (Berneth, 2008), le bleu de méthylène (BM) a été rapidement utilisé par Robert Koch et Paul Ehrlich pour réaliser les colorations en microscopie (Ehrlich, 1881). Une coloration sélective et une inactivation de certaines souches microbiologiques ont été observées et ont mené à la réalisation de tests de l'activité des colorants à base d'aniline contre les maladies tropicales (Oz et al., 2011). Le BM est la première molécule synthétique administrée à l'être humain, de même que la première à démontrer une activité antiseptique et une activité dans le traitement du paludisme (Guttman and Ehrlich, 1891; Oz et al., 2011).

### **B. Les caractéristiques physicochimiques**

Le chlorure de méthylthioninium encore appelé BM est une molécule synthétique (Figure 2) dont la masse moléculaire anhydre est de 319,85 g/mol. Il se présente sous forme de poudre noire verdâtre, sans odeur particulière, volatile, électrostatique, sensible à la lumière et stable à l'air libre. Une fois solubilisé dans l'eau (solubilité de

43,6g/L) ou l'éthanol, il s'ionise et donne une solution bleue. Sous sa forme oxydée (BM) il donne une couleur bleue en solution mais sous sa forme réduite (leucométhylène) il devient incolore (Figure 3). Les différentes formes d'impureté du BM sont l'azure A, l'azure B et l'azure C (Figure 2).

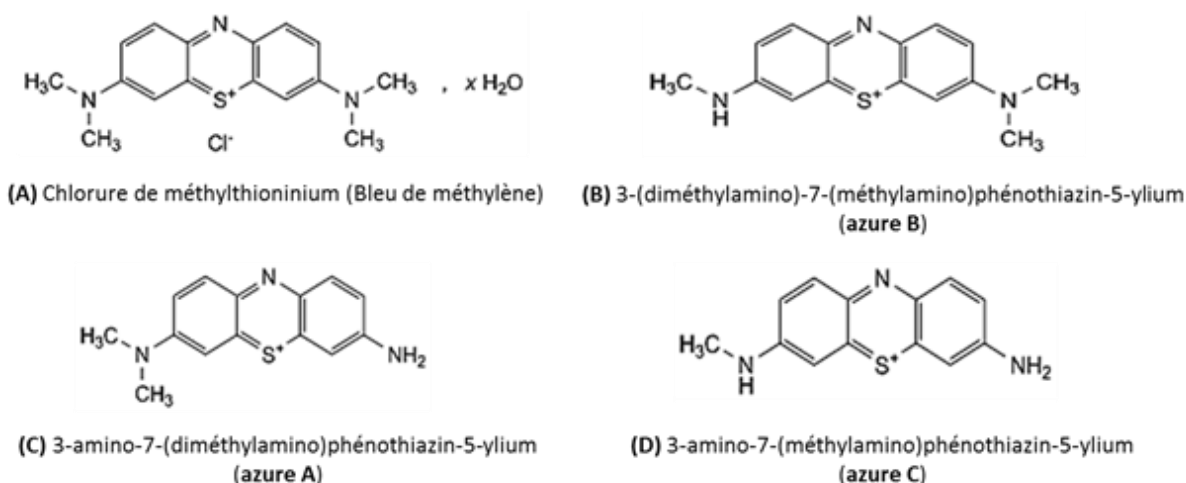


Figure 2 : Le chlorure de méthylthioninium et ses impuretés (EDQM, 2018)

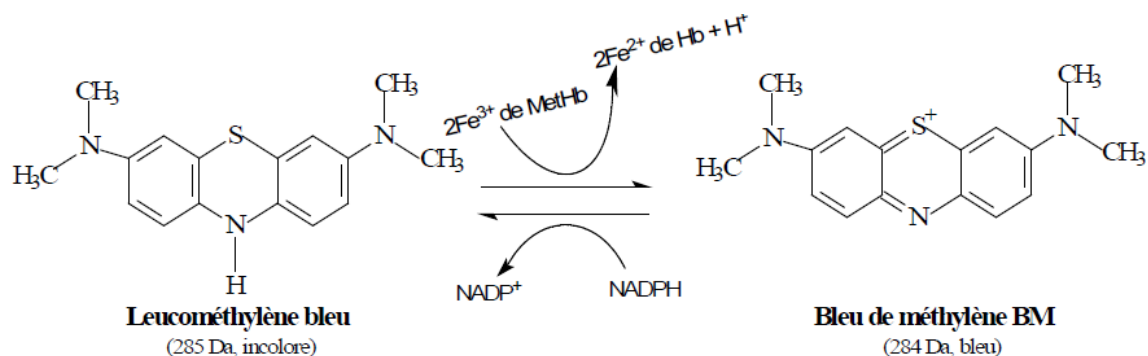


Figure 3 : Le bleu de méthylène et le leucométhylène bleu (Garavito, 2007)

### C. La pharmacocinétique

Après administration orale, le BM est bien absorbé par le tractus gastro-intestinal et en partie monodéméthylé en Azure B. Le BM est rapidement et largement distribué dans tout le corps (Wainwright and Amaral, 2005; Warth et al., 2009). Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes 1 à 2 heures après l'administration orale (Peter et al., 2000; Rengelshausen et al., 2004). En fonction des auteurs, la  $\frac{1}{2}$  vie plasmatique est entre 5 et 20 heures (Peter et al., 2000; Rengelshausen et al., 2004; Walter-Sack et al., 2009). La biodisponibilité absolue du BM est de  $72,3 \pm 23,9 \%$  (Walter-Sack et al., 2009).

Les données provenant d'études animales ont montré que le BM, administré par voie intraveineuse traverse la barrière hémato-encéphalique. Cette administration conduit à des concentrations beaucoup plus élevées dans le système nerveux central qu'en prise orale, indiquant des différences dans la distribution des organes après administration orale ou intraveineuse (Peter et al., 2000). De telles observations peuvent expliquer, au moins en partie, pourquoi le bleu de méthylène administré par voie orale est considéré comme sûr à des doses beaucoup plus élevées que lorsqu'il est administré par voie intraveineuse (Walter-Sack et al., 2009).

L'excrétion rénale du BM est la principale voie d'élimination et 1/3 se fait sous la leucométhylène (Peter et al., 2000).

#### **D. Développement actuel : indications thérapeutiques, recherche clinique, amélioration de la substance active (Exemple de Proveblue®)**

Le BM est un produit enregistré dans plusieurs pays pour différentes indications telles que le traitement de la méthémoglobinémie, la prévention d'encéphalopathie ifosfamide-induite, la prévention des infections du tractus urinaire, la visualisation intraopératoire des nerfs et des glandes endocriniennes et la stérilisation du sang à transfuser (Cawein et al., 1964; Coleman and Coleman, 1996; Floyd et al., 2004; Küpfer et al., 1994; Mansouri and Lurie, 1993; Ohrt et al., 2014; O'Leary et al., 1968; Schirmer et al., 2011; Williamson et al., 2003; Zulian et al., 1995).

Il est également considéré comme efficace contre les chocs septiques et le priapisme (Juffermans et al., 2010; Van der Horst et al., 2003).

Des études menées récemment ont suggéré que le BM pouvait avoir des effets bénéfiques dans le cadre du traitement de la maladie d'Alzheimer et de l'amélioration de la mémoire (Oz et al., 2011, 2009).

L'utilisation pharmaceutique du BM a été entravée pendant longtemps par sa contamination en impuretés organiques et métaux lourds reconnus toxiques. *Provepharm Life Solution* (Marseille, France) a développé Proveblue®, un BM grade pharmacopée. Il est synthétisé avec un nouveau processus de fabrication sans métaux lourds, utilisant des réactifs de qualité pharmaceutique (forme intraveineuse : brevet N ° FR06 / 06330, étendu à la référence internationale PCT / FR / 2007/001193). Les

concentrations totales en métaux, Azure B (l'impureté la plus importante) et d'autres impuretés dans Proveblue® sont respectivement <20 ppm, <2%, <0.5% (Dormoi et al., 2013a).

## **E. BM et paludisme**

Le BM a été utilisé pour la première fois à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle de manière efficace dans le traitement de crises simples de paludisme (Guttman and Ehrlich, 1891). Son utilisation dans les zones d'épidémie du paludisme a commencé à être documentée à partir du début du 20<sup>ème</sup> siècle (Marshall, 1920). C'est la première molécule de synthèse utilisée dans cette indication.

### **1. Mécanisme d'action**

Le BM est la base structurelle de la plasmogone (8-aminoquinoléine). Le *plasmodium* une fois à l'intérieur du GR, ingère l'hémoglobine par pinocytoses et la dégrade par la suite dans sa vacuole digestive en hème et petits peptides. Le groupement hème libéré est toxique pour le parasite (Francis et al., 1997, 1996; Olliaro and Goldberg, 1995; Rosenthal, 1998). Ce dernier pour se protéger va donc biocristalliser une partie de l'hème (environ 20 à 30 %) en hémozoïne insoluble et le reste de l'hème (environ 70 à 80%) ayant échappé à la cristallisation sort de la vacuole digestive et est catabolisé par le glutathion réduit (GSH) conduisant à la formation du glutathion oxydé (GSSG) et à la libération du groupe fer (Garavito, 2007) (Figure 4).

Le BM va se lier à des dimères d'hématine (hème avec du fer ferrique  $Fe^{3+}$ ) et former un complexe. Cet effet est susceptible de contribuer à l'inhibition de la formation d'hémozoïne chez *P. falciparum*, ce qui va augmenter la concentration en hème toxique pour les parasites (Blank et al., 2012).

La réduction de la méthémoglobine ( $Fe^{3+}$ ) en oxyhémoglobine ( $Fe^{2+}$ ) par le NADPH est efficacement catalysée par le BM et la glutathion réductase (Figure 3). Le BM va entrer en compétition avec le GSSG pour le NADPH, bloquant ainsi la réduction du GSSG en GSH (Blank et al., 2012; Garavito, 2007). La diminution de la concentration du milieu en GSH va baisser le niveau de catabolisme de l'hème et rendre ainsi le milieu plus toxique pour le *plasmodium*.

En dehors de l'activité redox, le BM a une autre activité de mécanisme inconnu (Müller et al., 2019; Plouffe et al., 2016).

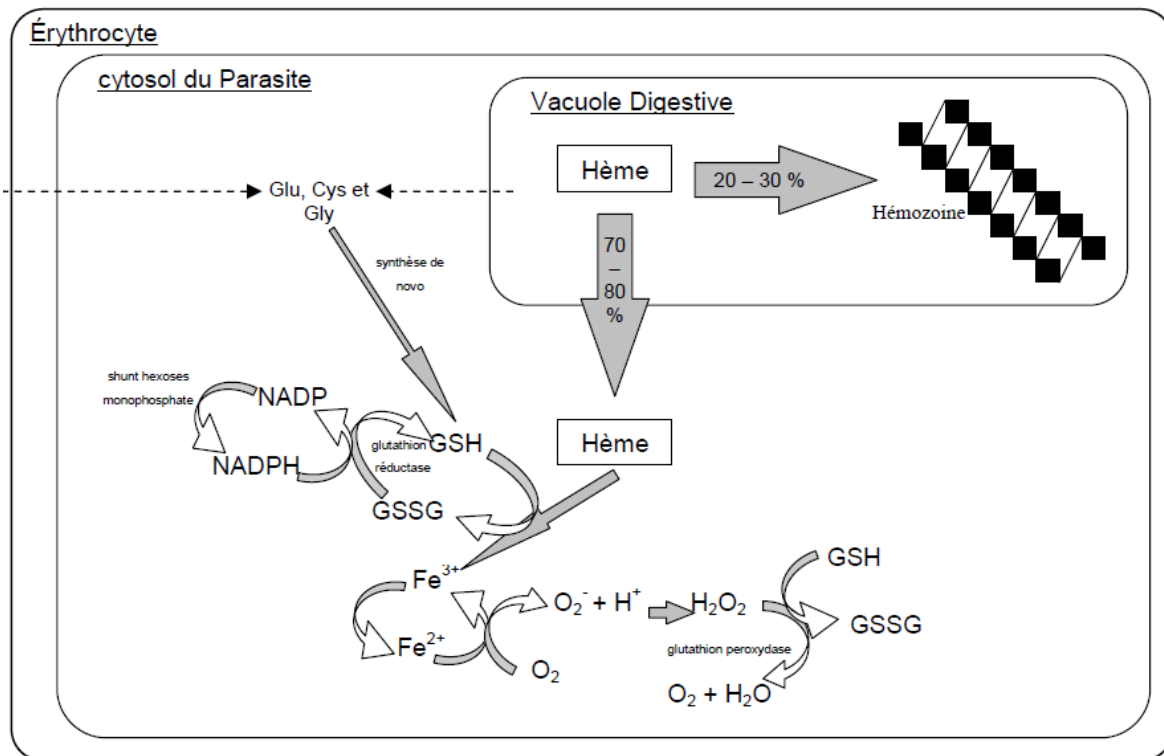


Figure 4 : Catabolisme de l'hème par le glutathion (Garavito, 2007)

## 2. Efficacité contre les formes asexuées du paludisme

### a. Etudes in-vitro

*In vitro*, le BM est très actif contre deux espèces de *plasmodium* (*P. falciparum* et *P. vivax*) (Lu et al., 2018). Lorsqu'il a été testé sur des parasites hautement synchronisés, il est apparu que les anneaux tardifs et les trophozoïtes précoces étaient les stades les plus sensibles à son activité (Figure 1) (Garavito, 2007).

Dans les études *in vitro*, la moyenne géométrique de la concentration inhibitrice de 50 % (CI<sub>50</sub>) du BM a été plus active sur 23 souches de *P. falciparum* que la chloroquine, la quinine, la méfloquine, la monodéséthylamodiaquine (le métabolite actif de l'amodiaquine) et la luméfántrine mais il était moins actif que la dihydroartémisinine (Pascual et al., 2011). Le BM a également démontré une bonne activité *in vitro* contre des souches de *P. falciparum* et de *P. vivax* résistantes aux antipaludiques standards (Pascual et al., 2011; Wirjanata et al., 2015). Des travaux *in vitro* ont mis en évidence l'efficacité du BM dans le traitement du paludisme cérébral (Dormoi et al., 2013a, 2013b; Dormoi and Pradines, 2013).



A la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, une augmentation de la résistance du *P. falciparum* aux antipaludiques de première ligne tels que la CQ et la SP a été observée dans la plupart des pays de l'Afrique sub-saharienne (Trape, 2001). La nécessité de mieux prévenir le développement des résistances et l'apparition de nouvelles molécules d'action rapide ont entraîné l'utilisation et la généralisation des CTA, ceci sur recommandation de l'OMS. Pour la bonne prise en charge des patients et le bon traitement du paludisme, l'OMS recommande l'utilisation de combinaisons thérapeutiques associant un antipaludique à ½ vie courte et un antipaludique à ½ vie longue. L'antipaludique à ½ vie courte va permettre la mise en place d'une action rapide alors celui à ½ vie longue va permettre d'obtenir une activité qui va durer dans le temps. C'est dans cet objectif que le BM a été associé à d'autres antipaludiques dans des études cliniques.

Plusieurs combinaisons incluant le BM ont été étudiées *in vitro* et *in vivo*. Ces études ont porté sur l'efficacité et, dans une moindre mesure, sur la tolérance des combinaisons. Elles ont essentiellement été réalisées *in vitro* avec du BM non purifié et non conforme aux spécifications européennes. Les études les plus récentes ont souvent été réalisées *in vivo* avec du BM purifié (Proveblue®).

Les études *in vitro* sur la bithérapie entre le BM et les divers composés antipaludiques sont présentées dans le Tableau 2 et ont montré certaines nuances dans les résultats obtenus.

Globalement un antagonisme est noté entre le BM et la CQ ; une synergie avec la QN, l'ARN et ses dérivés. Ces résultats montrent que le BM est un bon candidat pour une association avec les CTA.

Tableau 2 : Etudes *in vitro* sur la bithérapie entre le BM et les divers composés antipaludiques

Antipaludiques en bithérapie avec le BM	Garavito (Garavito, 2007)	Dormoi et al (Dormoi et al., 2012)	Akoachere et al (Akoachere et al., 2005)
<b>CQ</b>	Additif	Antagonisme	Antagonisme
<b>QN</b>	Synergique	Synergique	Additif
<b>MEF</b>	Additif	Synergique	Additif
<b>Primaquine (PQ)</b>	Additif	N/A	N/A
<b>AMO</b>	Antagonisme	Additif (avec son métabolite actif)	N/A
<b>ATO</b>	Antagonisme	N/A	N/A
<b>DOX</b>	Antagonisme	N/A	N/A
<b>Pyriméthamine (PYR)</b>	Antagonisme	N/A	Antagonisme
<b>ART</b>	Additif	N/A	N/A
<b>Atorvastatine (ATV)</b>	N/A	Synergique	N/A
<b>DHA / ARN</b>	N/A	Synergique	Synergique

### b. Monothérapie *in vivo*

Une étude clinique réalisée vers l'année 1900 avec une utilisation du BM en monothérapie sur plus de 350 patients a rapporté une guérison de 90% des patients traités (Lu et al., 2018). Une autre étude clinique a montré que le BM administré pendant 7 jours a donné une guérison de 100% des patients et lorsque le nombre de jour de traitement est diminué le taux de guérison aussi diminue par rapport au traitement du paludisme à *P. falciparum*. Pendant cette étude aucun effet indésirable sévère n'a été notifié. Quelques cas de dysurie, de céphalée et de symptômes gastro-intestinaux ont été notifiés comme effets indésirables (Tableau 3) (Bountogo et al., 2010).

### c. Usage du BM en combinaison *in vivo*

Au début du 21<sup>ème</sup> siècle, plusieurs études cliniques utilisant le BM en combinaison avec d'autres antipaludiques ont été menées. La majorité des études les plus récentes a été menée par MULLER et son équipe (Tableau 3).

Pour ses premiers essais en combinaison, le BM a été combiné dans une étude clinique réalisée en 1949 à l'isopentaquine (famille des 8-aminoquinolines) avec un taux de guérison à 67% mais aussi avec l'isopentaquine et la QN en trithérapie avec

un taux de guérison de 100% (Lu et al., 2018). Le BM utilisé à 4mg/kg par jour et associé à la CQ n'a pas permis d'améliorer l'activité antipaludique comparativement à la CQ toute seule (Meissner et al., 2005). Alors qu'une utilisation du BM à 12-24 mg/kg par jour avec une association à la CQ a permis une amélioration de l'efficacité (Meissner et al., 2006). Une étude a montré que l'association BM-AQ (BM à 20 mg/kg par jour) permet d'obtenir un taux de guérison supérieur à ceux des associations BM-ARS et ARS-AQ avec respectivement des valeurs de 95%, 62% et 82% (Zoungrana et al., 2008). Une autre étude comparant les associations BM-ARS-AQ et ARS-AQ a montré que ces deux schémas thérapeutiques ont des taux de guérison similaires avec respectivement 80% et 85% (Coulibaly et al., 2015).

Tableau 3 : Résumé des différentes études récentes sur le BM pour le traitement du paludisme (Dicko et al., 2018; Lu et al., 2018; Mendes Jorge et al., 2019)

Référence de l'étude	Informations patients	Type de paludisme	Schémas thérapeutiques	Nombre de jour de suivi	Résultats d'efficacité	Résultats de sécurité	Autres informations
<b>Mendes Jorge et al 2019</b> <b>Burkina Faso</b>	n = 100 (enfants de 6 à 59 mois)	<i>P. falciparum</i>	G1 : AS-AQ-BM (n=50) (BM 15 mg.kg <sup>-1</sup> une fois par jour pendant 3 jours) G2 : AS-AQ-PQ (n=50) Formulation BM : minicomprimés nus	28 jours	La réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) était supérieure à 95 % dans les deux groupes, mais beaucoup plus de parasites asexués ont été éliminés dans le groupe BM comparativement au groupe PQ.	Les effets indésirables étaient semblables dans les deux groupes, sauf pour les vomissements, qui étaient plus fréquents dans le groupe BM que dans le groupe PQ.	Besoin d'améliorer les formulations de BM.
<b>Dicko et al 2018</b> <b>Mali</b>	n = 80 (hommes de 5 à 50 ans)	<i>P. falciparum</i>	G1 : SP-AQ (n=20) G2 : SP-AQ-PQ (n=20) G3 : DHA-PPQ (n=20) G4 : DHA-PPQ-BM (n=20) (BM 15 mg.kg <sup>-1</sup> une fois par jour pendant 3 jours) Formulation BM : minicomprimés nus	42 jours	L'ajout de primaquine dans G2 et de BM dans G4 permet une large réduction de la transmission de <i>P. falciparum</i> .	Pas de différences dans les effets indésirables et pas de cas de cas d'hémolyse entre les différents groupes.	Première étude qui démontre formellement l'activité du BM dans la limitation de la transmission de <i>P. falciparum</i> .
<b>Coulibaly et al 2015</b> <b>Burkina Faso</b>	n = 193 (enfants de 6 à 59 mois)	<i>P. falciparum</i>	G1 : AS-AQ-BM (n = 92) (BM : 15 mg.kg <sup>-1</sup> par jour pendant 3 jours) G2 : AS-AQ (n = 101)	28 jours	La RCPA était de 80% dans le G1 et 85% dans le G2. Prévalence des gamétocytes au 7 <sup>ème</sup> jour plus élevé dans G1 comparativement à G2. Clairance de la forme	Des cas de vomissement associés au BM. Valeur du taux d'hémoglobine significativement basse pour G1 comparativement à G2.	Les minicomprimés étaient associés à un aliment local et administrés à

Référence de l'étude	Informations patients	Type de paludisme	Schémas thérapeutiques	Nombre de jour de suivi	Résultats d'efficacité	Résultats de sécurité	Autres informations
<b>Bountogo et al 2010</b> <b>Burkina Faso</b>	n = 60 (adultes 18 à 55 ans)	<i>P. falciparum</i>	Formulation BM : minicomprimés nus	28 jours	G1 : 0/20 recrudescence G2 : 4/19 recrudescence G3 : 2/20 recrudescence	Dysurie (47/60), symptômes gastrointestinaux (13/60). Pas de différence significative avec les effets indésirables entre les différents groupes.	l'aide d'une cuillère.  Le BM était administré à une dose de 380mg deux fois par jour après le petit déjeuner et le souper.
			G1 : BM pendant 7 jours (n = 20) G2 : BM pendant 5 jours (n = 20) G3 : BM pendant 3 jours (n = 20) BM : 780 mg par jour Formulation BM : comprimés Urolene Blue®				
<b>Zougrana et al 2008</b> <b>Burkina Faso</b>	n = 180 (enfants de 6 à 10 ans)	<i>P. falciparum</i>	G1: BM-AS (n = 61) G2: BM-AQ (n = 58) (BM : 20 mg.kg <sup>-1</sup> par jour pendant 3 jours) G3: AS-AQ (n = 61) Formulation BM: comprimés Urolene Blue®	28 jours	La RCPA était de 62% pour G1, 95% pour G2 et 82% pour G3. Les groupes avec le BM sont associés à une clairance parasitaire plus rapide et une réduction significative de la clairance parasitaire durant le suivi.	Les groupes avec le BM sont associés au vomissement et à la dysurie.	L'administration du BM avec de la nourriture a diminué les cas de vomissement.
<b>Meissner et al 2006</b> <b>Burkina Faso</b>	n = 435 (enfants de 6 à 59 mois)	<i>P. falciparum</i>	G1 : CQ-BM (n = 156) (BM : 12 mg.kg <sup>-1</sup> par jour pendant 3 jours) G2 : CQ-BM (n = 155)	14 jours	Le taux de guérison clinique global était de 90% et le taux de guérison parasitologique était de 77% sans	3 cas avec des effets indésirables sévères dont l'un est probablement associé au BM. Les cas de problèmes	La solution de BM avait un arôme fruité et était administrée avec du miel

Référence de l'étude	Informations patients	Type de paludisme	Schémas thérapeutiques	Nombre de jour de suivi	Résultats d'efficacité	Résultats de sécurité	Autres informations
			(BM : 18 mg.kg <sup>-1</sup> par jour pendant 3 jours) G3 : CQ-BM (n = 123) (BM : 24 mg.kg <sup>-1</sup> par jour pendant 3 jours) Formulation BM : solution de BM à 2.3%		différence significative entre les groupes.	hémoglobiniques ne sont pas associés à une G6PD déficience.	pour masquer le gout amer.
<b>Meissner et al 2005 Burkina Faso</b>	n = 226 (enfants de 6 à 59 mois)	<i>P. falciparum</i>	G1 : CQ-BM (n = 181) (BM : 4 mg.kg <sup>-1</sup> par jour pendant 3 jours) G2 : CQ (n = 45) Formulation BM : solution de BM à 0.5%	14 jours	Les traitements n'ont pas été efficaces avec les RCPA qui étaient de 56% pour le G1 et de 46% pour le G2.	Pas de cas d'effets indésirables sévères et absence de cas d'hémolyse sévère. Pas de différences dans le suivi de l'hémoglobine des patients G6PD déficients et des patients non G6PD déficients	L'administration de la solution de BM était parfois compliquée surtout avec les jeunes enfants à cause du gout amer

### **3. Efficacité contre les gamétocytes (forme sexuée)**

Cette efficacité a été évaluée grâce au suivi de la clairance des gamétocytes. Les combinaisons BM-ARS et BM-AQ ont été plus efficaces que l'association ARS-AQ contre les gamétocytes de *P. plasmodium* (Coulibaly et al., 2009). Cette forte activité gamétocytocide était liée au BM. L'association BM-ARS a cependant montré qu'elle ne permettait pas d'avoir une protection efficace des patients dans le temps car ne présentant pas une  $\frac{1}{2}$  vie assez longue comparativement à celle de l'AQ (Zoungrana et al., 2008). L'utilisation du BM en trithérapie (BM-ARS-AQ) a démontré une baisse significativement plus prononcée des gamétocytes comparativement à celle de la combinaison ARS-AQ (Coulibaly et al., 2015). Ces résultats montrent que le BM peut être utilisé pour réduire la transmission du paludisme grâce à son action gamétocytocide.

La PQ est un antipaludique qui possède à la fois des activités antipaludiques sur les schizontes hépatiques et une activité gamétocytocide (Briolant et al., 2017). Une étude a donc été menée par Dicko et al (Dicko et al., 2018) sur une comparaison de l'efficacité et de la sécurité d'utilisation de la PQ et du BM dans la prévention de la transmission de *P. falciparum*. Les résultats ont montré que les deux étaient très efficaces dans la prévention de la transmission et qu'ils étaient bien tolérés. Des études complémentaires restent nécessaires afin de mieux comprendre l'apport de l'ajout de ces molécules aux combinaisons existantes dans la stratégie d'élimination du paludisme.

### **4. Effets secondaires et tolérance**

Les effets secondaires les plus fréquents du BM par voie orale sont les effets émétisants (notamment nausées et vomissements), une dysurie légère et la coloration en bleu des urines, des muqueuses et des dents (Bountogo et al., 2010; Dicko et al., 2018; Zoungrana et al., 2008). Ces effets ont été bénins mais avaient eu une influence négative importante sur l'acceptation et le suivi des traitements à base de BM.

La combinaison BM-CQ avec une dose totale de 780mg de BM et 1500mg de CQ réparties sur 3 jours n'a présenté aucun problème de sécurité d'utilisation pour les patients G6PD-déficient (Mandi et al., 2005).

L'administration intraveineuse a été documentée dans son usage dans les méthémoglobinémies. Elle peut causer des douleurs abdominales, des maux de tête, étourdissements, tremblements, anxiété, état de confusion, douleurs thoraciques, dyspnée, tachycardie etc.

Le BM se trouve sur la liste des produits potentiellement dangereux pour les patients G6PD déficient mais jusqu'à maintenant aucun lien n'a été établi entre le BM et le fait qu'il puisse provoquer une hémolyse sévère. Il a causé une légère réduction d'hémoglobine chez des patients G6PD déficients africains, mais cette remarque n'était cliniquement pas significative. Des études complémentaires doivent être menées afin de mieux comprendre les effets du BM lorsqu'il est administré à des patients G6PD déficients.

### **5. Place du BM dans l'arsenal thérapeutique en développement pour la lutte contre le paludisme**

De nombreuses équipes de recherches dans le monde travaillent sur l'identification de molécules antipaludiques. La stratégie prioritaire est d'identifier une molécule pouvant être administrée en une seule prise, à demi-vie plasmatique longue, et n'entraînant pas de résistances. Dans l'attente de trouver le produit répondant aux différents besoins cités précédemment, différentes stratégies sont proposées dans un portefeuille de molécules à tous les stades de développement (Tse et al., 2019). Ces molécules ont passé le stade de la recherche fondamentale, qui est gérée par la Fondation Medicines for Malaria Venture (MMV). Cette organisation non gouvernementale, partenaire de l'OMS, et soutenue par des fonds internationaux publics et privés, organise la R&D autour des antipaludiques en lien avec des laboratoires de recherche et l'industrie pharmaceutique.

La Figure 5 détaille les produits soutenus actuellement par MMV, et précise leur stade de développement en 2019.

Le BM y occupe une place au niveau exploratoire, en association avec l'AQ. Cette combinaison est développée par une équipe Allemande de l'Université de Heidelberg, qui a organisée et coordonnée la majorité des essais cliniques réalisés sur le BM à ce jour. Il a été noté que le BM pourrait être utilisé à la fois dans le traitement du paludisme simple, et pour la limitation de la transmission (Müller et al., 2019).



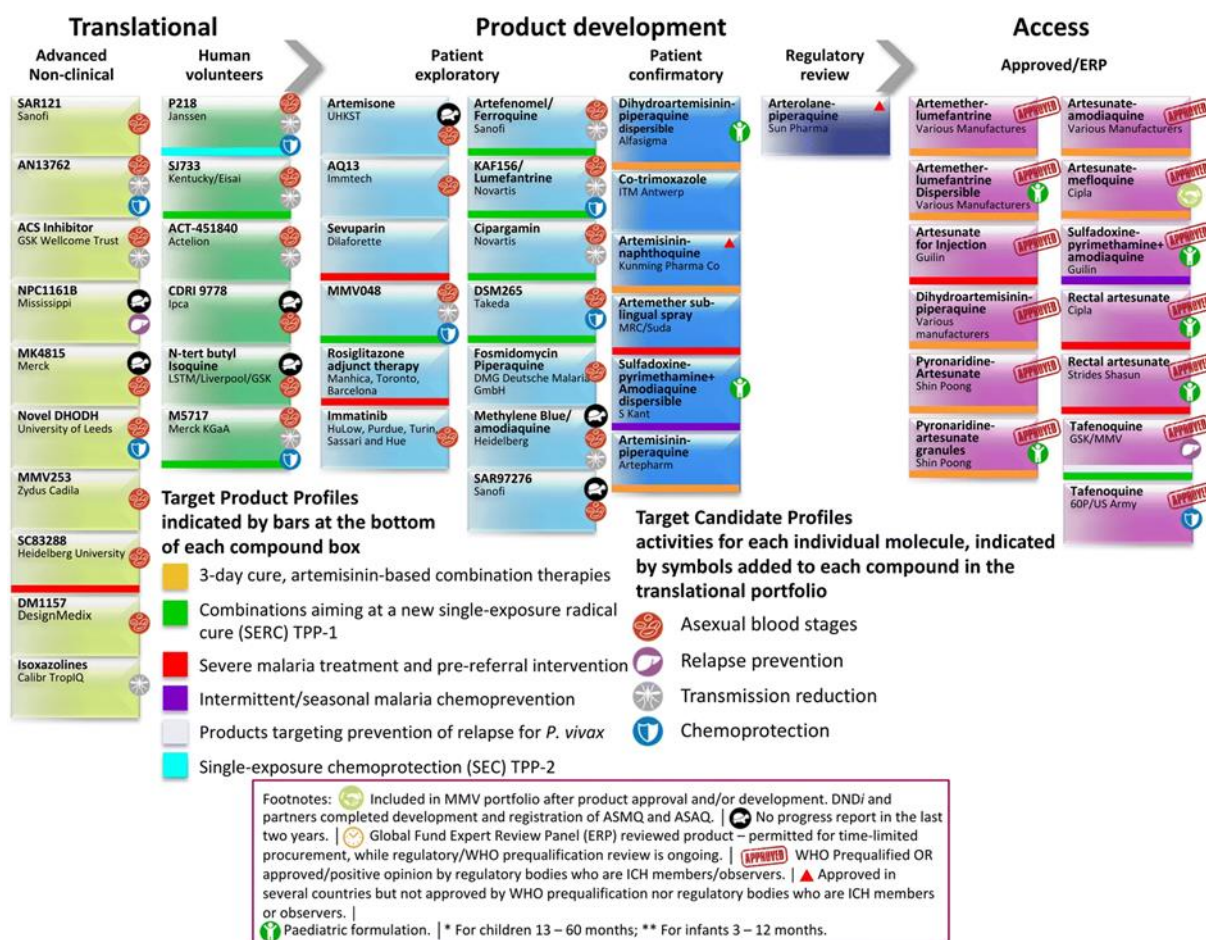


Figure 5 : Aperçu du portefeuille global des molécules à visée antipaludique y compris celles soutenues par MMV à différentes étapes de la découverte et du développement (Tse et al., 2019)

Une lente évolution de l'optimisation des formulations de BM utilisées dans les différentes études est notée. Cette lente évolution peut être attribuée à deux facteurs :

- Une absence de recherche réelle au niveau galénique, qui permettrait d'éviter les nombreux perdus de vue constatés dans les études cliniques (Coulibaly et al., 2015; Meissner et al., 2005). Il est certain qu'un médicament n'entraînant pas une bonne observance de la part des patients, ne pourra jamais être inclus dans une stratégie thérapeutique ou anti-transmission
- Compte tenu des autres produits en développement pré-clinique et clinique (Figure 5), il semble peu probable que le BM soit utilisé un jour dans le traitement du paludisme simple tel qu'il semble positionné par MMV. Cependant, la commercialisation effective du BM en solution pour le traitement en intraveineuse des méthémoglobinémies par la société *Provepharm Life*

*Solutions*, et son tropisme cérébral (Peter et al., 2000), en font un candidat très intéressant pour le traitement du paludisme grave.

Le BM fait à présent partie des stratégies acceptées par MMV, et reconnu comme étant une molécule économique, très peu toxique, et ayant une double activité prouvée par de nombreuses études cliniques contre les stades asexués et les stades sexués de *P. falciparum*. Compte tenu des arguments précités, faisant du BM un candidat pour le traitement du paludisme grave, le BM devrait être intégré par MMV dans la liste des produits ayant pour indication le traitement du paludisme sévère. Concernant la stratégie de lutte contre la transmission, seule la PQ est actuellement proposée par l'OMS en addition des CTA, pour limiter la transmission par élimination des gamétocytes. Une forme orale de BM bien acceptée par la population, pourrait également être testée en complément des CTA dans les zones de pré-élimination.

## **6. Revue des différentes formes de BM disponibles et en développement**

### **a. Injectables**

Le BM est disponible sous une forme injectable. Cette forme est principalement commercialisée par le laboratoire *Provepharm Life Solutions* qui le propose comme antidote et agent de coloration à des fins chirurgicales ou de diagnostics.

Comme antidotes de la gamme soins intensifs :

- Europe : Methylthioninium chloride Proveblue 5 mg/ml solution injectable
- USA : ProvayBlue® Methylene blue
- Nouvelle-Zélande : Proveblue methylene blue 50 mg/10 mL solution pour injection
- Australie : Proveblue methylene blue 50 mg/10 mL, injection ampoule
- Corée du Sud : Proveblue injection 0.5% (Methylene Blue)

Comme aide à la visualisation de la gamme Colorants Chirurgicaux :

- Europe : Provedye® 0.5% Bleu de Méthylène (Dispositif médical de classe IIa)
- Nouvelle-Zélande : Proveblue methylene blue 50 mg/10 mL solution pour injection
- Australie : Proveblue methylene blue 50 mg/10 mL, ampoule injectable.

## **b. Formes orales**

Le BM a été commercialisé sous la forme de granules par les laboratoires *Boiron* et sous forme de pastille par *Toulade*. Il a été développé sous forme de gélules et de comprimés commercialisés aux USA. Pour les essais cliniques, il a été administré sous différentes formes pharmaceutiques (solutions, comprimés Urolene Blue® et mini-comprimés nus).

## **c. Nanoparticules**

### **i. BM et nanoparticules**

Le BM a été d'un grand intérêt dans de nombreux domaines de la médecine clinique, des troubles neurologiques à la chimiothérapie contre le cancer (Gutiérrez-Valenzuela et al., 2017). Dans le cadre du traitement de la maladie d'Alzheimer des nanoparticules (NPs) de BM à base de PLGA ont été formulées afin d'améliorer le passage de la barrière hémato-encéphalique, d'améliorer la biodisponibilité dans le cerveau et de diminuer les effets secondaires systémiques (Jinwal et al., 2014). Des NPs de BM à base de polymères ont été utilisées pour des thérapies photodynamiques de différents types de cancer (Castañeda-Gill et al., 2017; Gutiérrez-Valenzuela et al., 2017; Tang et al., 2005; Yu et al., 2015).

### **ii. Nanoparticules et paludisme**

Les nanotechnologies ont été utilisées à plusieurs reprises dans différentes études pour la lutte contre le plasmodium. Dans le Tableau 4, quelques études ont été répertoriées. Les différentes utilisations de ces nanotechnologies ont permis d'améliorer la solubilité des substances actives, d'améliorer leur activité antipaludique, de réduire leur toxicité, de prolonger leur relargage et d'améliorer leur stabilité. Il faut noter que nous n'avons répertorié aucune étude de BM nanoformulé dans le cadre du traitement du paludisme. Ce terrain reste donc à explorer en vue de possibles améliorations de l'activité antipaludique du BM.

Tableau 4 : Exemples d'études qui ont utilisées différentes nanotechnologies dans la lutte contre le paludisme

Référence de l'étude	Substance(s) active(s)	Type d'étude et espèce	Type de formulation	Caractérisation (taille, PDI, potentiel zéta, rendement d'encapsulation) et administration	Résultats	Autres informations
Chadha et al (Chadha et al., 2012)	ARS	<i>In-vivo</i> <i>P. berghei</i>	Nanoprécipitation	204 nm ; 0,55 ; NA ; 85 % ; voie orale	Diminution rapide de la parasitémie	-
Omwoyo et al (Omwoyo et al., 2014)	Primaquine (PQ)	<i>In-vivo</i> <i>P. berghei</i>	Double émulsion associée au spraydrying	236 nm ; 0,14 ; 23 mV ; 75 % ; voie orale	Amélioration de l'efficacité de 20 %	-
Omwoyo et al (Omwoyo et al., 2016)	DHA	<i>In-vitro</i> ( <i>P. falciparum</i> ) ; <i>In-vivo</i> ( <i>P. berghei</i> )	Emulsion et spraydrying	240 nm ; 0,16 ; 17 mV ; 62 % ; voie orale	Amélioration de la CI <sub>50</sub> ; amélioration de l'efficacité in-vivo de 24 %	-
Parashar et al (Parashar et al., 2016)	ART - LUM	<i>In-vivo</i> <i>P. berghei</i>	Emulsion	145 nm ; 0,33 ; -66 mV ; 82 % artemether et 79 % luméfantine ; injection intra-péritonéale	Amélioration de l'activité antipaludique	
Prabhu et al (Prabhu et al., 2016)	ART - LUM	<i>In-vivo</i> <i>P. berghei</i>	Emulsion	64 nm ; 0,45 ; -8 mV ; 66 % artémether et 36 % luméfantine ; injection intra-veineuse	Amélioration de l'activité antipaludique avec clairance parasitaire complète et taux de survie de 100 %	Paludisme cérébral
Rajendran et al (Rajendran et al., 2016)	CQ	<i>In-vivo</i> <i>P. berghei</i>	Liposomes par film lipidique	98 nm ; NA ; -15 mV ; 45 % ; injection sous-cutanée	Amélioration de l'activité antipaludique de la chloroquine sur une souche chloroquino-résistante	Chloroquine formulée, perte de 100% des souris en 23 jours et en 14 jours pour la chloroquine seule

### III. Les objectifs de la thèse

Le BM, première molécule de synthèse utilisée contre le paludisme, fait face à un regain d'intérêt pour une utilisation antipaludique compte tenu des différents cas d'apparition de résistance vis-à-vis des antipaludiques recommandés actuellement par l'OMS. Il a fait l'objet de plusieurs études à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Les études cliniques ont été réalisées avec des comprimés n'ayant pas fait l'objet de recherche galénique poussées, réalisés en compression directe sans masquage de goût.

Ces études ont relevé plusieurs problématiques vis-à-vis desquelles il sera important de répondre afin d'optimiser et faire accepter l'utilisation du BM. Afin de faire une analyse de la situation par rapport au BM et de mettre en place une stratégie qui va nous permettre de répondre de façon efficace, un MOFF (Menaces, Opportunités, Forces et Faiblesses) a été réalisé (Tableau 5).

Tableau 5 : Analyse MOFF de la situation du Bleu de méthylène

Forces	Faiblesses
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité antipaludique sur les formes plasmodiales asexuées et sur les gamétocytes. Utilisation possible dans les stratégies de traitement et d'élimination du paludisme.               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disponibilité avec coût d'approvisionnement bas.</li> </ul> </li> <li>- Large index thérapeutique (DL<sub>50</sub>= 1,18g/kg, doses thérapeutiques = 10-15mg/kg).</li> <li>- Substance active Proveblue® conforme à la pharmacopée. Forme intraveineuse commercialisée.</li> <li>- Tropisme cérébral permettant une possible utilisation dans le cas d'un paludisme grave avec atteinte du système nerveux central.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poudre volatile causant des problèmes de manipulation et de contamination de l'environnement de travail.</li> <li>- Gout désagréable, associé à des problèmes de vomissement observés chez les patients avec un fort impact négatif sur l'observance               <ul style="list-style-type: none"> <li>- ½ vie courte.</li> </ul> </li> <li>- Absence de présentation pharmaceutique orale travaillée.</li> <li>- Photosensibilité et sensibilité aux réactions d'oxydo-réduction.</li> </ul>
Opportunités	Menaces
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nouvelles stratégies thérapeutiques face au problème de résistance/multirésistance à l'artémisinine et ses dérivés.</li> <li>- Utilisation possible dans la limitation de la transmission du paludisme dans les zones de pré-élimination.</li> <li>- Indications thérapeutiques autres que le paludisme.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Développement rapide des résistances du parasite au bleu de méthylène.</li> <li>- Intolérance possible, en particulier chez les patients G6PD déficients.</li> </ul>

Afin de répondre à certaines menaces et faiblesses identifiées, nous avons développé une stratégie qui porte sur deux axes de développement.

### **Formulation de NPs de BM en utilisant des nucléolipides.**

Les avantages de ces types de formulations sont de :

- Protéger la substance active jusqu'à son site d'action,
- Améliorer l'activité thérapeutique en réduisant les doses,
- Prolonger la ½ vie

Nous voulons obtenir des NPs avec une taille moyenne inférieure à 200 nm pour que les NPs puissent être maintenues dans la circulation sanguine, permettre un possible passage de la barrière hématoencéphalique (Aditya et al., 2012; de Barros et al., 2012; Faraji and Wipf, 2009; Kulkarni and Feng, 2013; Nayak et al., 2010), un indice de polydispersité (PDI) inférieur à 0,3, signe d'une homogénéité lorsque des vecteurs à base de lipides sont utilisés (Danaei et al., 2018), et un potentiel Zêta à l'extérieur de l'intervalle [- 30 mV à + 30 mV], signe d'une force répulsive suffisante pour obtenir une bonne stabilité colloïdale physique (Joseph and Singhvi, 2019; Teng et al., 2013).

Ces NPs une fois obtenues, pourront faire l'objet d'une transposition vers une forme pharmaceutique. Elles pourront être lyophilisées afin d'améliorer leur conservation, de faciliter leur transport et d'obtenir les premiers prototypes permettant d'évaluer la faisabilité de l'élaboration d'une forme pharmaceutique injectable. Cette forme lyophilisée aura pour indication le traitement des crises de paludisme sévères par voie injectable.

### **Développement d'une forme orale de BM facilitant la manipulation et améliorant l'observance.**

Différentes formes orales ont été utilisées pendant les essais cliniques destinés à évaluer l'efficacité thérapeutique et gamétocytocide du BM. Une évolution est observée dans l'utilisation de ces formes pharmaceutiques. Les premiers essais au début du 21<sup>ème</sup> siècle ont été réalisés avec des solutions de BM pour des enfants (Meissner et al., 2006, 2005). Plusieurs problèmes ont été rapportés à la suite de l'administration de la solution de BM aux enfants : rejet pour goût métallique et amertume, effet émétisant pouvant intervenir plusieurs minutes après administration, coloration des muqueuses et des urines. Cette forme a par la suite fait l'objet d'amélioration avec l'utilisation de comprimés (Bountogo et al., 2010; Zoungrana et al., 2008) puis de mini-comprimés orodispersibles (Coulbaly et al., 2015; Dicko et al., 2018; Mendes Jorge et al., 2019). Malgré l'utilisation de ces comprimés, les mêmes effets indésirables étaient toujours observés. Ces comprimés avaient des dosages faibles en BM, ce qui impliquait l'administration d'un nombre élevé d'unité de prise par patient. Les comprimés utilisés étaient des comprimés nus et le masquage de gout ne s'est fait qu'avec l'association des comprimés au bol alimentaire. Le BM est donc libéré immédiatement au niveau gastrique après l'administration. Cette libération immédiate

du BM au niveau de l'estomac pourrait être à l'origine des problèmes de nausées et de vomissements observés chez certains patients. Ces effets indésirables sont associés à certains cas de non-observance. Pour les résoudre, nous avons décidé de développer des comprimés à libération retardée de BM. Ce type de libération sera obtenu par le dépôt d'une couche de pelliculage gastro-résistant pH dépendant. Cette couche va permettre d'obtenir un masquage de gout, une facilité de manipulation de la forme pharmaceutique, une protection contre la lumière et une libération après le passage gastrique pour améliorer l'observance (problème de gout). Les comprimés auront aussi la plus forte proportion de BM possible afin de réduire le nombre d'unité par prise et la taille de ces unités de prise. Les problèmes posés par l'utilisation de la poudre de BM sans prétraitement sont :

- Une dissémination rapide dans l'environnement de travail
- Un écoulement médiocre
- L'obtention d'un produit compact (après compression) ayant un temps de délitement très long.

Pour pallier ces problèmes, nous avons utilisé un processus de granulation humide du BM avec intégration de désintégrant dans la formule, tout en évitant d'altérer ses caractères physico-chimiques.



#### IV. Les nucléolipides

Les nucléolipides (NLs) sont des molécules hybrides à base de deux structures importantes de biomolécules liées par une liaison covalente : une partie lipidique (chaîne alkylée, cholestérol, etc.) et une autre partie dérivée d'un nucléotide ou nucléoside ou nucléobase ou oligonucléotide (Figure 6). Les NLs sont des molécules amphiphiles. De nombreuses variations structurales sont possibles avec ces molécules dont la partie polaire est composée d'une association de fragments élémentaires modulables par changement de la nature du sucre, de la base azotée ou par la fonctionnalisation de ceux-ci. Il s'ajoute à cela un très grand nombre de lipides qu'il est possible d'y associer (Hamoud, 2018). Ces variations structurales vont permettre de moduler le caractère amphiphile des NLs et ainsi avoir une influence sur leurs propriétés biologiques lors de la conception des substances actives mais aussi sur la capacité à former des structures supramoléculaires. La présence simultanée d'une composante hydrophobe et d'une composante polaire confère à ces molécules des propriétés particulières d'auto-assemblage dans l'eau avec la possibilité d'obtenir des nouveaux systèmes supramoléculaires possédant des propriétés physicochimiques originales. La présence de la tête polaire dans la structure des NLs va permettre de former des interactions faibles telles que des liaisons ioniques, des liaisons hydrogène ou des interactions de type  $\pi$ - $\pi$  stacking. Les auto-assemblages obtenus à partir de ces NLs représentent des vecteurs potentiels pour la transmission de substances actives au sein de l'organisme, grâce à la formation de complexes suffisamment stables entre les objets supramoléculaires et la molécule à transporter. De plus, on s'attend à ce que ces molécules amphiphiles traversent plus facilement la membrane cellulaire, sans l'aide de transporteurs de membrane (Tonelli, 2013).

Les espèces lipidiques et les dérivés nucléotidiques qui composent les NLs sont des systèmes biologiques que l'on retrouve dans l'organisme ce qui donne un caractère bio-inspiré aux NLs. Ce caractère bio-inspiré permet d'envisager une biocompatibilité particulière surtout pour des applications pharmaceutiques avec des possibilités de vectorisation.

Les NLs existent à l'état naturel mais ils font aussi l'objet de synthèse en laboratoire.

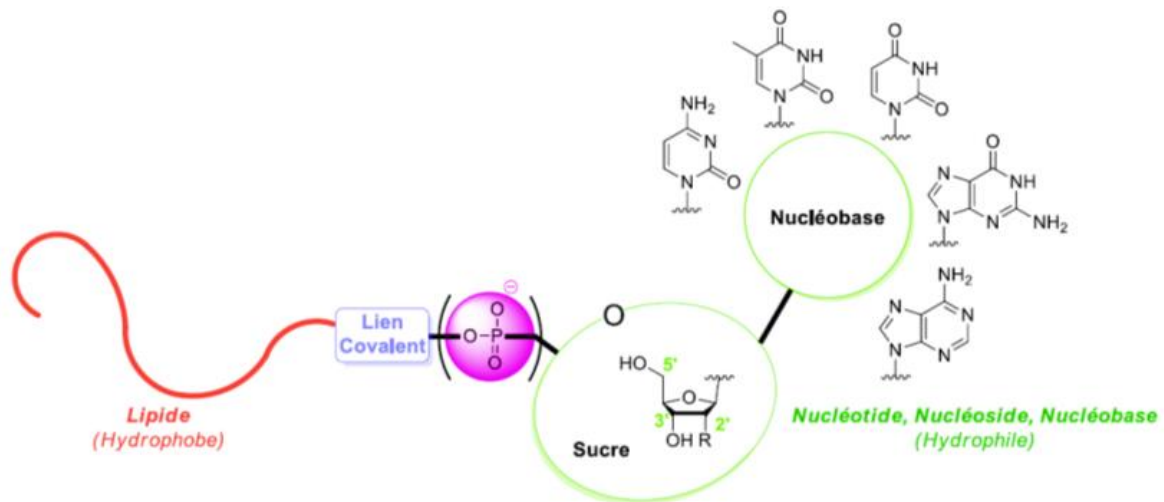


Figure 6 : Structure générale d'un nucléolipide (Hamoud, 2018)

## A. Nucléolipides naturels

Il existe une multitude de NLs naturels avec des rôles divers.

Le NL le plus présent dans les milieux naturels est la cytidine diphosphodiacylglycérol (Rosemeyer, 2005) (Figure 7). C'est un réactif intermédiaire important pour la synthèse de différents phospholipides.

Dans le grand groupe des NLs, on retrouve des molécules bioactives complexes possédant une activité antibiotique. La première famille d'antibiotique de nature nucléolipidique, les tunicamycines, fut isolée de *Streptomyces lysosupercus* par Takatsuki et al. (Takatsuki et al., 1971). Comme autre famille, les liposidomycines, fut isolée de *Streptomyces griseosporeus* (Isono et al., 1985). Les membres de ces familles sont composés d'un groupement uridine (Figure 7). Ces NLs sont capables de provoquer différentes réponses biologiques : antibiotique, antivirale, antifongique, anti-tumorale. Leur activité antibiotique consiste en une inhibition spécifique de la synthèse des peptidoglycanes, nécessaires à la formation de la paroi bactérienne.

La septacidine isolée de *Streptomyces fimbriatus* est un NL contenant un groupement adénine et possédant une activité antibactérienne (Rosemeyer, 2005).

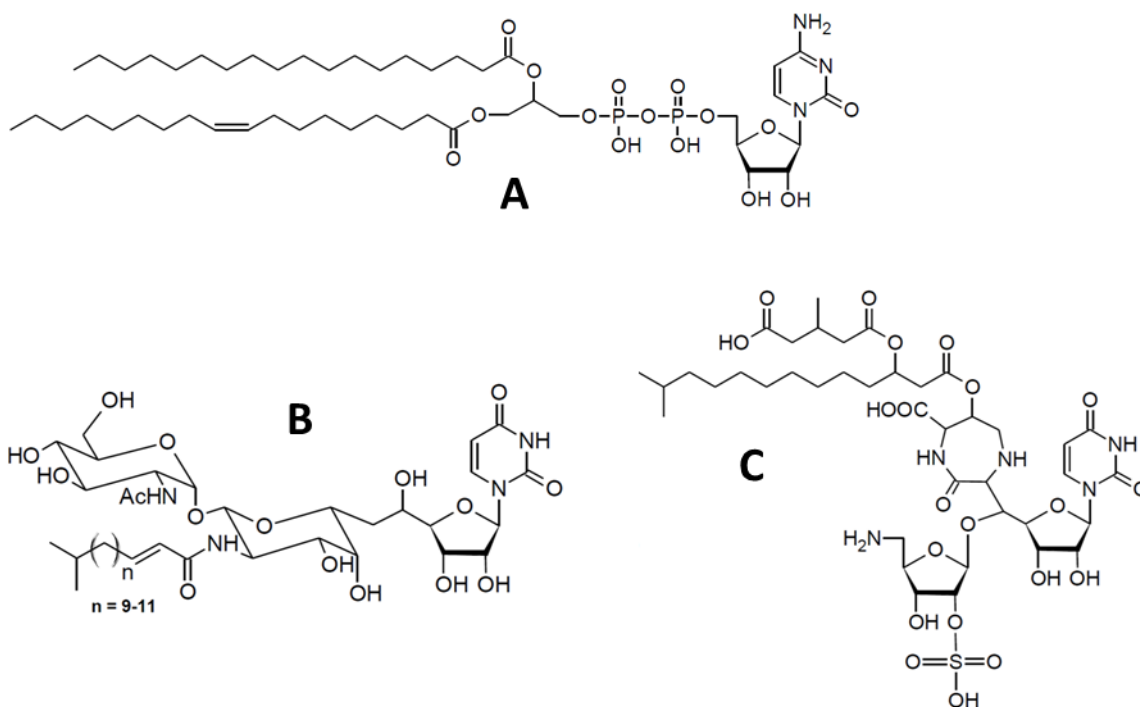


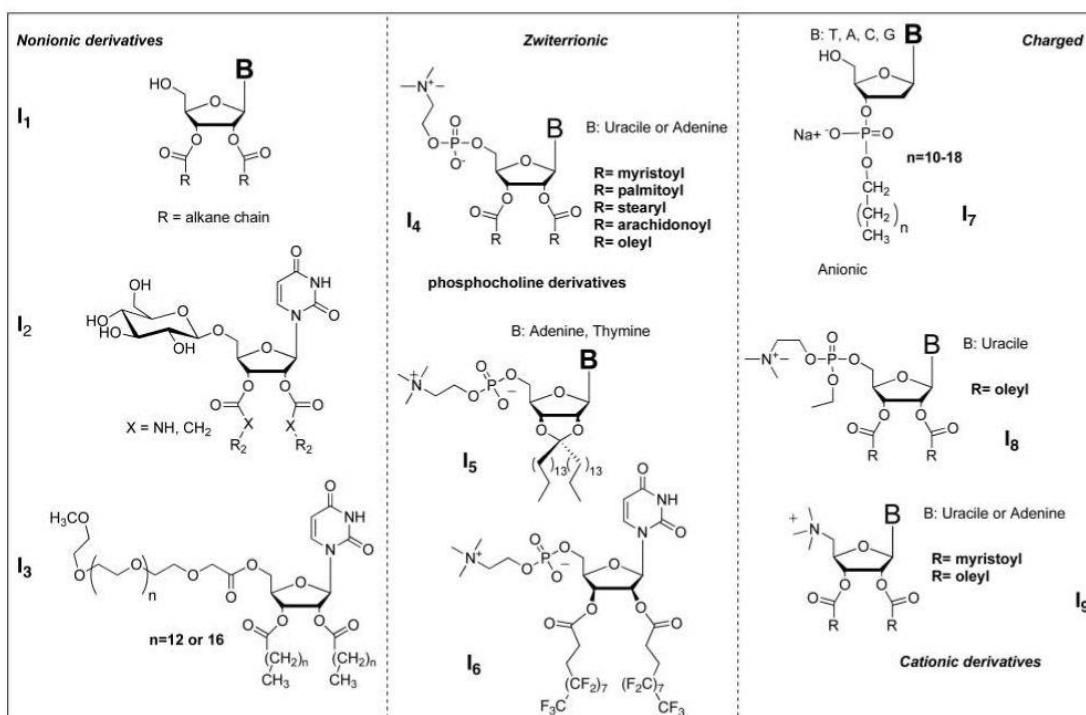
Figure 7 : Exemples de nucléolipides naturels, cytidine diphosphodiacylglycérol (A), tunicamycine (B) et liposidomycine (C) (Tonelli, 2013)

## B. Les nucléolipides synthétiques

La maîtrise de la synthèse des différentes molécules composant les NLs a permis l'émergence de pro-drogues amphiphiles capables de s'auto-assembler pour former des nano-vecteurs. Ces molécules présentent des avantages comme la facilité de formulation, l'absence d'excipient et un taux d'encapsulation généralement élevé. Jin et al. ont synthétisé l'acyclovir, la didanosine, la zidovudine qui sont des dérivés d'antiviraux analogues des nucléosides ayant pour partie lipophile le cholestérol, et comme linker des groupements succinyl, adipoyl ou phosphoryl acyl (Jin et al., 2008). Dans leur étude, ils ont montré que ces molécules étaient capables de s'auto-assembler et de former dans l'eau des vésicules de taille nanométrique.

Le groupe de recherche ChemBioPharm, dirigé par le Pr P. Barthélémy s'intéresse depuis 2002 au développement de nouveaux NLs pour de multiples applications allant des structures supramoléculaires aux systèmes de délivrance de médicaments ou de biomolécules. Dans la conception de ces nouveaux NLs, ils ont fait varier la base azotée, le sucre, la chaîne lipidique, le nombre de chaînes, la position des chaînes, la charge, la présence de sucre ou d'acides aminés afin d'étudier l'impact de la structure chimique de la molécule amphiphile sur les propriétés physicochimiques et les

propriétés d'auto-assemblage des NLs (Gissot et al., 2008; Moreau et al., 2004) (Figure 8).



*Figure 8 : Exemples de structures de nucléolipides synthétisés au laboratoire ChemBioPharm (Gissot et al., 2008)*

En partant de ces différents NLs développés, l'équipe a pu mettre en évidence l'obtention d'une diversité de structures (fibres, vésicules, microsphères) basées sur les capacités d'auto-assemblage. Ces NLs ont aussi présenté des propriétés de gélification dans l'eau mais aussi dans les solvants organiques (Gissot et al., 2008).

Dans les différents systèmes étudiés, une amélioration des interactions a été apportée avec l'ajout d'une charge positive dans la tête apolaire des nucléolipides. La DOTAU possède deux chaînes oleoyls estérifiées en position 2' et 3' du sucre, et un groupement triméthylammonium en position 5' (Chabaud et al., 2006) (Figure 9).

Afin de varier les possibilités de délivrance de produits, une autre famille de NLs représentée par des dérivés anioniques bicaténaires a été développée (Khiati et al., 2009). Ces molécules sont formées d'un nucléotide (thymidine) avec le phosphate en position 3' du sucre et des chaînes lipidiques (C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>) constituées par des 1,2-diacylglycérols estérifiés avec le phosphate (Figure 9).

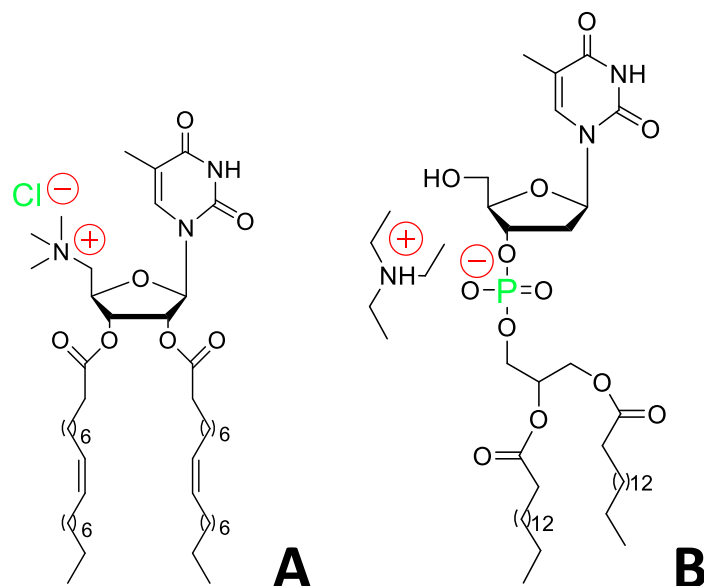


Figure 9 : Nucléolipide cationique DOTAU (A) et nucléolipide anionique diC16dT (B)

Les interactions entre les NLs et le produit à encapsuler ou à vectoriser sont principalement de type liaisons ioniques, liaisons hydrogène et  $\pi$ - $\pi$  stacking (Tonelli, 2013).

### C. Les nucléolipides et les nanoparticules

Les NLs ont été utilisés comme agent de vectorisation dans plusieurs études allant des anticancéreux aux produits contre l'athérosclérose. Dans le cas des anticancéreux, ils ont permis de formuler des NPs de Cisplatine (Khiati et al., 2011; Oumzil et al., 2014) et de Sorafenib (Benizri et al., 2018). Pour le traitement de l'athérosclérose des NPs de NLs, d'oxyde de fer et d'agents thérapeutiques ont été formulées (Oumzil et al., 2016). Toutes ces formulations à base de NLs ont amélioré l'activité d'ensemble des substances actives en permettant soit :

- De vectoriser en ciblant la zone d'activité
- D'améliorer l'activité thérapeutique
- De mettre en place une cinétique de relargage
- D'augmenter la  $\frac{1}{2}$  vie
- D'augmenter la solubilité dans l'eau

La mise en forme d'une substance active sous forme de NPs à base NLs peut donc présenter un intérêt dans la recherche d'amélioration d'activité.

## **V. La lyophilisation**

Afin d'obtenir une forme pharmaceutique finale qui pourra permettre une longue conservation des NPs, des essais préliminaires de lyophilisation ont été réalisés sur les NPs de BM.

La lyophilisation est une technique de dessiccation par sublimation de la glace de solutions, de suspensions, de tissus animaux ou végétaux, etc. préalablement solidifiés par congélation. Elle permet de retirer l'eau d'un produit afin de le rendre stable et de permettre sa meilleure conservation. La lyophilisation est considérée comme une technique permettant d'améliorer la stabilité à long terme des NPs colloïdales. La faible stabilité des NPs dans un milieu aqueux représente une vraie barrière pour une possible utilisation clinique (Abdelwahed et al., 2006).

Elle offre plusieurs avantages par rapports aux autres techniques de dessiccation :

- Conservation à la fois de l'aspect, du volume et des propriétés du produit lyophilisé
- Augmentation de la durée de conservation
- Procédé « réversible » permettant une reconstitution facile du produit
- Fabrication possible en conditions stériles

La dessiccation d'une suspension de NPs à l'aide de la lyophilisation a pour avantage de prévenir les phénomènes d'agrégation entre les particules, la dégradation des constituants qui forment les NPs et la fuite de substance active encapsulée dans les NPs (Abdelwahed et al., 2006). Le lyophilisat obtenu après lyophilisation peut être utilisé pour différentes voies d'administration (parentérale, orale, nasale ou pulmonaire) (Abdelwahed et al., 2006).

C'est cependant un procédé souvent très long (pouvant aller jusqu'à plusieurs jours), avec un coût élevé (prix élevé du matériel et grande consommation d'énergie).

### **A. Les différentes étapes du process de lyophilisation**

La lyophilisation est un process qui se déroule en 3 étapes et chacune de ces étapes a une importance particulière dans l'obtention du produit fini (Tang and Pikal, 2004). Pendant la lyophilisation, l'eau va traverser différents états (Figure 10).

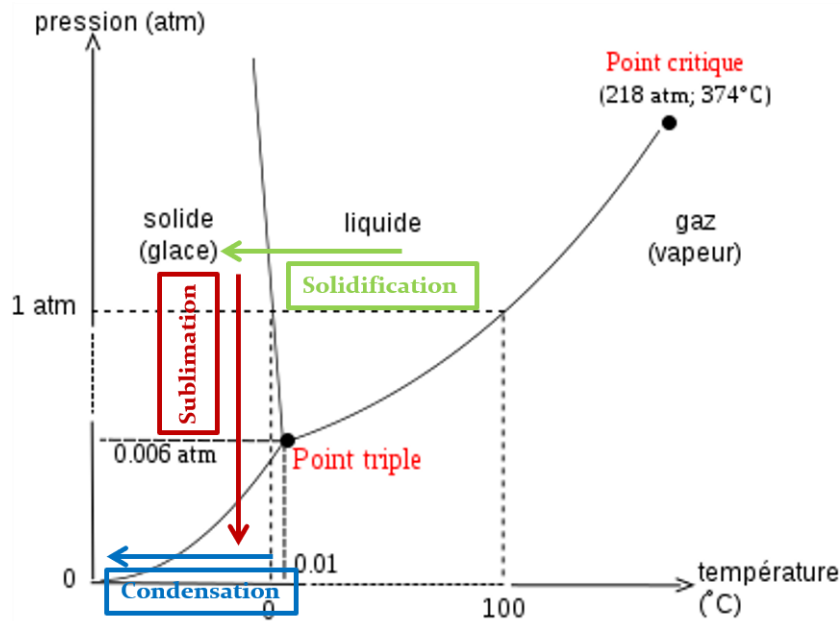


Figure 10 : Diagramme d'état de l'eau pure

### 1. La congélation

C'est la première étape de la lyophilisation. Elle consiste à congeler le produit par diminution de la température, pour que le solvant (généralement de l'eau) qu'il contient se retrouve sous forme de glace (solidification). La congélation représente la phase la plus critique de la lyophilisation, car elle va conditionner l'aspect final du produit et donc sa qualité.

La vitesse de congélation a une importance car elle influence à la fois la structure cristalline de la glace et la porosité finale de la structure, qui vont à leur tour déterminer respectivement la vitesse de séchage du produit et sa vitesse de réhydratation. Une congélation rapide va permettre d'aboutir à la formation de petits cristaux à l'intérieur du produit et de gros cristaux dans le cas d'une congélation lente (Bogdani, 2011; Jiang and Nail, 1998).

Pendant l'étape de congélation, un phénomène de surfusion peut être observé. Ce phénomène est caractérisé par la présence d'eau sous sa forme liquide malgré le fait d'être passée en dessous de sa température de solidification. Il est caractérisé par la température de fusion à l'équilibre thermodynamique ( $T_f$ ) et la température à laquelle il y a apparition spontanée des premiers cristaux de glace ( $T_{sN}$ ) (Figure 11) (Bogdani, 2011).

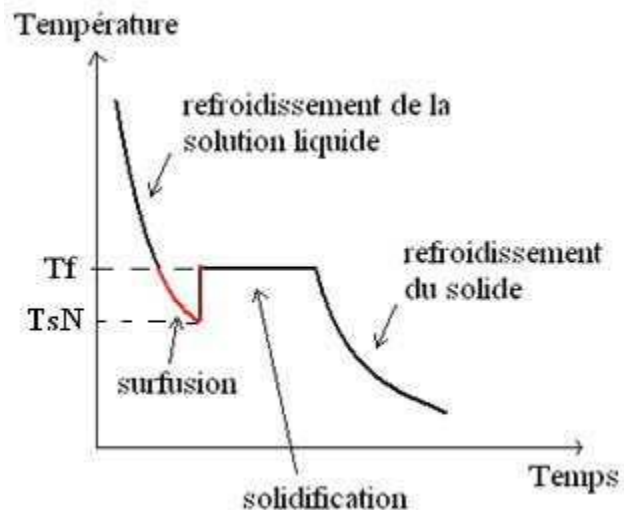


Figure 11 : Mise en évidence du phénomène de surfusion (Bogdani, 2011)

## 2. Dessiccation primaire ou étape de sublimation

Au cours de cette étape, l'eau congelée va s'éliminer du produit en passant à l'état gazeux grâce à l'application d'un vide, c'est le principe de la sublimation. Pendant cette étape, la glace va sublimer en commençant par la surface du produit jusqu'au fond du contenant. La vapeur d'eau formée par sublimation va passer de la surface du produit jusqu'au condenseur grâce aux différences de tension de vapeur et cette vapeur d'eau sera retransformée en glace (condensation) à la surface du condenseur sous l'effet de sa très basse température. A la fin de cette étape un produit poreux est obtenu avec des pores correspondants aux cristaux de glace évaporés (Williams and Polli, 1984).

Pendant la dessiccation primaire, si la température des étagères est amenée à une valeur élevée dans le but d'accélérer la sublimation, la température du produit risque d'atteindre voire dépasser la température de transition vitreuse ( $T_g'$ ), ce qui va provoquer la fusion des cristaux de glace donnant une solution concentrée gelée. Ce phénomène engendre généralement l'effondrement (collapse) du lyophilisat, avec des conséquences de dégradation chimique possibles (Hedoux, 2013).

## 3. Dessiccation secondaire

Elle consiste à soumettre le produit à la température la plus élevée possible (compatible avec sa stabilité) et à basse pression pour arracher les molécules d'eau adsorbées. L'eau adsorbée représente l'eau qui ne s'est pas transformée sous forme de glace pendant la congélation et qui ne s'est pas sublimée (Pikal et al., 1990).



## **B. Les différentes classes d'excipients**

Pour le bon déroulement de la lyophilisation et la bonne conservation du produit lyophilisé, des excipients jouant différents rôles peuvent être utilisés.

### **1. Les agents de masse**

Leur rôle est de donner un bon aspect (volume et rigidité) au lyophilisat, surtout lorsque le soluté de départ est en faible concentration. Comme exemples le mannitol, le sorbitol, le lactose, le glucose et le saccharose. Certains agents de masse peuvent avoir d'autres rôles, comme le mannitol qui peut aussi jouer le rôle d'agent stabilisant et d'agent isotonisant (Hedoux, 2013).

### **2. Les agents stabilisants**

Ils sont essentiellement utilisés pour la lyophilisation de produits biopharmaceutiques, dans le cadre de l'étape de congélation et des étapes de séchage (Carpenter et al., 1997). Ils sont encore appelés agents bioprotecteurs. On distingue deux catégories :

- Les **cryoprotecteurs** qui protègent contre les basses températures (mannitol, dextran, glucose, tréhalose...)
- Les **lyoprotecteurs** qui stabilisent la biomolécule lors de la déshydratation (mannitol, dextran, saccharose, tréhalose...)

Deux hypothèses ont été émises dans la littérature afin de pouvoir expliquer le mécanisme de bioprotection des agents stabilisants :

- L'hypothèse de remplacement de l'eau (Crowe et al., 1984), se base sur un remplacement des liaisons hydrogène entre la biomolécule et l'eau par des liaisons du même type mais cette fois ci entre la biomolécule et le bioprotecteur
- L'hypothèse de la vitrification (Green and Angell, 1989), se base sur le principe d'enrobage de la biomolécule dans une matrice à l'état vitreux impliquant une très faible mobilité moléculaire

### **3. Les agents tampons**

Ils ont pour rôle de maintenir le pH constant au sein du produit lyophilisé, pendant le cycle de lyophilisation, le stockage et la reconstitution. Le produit une fois reconstitué devrait avoir un pH se situant dans le domaine physiologique lorsqu'il fait l'objet d'une

administration. Les agents tampon les plus utilisés sont les tampons phosphate, tris, histidine et lysine (Hedoux, 2013).

#### **4. Les agents isotonisants**

Ils sont intégrés aux formulations afin que ces dernières puissent avoir une isotonie face aux fluides corporels au moment de l'administration. Les agents isotonisants les plus utilisés sont le glucose, le chlorure de sodium, le glycérol, le mannitol.

#### **5. Les agents tensioactifs**

Ils sont utilisés pour réduire les phénomènes d'agrégation, mais également pour améliorer le mouillage et favoriser l'opération de reconstitution. Les agents tensioactifs non ioniques comme le polysorbate 80 sont souvent utilisés.

#### **6. Les agents antioxydants**

Ils sont intégrés aux formulations biopharmaceutiques comme des pièges à radicaux libres lorsque l'un des composants est sensible à l'oxydation. L'agent le plus utilisé est l'acide ascorbique.

#### **7. Les agents antimicrobiens**

Ils permettent d'éviter la croissance microbienne lorsque l'unité lyophilisée a une utilisation multidose. L'alcool benzylique est souvent utilisé.

### **C. Les équipements**

Un lyophilisateur (Figure 12) est composé de plusieurs parties :

- Une **chambre de séchage** qui va contenir le produit à lyophiliser. C'est une enceinte munie de portes avec des joints garantissant l'étanchéité du système. Elle contient une ou plusieurs étagères sur lesquelles sont posés les produits à lyophiliser. Ces produits peuvent être posés directement sur les étagères ou être conditionnés dans des récipients, le plus souvent en verre. Un fluide cryogénique circule à l'intérieur des étagères ce qui assure la régulation et le contrôle de la température de celles-ci. Cette régulation va permettre de moduler la température du produit par échange thermique
- Un **condenseur** qui va permettre de piéger la vapeur d'eau émise pendant le process. Il peut être à l'intérieur ou à l'extérieur de la chambre de séchage. Il est amené à des températures basses, réduisant ainsi la pression de vapeur

d'eau, ce qui va mettre en place une différence de pression de vapeur d'eau entre le condenseur et le produit congelé

- Un **système de pompage** pour mettre en place le vide et le moduler dans le lyophilisateur



*Figure 12 : Lyophilisateur de paillasse AdVantage (Biopharma Technologie France)*

### **D. Cycle de lyophilisation et paramètres importants**

Le cycle de lyophilisation se déroule en 3 étapes. Après introduction des produits à lyophiliser dans l'appareil, le cycle démarre avec l'étape de congélation. Cette étape consiste à transformer l'eau contenue dans le produit en glace par diminution de la température pendant une longue durée et à une vitesse donnée.

La deuxième étape est celle de la dessiccation primaire. Elle correspond à la sublimation des cristaux de glace contenus dans le produit à lyophiliser. Elle consiste en l'application d'un vide avec le maintien d'une température très souvent basse. C'est l'étape la plus longue et la plus onéreuse de l'opération de lyophilisation car elle permet d'éliminer la plus grande partie de l'eau (Hedoux, 2013).

La dernière étape, celle de la dessiccation secondaire qui correspond à l'élimination de l'eau résiduelle par le phénomène de désorption. Elle consiste en une remontée en température (légèrement au-dessus de la température ambiante) associée à l'application d'un vide.

Les paramètres qui permettent de piloter un cycle de lyophilisation sont :

- La température des étagères,
- La pression dans la chambre de séchage,
- Le temps (la rampe des montées et descentes en température, le maintien des températures).

Afin de suivre le comportement des produits lyophilisés par rapport à l'évolution du cycle, des sondes températures sont placées à l'intérieur de ceux-ci.

## **VI. Les comprimés**

« Les comprimés sont des préparations solides contenant une unité de prise d'un ou plusieurs substances actives. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules. » (EDQM, 2018).

Ils sont destinés le plus souvent à une administration par voie orale :

- À avaler avec une certaine quantité d'eau,
- Dissous dans l'eau avant administration (effervescents par exemple),
- Absorption sans eau (orodispersibles)
- Séjour en bouche avec une action locale ou une absorption directe de la substance active (comprimés sublinguaux et comprimés muco-adhésifs)

Les comprimés peuvent être aussi déposés sous la peau (comprimés implantés) ou placés dans des cavités naturelles de l'organisme.

Les comprimés nécessitent une mise au point qui peut être délicate mais ils possèdent des avantages tels qu'un dosage précis par rapport à d'autres formes pharmaceutiques, l'emploi facile avec une manipulation simple, une bonne conservation car étant une forme sèche, un prix de revient assez bas grâce à la fabrication en industrie à grande échelle. C'est une forme pharmaceutique qui offre la possibilité de masquer les saveurs désagréables mais aussi des possibilités de modification de la cinétique de libération de la substance active.

### **A. Les différents types de comprimés**

Les comprimés destinés à la voie orale peuvent être classés en comprimés non enrobés, comprimés enrobés, et comprimés spéciaux.

### **1. Les comprimés non enrobés**

Ce sont des comprimés dont le délitement est obtenu dans l'estomac. C'est le type de comprimé le plus couramment proposé par les fabricants. Ils comprennent des comprimés à couche unique et des comprimés à couches multiples disposées de façon parallèle ou concentrique (EDQM, 2018). Les formes, les tailles sont très variables, ils sont parfois sécables voire multi-sécables.

### **2. Les comprimés enrobés**

Ces comprimés ont leur surface recouverte d'une couche ou de plusieurs couches de mélanges de substances diverses qui peuvent avoir un rôle fonctionnel. Le terme dragéification est utilisé lorsqu'il s'agit d'enrobage de sucre et le terme pelliculage lorsque c'est une couche mince avec des dérivés cellulosiques, des macrogols et des dérivés acryliques, méthacryliques ou vinyliques.

### **3. Les comprimés spéciaux**

#### **a. Les comprimés effervescents**

Il s'agit généralement d'un comprimé de taille importante, non enrobé, mais qui a la particularité d'associer dans sa formule un composé acide (parfois la substance active elle-même) et un carbonate. Lors de la mise au contact de l'eau, il se produit une réaction chimique formant des sels (solubles ou non) et un dégagement de CO<sub>2</sub>.

#### **b. Les comprimés solubles**

Non enrobés ou pelliculés, ces comprimés sont destinés à être dissous dans l'eau avant administration (EDQM, 2018).

#### **c. Les comprimés dispersibles**

Tout est mis en œuvre pour que le délitement du comprimé soit obtenu avant d'atteindre l'estomac, c'est-à-dire dispersé soit dans l'eau avant administration, soit au niveau buccal (orodispersible).

#### **d. Les comprimés à utiliser dans la cavité buccale**

Ils sont généralement non enrobés et doivent se désagréger ou se dissoudre dans la bouche. Dans ce groupe on peut distinguer les comprimés à sucer, les comprimés sublinguaux (doivent être maintenus sous la langue), les comprimés à croquer et les comprimés muco-adhésifs.

### **e. Les comprimés gastro-résistants**

Le but de ces comprimés est d'obtenir une libération de la substance active au-delà de l'estomac, soit pour protéger la muqueuse gastrique, soit pour protéger la substance active des sécrétions acides de l'estomac.

### **f. Les comprimés à libération prolongée**

La vitesse de libération est plus lente afin d'obtenir un taux de substance active le plus constant possible dans l'organisme tout en diminuant le nombre de prises. On distingue les formes à libération fractionnée (libération de la substance active en étapes successives) et les formes à libération continue (les comprimés osmotiques et les comprimés matriciels).

## **B. Les excipients**

Les excipients sont définis comme tout composant d'une forme pharmaceutique autre que la substance active, qui est présent dans le produit fini ou utilisé pour son élaboration est considéré comme excipient. Les produits finis pharmaceutiques ne pouvant s'obtenir la plupart du temps par la simple manipulation de la substance active toute seule, des composants sont utilisés pour aider à la formulation afin de répondre aux différentes difficultés techniques. L'excipient peut avoir plusieurs fonctions dans la formulation des produits pharmaceutiques :

- améliorer l'aspect ou le goût,
- assurer la bonne conservation de la substance active,
- faciliter l'obtention de la forme finale et l'administration du médicament,
- acheminer la substance active jusqu'à son site d'action et à contrôler son absorption par l'organisme

L'excipient doit être bien toléré par l'organisme (innocuité parfaite) ; mais il en existe qui peuvent entraîner des réactions allergiques ou des intolérances individuelles : il s'agit des excipients à effet notoire.

Les excipients ne possèdent aucune activité thérapeutique propre, ne doivent pas influencer l'activité de la substance active en l'inhibant ou en l'augmentant, et ne doivent pas interagir avec le matériau de conditionnement.

Plusieurs types d'excipients sont utilisés pour la formulation des comprimés afin d'obtenir une forme compacte possédant les propriétés désirées.

### **1. Les diluants**

Les diluants ou agents de masse sont des excipients qu'il faut ajouter à la substance active pour obtenir une masse susceptible de donner forme à des comprimés de poids déterminé, ils jouent un rôle de remplissage.

Les diluants occupent une grande partie du volume des comprimés, cette proportion est d'autant plus importante que les substances actives sont plus efficaces avec de bonnes activités à faible dose. Les propriétés des diluants sont donc très importantes. L'utilisation d'un seul diluant comme seul excipient en compression directe est envisageable si le diluant est bien choisi, pour peu qu'il ait d'autres propriétés secondaires comme par exemple, un bon pouvoir liant, autolubrifiant et désintégrant.

Les diluants les plus souvent utilisés sont les sucres (lactose, maltose, saccharose, sorbitol, mannitol ...), l'amidon, les celluloses, le phosphate dicalcique.

### **2. Les liants**

Les liants encore appelés agglutinants, permettent de lier entre elles les particules qui ne peuvent l'être sous la seule action de la pression. Leur présence permet de travailler avec des forces de compression basses. Ils offrent une possibilité d'utilisation soit à l'état sec, soit, le plus souvent, en solutions aqueuses ou alcooliques (Le Hir et al., 2016). Utilisés à sec, ils peuvent améliorer la coulabilité du mélange (Zhang et al., 2003).

Comme liants on peut citer la plupart des excipients hydrophiles qui donnent des solutions visqueuses : gomme arabique et adragante, méthyl cellulose et carboxy méthyl cellulose, gélatine, amidons, PEG 4000 et 6000, povidone en solution aqueuse ou alcoolique et aussi des solutions de saccharose, de glucose ou de sorbitol.

### **3. Les désintégrants**

Les désintégrants encore appelés délitants ou agents de délitement, permettent d'accélérer la désintégration du comprimé donc la dispersion du principe actif dans l'eau ou les sucs digestifs (Le Hir et al., 2016). Ils possèdent plusieurs mécanismes d'action en fonction de leurs propriétés, ce qui fait qu'ils peuvent donc soit être :

- des produits de solubilité différente du principe actif (hydrosolubles si la substance active est insoluble dans l'eau et vice versa)
- des produits gonflant dans l'eau. Ils favorisent la pénétration de l'eau dans le comprimé puis l'écartement du grain
- des mélanges effervescents. Dans ce cas, le délitement est assuré par un dégagement gazeux qui se produit lorsque le comprimé est mis en contact de l'eau. Il s'agit du gaz carbonique obtenu en incorporant dans la masse du comprimé un carbonate et un acide organique solide

Un bon désintégrant doit assurer une disponibilité rapide des substances actives, tout en présentant des propriétés rhéologiques satisfaisantes.

Les super désintégrants, sont de nouveaux délitants qui peuvent être utilisés à des concentrations encore plus faibles que celle du classique amidon, pour cette raison, toute variation d'écoulement et de compatibilité doit être minimisée. Ces nouvelles molécules peuvent être organisées en 3 classes en se basant sur leurs structures chimiques : amidon modifié (amidon glycolate de Na), cellulose modifiée (Croscarmellose), polyvinyl pyrrolidone à liaisons croisées (Crospovidone).

#### 4. Les lubrifiants

Les agents lubrifiants sont classés en plusieurs groupes en fonction de leur rôle. On retrouve :

- Les **régulateurs d'écoulement** qu'on appelle également glissants ou glidants. Leur rôle est d'améliorer la fluidité du grain, donc de faciliter le remplissage de la chambre de compression, ce qui est très important pour obtenir un comprimé de poids constant (Ex : silice colloïdale (aérosil), talc)
- Les **antifrictions**. Ils permettent de réduire les frictions entre les particules ou entre les particules et la paroi de la matrice ; tout le lit de poudres subit ainsi une déformation "plus régulière". Ils permettent la transmission des contraintes afin d'éviter les problèmes de clivage (Ex : stéarate de magnésium, sodium stéaryl fumarate)



- Les **antiadhérents**. Ils permettent d'éviter le « collage », en diminuant l'adhérence du grain ou des particules sur les poinçons et sur les parois de la matrice (Ex : talc).

La lubrification est un phénomène qui fait intervenir, soit deux poudres, soit un grain et une poudre, qui sont la plupart du temps fondamentalement différents par leur nature, leur densité, leur taille et leur forme, mais aussi par leur structure et leur surface externe. Ces produits sont mélangés dans des proportions et selon des conditions opératoires variables et fréquemment empiriques.

## 5. Les autres excipients de compression

**Les agents mouillants** : ce sont principalement des surfactifs. Ils sont intégrés aux formules afin de réduire les propriétés trop hydrofuges de certaines substances actives. Ils ont l'inconvénient de rendre plus difficile le dosage de la substance active.

**Les substances tampons** : elles sont intégrées aux formules soit pour protéger les substances actives contre les variations du pH, soit pour les protéger de l'action hydrolysante des sucs digestifs, soit pour réduire leur action irritante au niveau des muqueuses (Le Hir et al., 2016). Exemples : sels de Ca (carbonate, citrate, phosphate, gluconate), citrate de Na, acides aminés (glycocolle), etc.

**Les colorants** : ils sont utilisés pour améliorer le visuel ou pour mettre la différence entre plusieurs présentations (différents dosages, différentes substances actives dans un même conditionnement final). Son choix est souvent en rapport avec l'arôme si ce dernier est introduit dans la formule.

**Les aromatisants** : ils sont utilisés lorsque les composants ne possèdent pas une saveur agréable. Ils sont souvent utilisés pour les comprimés à croquer ou à sucer.

**Les absorbants et les adsorbants** : permettent de maintenir certaines substances actives volatiles dans le produit fini.

Le choix des excipients est une étape très critique dans l'élaboration de la formule. Les différents types d'excipients cités ci-dessus n'ont pas exactement les mêmes propriétés et il va donc falloir choisir en tenant compte de certaines informations :

- Des incompatibilités possibles entre les différents excipients et la substance active
- Du mode d'administration désiré (comprimés solubles ou non, à sucer, à avaler, à croquer, etc.)
- De la méthode de dosage de la substance active et sa nature car l'excipient ne doit pas perturber le dosage.

Le choix de la proportion à utiliser pour chaque excipient demande le plus souvent la réalisation de plusieurs essais et pour chaque essai, il est nécessaire de faire des contrôles (écoulement, tassement, dureté, friabilité, désagrégation, ...) afin de valider ces proportions. Un excès de l'un d'entre eux a toujours des inconvénients : un peu trop de liant retarde le délitement, trop de lubrifiant rend le comprimé plus friable.

L'élaboration d'une formule de comprimé peut être compliquée surtout lorsque le poids de la substance active utile à l'élaboration d'une unité de prise, ne permet pas d'avoir une grande marge pour l'addition des excipients.

Dans la mise au point de la formule, il faut bien déterminer les différentes étapes d'introduction des excipients mais aussi la façon de procéder à cette addition.

## **C. Les voies de fabrication des comprimés**

Trois grandes voies existent pour la fabrication des comprimés : la compression directe d'un mélange de poudres sèches, la granulation humide suivie d'une compression ; la granulation sèche suivie d'une compression (Cuq et al., 2013).

### **1. La compression directe**

La compression directe est le process le plus simple, le moins coûteux et le plus facilement transposable pour obtenir des comprimés. La compression directe consiste en un mélange direct de la substance active et des excipients, puis au compactage de la poudre par compression pour obtenir des comprimés.

### **2. La granulation**

La granulation est un procédé qui a pour but de modifier la texture d'un mélange pour augmenter sa densité, ceci afin qu'il coule bien dans la matrice et qu'il y ait le moins d'air possible entre les particules (Le Hir et al., 2016). Il existe deux modes de granulation :

- La granulation par voie sèche
- La granulation par voie humide

#### **a. La granulation par voie sèche**

Elle est utilisée lorsque la substance active est sensible à la présence de liquide ou à la chaleur. Il consiste en une fabrication de briquettes à l'aide de compacteur ou de presse alternative. Ces briquettes sont ensuite concassées à l'aide d'un broyeur pour obtenir le grain, ce qui a aussi pour inconvénient de produire beaucoup de poussières et d'accentuer l'usure des machines.

#### **b. La granulation par voie humide**

La granulation par voie humide est la plus courante en pharmacie. C'est un procédé qui fait appel à plusieurs opérations qui peuvent être réalisées simultanément avec un seul type d'appareil (procédé monophasique), ou séparément avec plusieurs types d'appareils (procédé multiphasique).

Le procédé multiphasique se présente en plusieurs étapes :

- **Humidification ou mouillage.** La poudre ou mélange pulvérulent à granuler est additionné d'un liquide de mouillage. Ceci est réalisé dans un mélangeur-malaxeur. Les liquides de mouillage peuvent être ajoutés directement dans le mélangeur avec ou sans précautions particulières ou bien avec un système de pulvérisation. Les liquides de mouillage sont généralement composés d'un solvant et d'un liant. Le liant va augmenter la force d'adhésion entre les particules ce qui améliore les capacités d'agglomération et ainsi augmenter la résistance mécanique du produit fini (Miyachi et al., 2009)
- **Granulation** proprement dite. Cette opération s'effectue au moyen d'un granulateur dont le rôle est de soumettre la masse humidifiée à une pression mécanique qui la fait passer de force à travers une surface perforée. Un granulateur oscillant est utilisé. Des barres métalliques parallèles et animées d'un mouvement de va-et-vient obligent le mélange humide à passer à travers une grille semi-cylindrique dont l'axe est horizontal
- **Séchage.** Le granulé humide subit un séchage dans une étuve à plateaux afin de réduire le taux d'humidité

- **Tamissage.** Pour avoir des grains de dimensions bien déterminées, il est nécessaire d'effectuer un tamisage qui permet en même temps que le tri de séparer les grains qui ont pu se coller entre eux.

Le procédé monophasique met en œuvre simultanément les opérations de mélange, de granulation et de séchage (MGS) dans un seul appareil. Ces types d'appareils sont encore appelés MGS.

La granulation présente un certain nombre d'avantages par rapport à un simple mélange de poudre :

- meilleure conservation de l'homogénéité
- plus grande densité
- facilité d'écoulement supérieure
- répartition plus homogène pour les dosages volumétriques
- plus grande aptitude à la compression
- porosité supérieure facilitant la dissolution.

Une fois la granulation réalisée, le grain peut être utilisé directement ou ajouté à une deuxième phase. Le mélange obtenu est utilisé pour la compression et est donc composé de :

- **Phase interne**, représentée par les grains obtenus après la granulation.
- **Phase externe**, représentée par le reste des excipients qui sont ajoutés aux grains pour assurer la bonne compression ou le bon délitement du comprimé.

## **D. Les différentes presses**

La compression est définie comme étant l'action de transformer un mélange de poudres, en formes unitaires solides de même poids et de même dosage, par l'application d'une force. Cette transformation est réalisée au moyen d'une presse qui va appliquer au mélange une force de compression suffisante pour donner la cohésion nécessaire.

Les presses possèdent des pièces importantes qui sont en contact avec le grain durant la compression :

- **La matrice.** Support métallique percé d'un trou cylindrique vertical

- **Les poinçons mobiles.** Poinçons inférieurs et poinçons supérieurs qui se déplacent verticalement et permettent de compacter le grain
- **La trémie et le sabot.** Ils assurent l'alimentation de la matrice en grain.

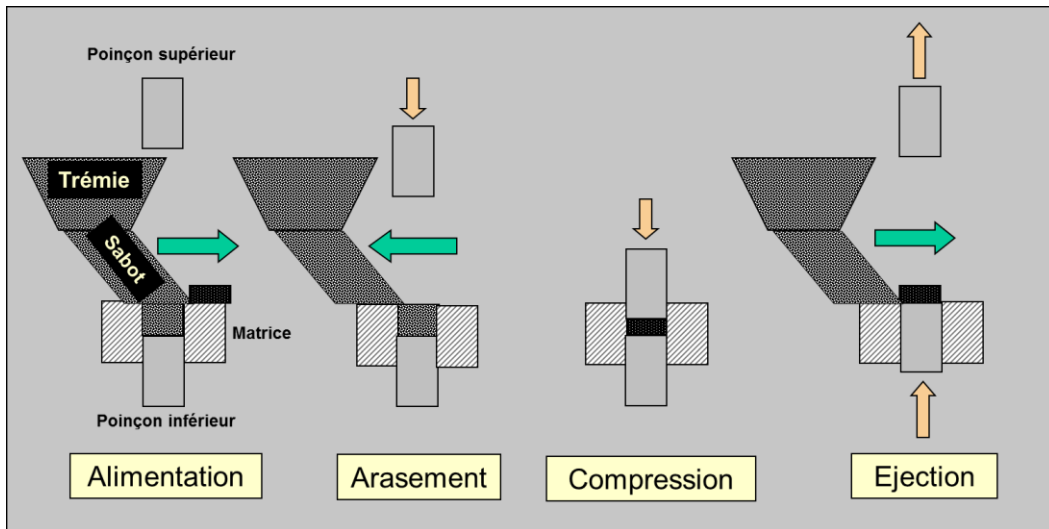
Il existe deux types de presse : la presse alternative et la presse rotative.

### 1. La presse alternative

Le cycle de compression d'une presse alternative comporte quatre phases (Figure 13)

:

- **L'alimentation.** Le poinçon supérieur remonte, le sabot s'avance au-dessus de la matrice, le poinçon inférieur descend brutalement permettant à la poudre de remplir la matrice.
- **L'arasement.** Le sabot recule en arasant la poudre dans la matrice, ce qui permet de doser exactement la quantité de poudre à comprimer. Le poinçon inférieur reste en position basse, le poinçon supérieur commence à descendre.
- **La compression.** Le poinçon inférieur reste en position basse, le sabot est en position arrière laissant le passage au poinçon supérieur qui descend dans la matrice et qui va comprimer la poudre.
- **L'éjection.** Le poinçon supérieur remonte, laissant la place au sabot qui s'avance. Le poinçon inférieur remonte lui aussi en éjectant le comprimé hors de la matrice. Le comprimé quand il arrive hors de la matrice sera poussé vers un plan incliné par le sabot qui s'avance au-dessus de la matrice pour recommencer un cycle.



*Figure 13 : Cycle de compression d'une presse alternative*

## 2. La presse rotative

La compression à l'aide d'une presse rotative se déroule selon les mêmes étapes que celles de la presse alternative mais avec des mouvements mécaniques différents (Figure 14) :

- **L'alimentation.** Le poinçon et la matrice passent sous le sabot d'alimentation. Le poinçon inférieur descend en position basse ce qui permet à la poudre de remplir la matrice. Cela se fait en deux temps :
  - o Le poinçon descend plus bas que nécessaire, acceptant une quantité de poudre supérieure au poids attendu
  - o Le poinçon remonte, en fonction du poids à obtenir
- **L'arasement.** En sortant de dessous le sabot, la poudre est arasée par un racleur
- **La compression.** Elle est réalisée par rapprochement du poinçon supérieur et du poinçon inférieur. La pression est appliquée par les deux poinçons ce qui répartie uniformément dans le comprimé les forces de contraintes
- **L'éjection.** Le poinçon inférieur remonte en éjectant le comprimé hors de la matrice, qui sera poussé vers l'extérieur vers une goulotte en arrivant contre le sabot.

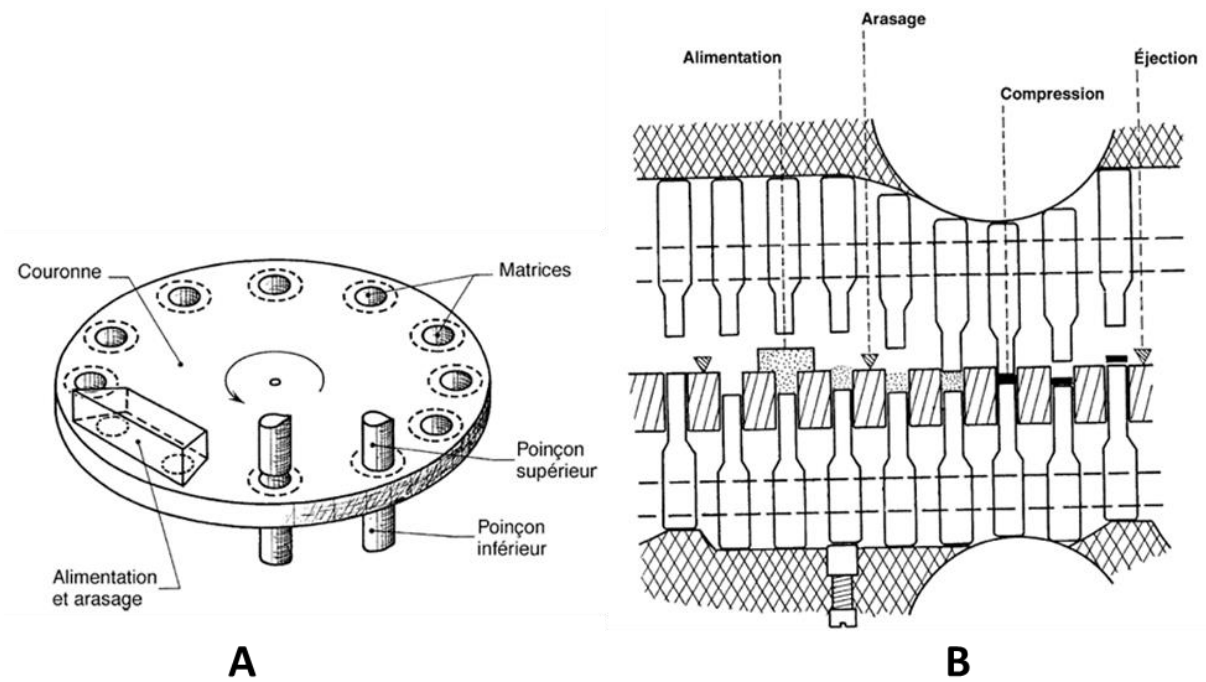


Figure 14 : Cycle de compression d'une presse rotative (Le Hir et al., 2016)  
 (A) mouvement de la tourelle et alimentation des matrices, (B) déplacement des poinçons

Les comprimés obtenus après la compression peuvent être fonctionnalisés à l'aide du pelliculage. Cette fonctionnalisation va consister en la modification de la cinétique de libération de la substance active.

### E. Le pelliculage

Le pelliculage est une technique d'enrobage. D'après la Pharmacopée européenne, un comprimé enrobé est un comprimé recouvert « d'une ou plusieurs couches de mélanges de substances diverses telles que : résines naturelles ou synthétiques, gommes, gélatines, charges insolubles inactives, sucres, substances plastifiantes, polyols, cires, colorants autorisés par l'autorité compétente et, parfois, aromatisants et substances actives » (EDQM, 2018).

Quand l'enrobage est mince, on parle de pelliculage. Quand il est épais, comportant plusieurs couches donnant une forme particulière (la dragée), c'est une dragéification (Le Hir et al., 2016).

Le pelliculage peut jouer plusieurs rôles :

- Permettre une libération intestinale en interdisant la libération gastrique

- Permettre une libération programmée
- Améliorer la prise du traitement (en facilitant la déglutition)
- Masquer un goût déplaisant ou une odeur
- Prévenir certaines incompatibilités
- Colorer un comprimé pour différencier le dosage ou le médicament
- Améliorer la mise en œuvre et éviter la production de poussières lors du conditionnement
- Protéger le comprimé de l'humidité ambiante, de l'oxygène ou de la lumière (améliore la stabilité).

Le pelliculage consiste en un dépôt de film. Ce film est déposé sous forme de solution ou suspension, qui sera séchée après dépôt sur le comprimé. La quantité de film déposée est faible et est fonction des propriétés que l'on veut donner au film : 2 à 8 % de la masse du comprimé pour une coloration et 10 à 15 % pour une libération programmée ou une gastro-résistance. Pour obtenir une forme à libération modifiée, le pelliculage à l'aide de polymère est l'une des méthodes utilisées et la vitesse de libération de la substance active est inversement proportionnelle à l'épaisseur de la couche d'enrobage déposée (Cole et al., 1995; Sadeghi et al., 2003).

### **1. Les solutions ou suspensions filmogènes**

Pour la réalisation du pelliculage, il faut des applications successives d'agents de pelliculage en fines couches. Dans la composition de ces agents de pelliculage, on peut retrouver plusieurs types d'excipients (solvant, polymères, plastifiants ...). Au moment de la préparation de la suspension de pelliculage, les excipients seront utilisés à différentes proportions et la variation de ces proportions va conférer différentes propriétés au produit de pelliculage final. Il existe des formulations « prêtes à l'emploi » commercialisées sous forme de dispersion aqueuse.

#### **a. Les solvants ou mélanges de solvants**

Le solvant ou mélange de solvant utilisé peut être aqueux ou organique. L'utilisation de solvant aqueux présente moins de contraintes car elle ne nécessite pas d'installations particulières pour retraiter les solvants, ne présente pas de risque de toxicité avec un besoin de mise en place de mesure de protection de l'opérateur, ne présente pas de risque d'explosion ou de pollution de l'environnement, et n'impose pas un niveau réglementaire poussé (Ghebre-Sellassie, 1994).



### **b. Les polymères**

Il en existe une grande variété, c'est le constituant principal qui donnera ses qualités au film (notamment la libération de la substance active). Certains sont solubles dans le solvant, d'autres sont sous forme de suspension colloïdale dans l'eau. Ils sont caractérisés par leur température de transition vitreuse (généralement élevée) car le process doit se passer au-dessus de cette température pour que le film puisse être à la fois flexible et souple. Les polymères peuvent être classés selon leurs propriétés de dissolution :

- Gastro-solubles
- Gastro-résistants ou entéro-solubles
- Insolubles à tout pH, mais rendus perméables.

### **c. Les plastifiants**

Les plastifiants sont des molécules organiques de faible masse molaire. Une fois incorporé à la dispersion de polymère, le plastifiant détruit partiellement les interactions entre les chaînes responsables de la cohésion mécanique et augmente donc leur mobilité (Yang, 2009). Les polymères initialement rigides sont transformés en matériau souple et flexible lorsqu'on les associe aux plastifiants (Cole et al., 1995). Ils abaissent la température de transition vitreuse du polymère. Ils permettent d'obtenir un film flexible au-dessous de cette température qui est généralement très élevée (Yang, 2009).

### **d. Les colorants**

Ils peuvent être solubles dans le solvant ou sous forme insoluble fixés sur laque d'aluminium ou sous forme pigmentaire (dérivés minéraux). Les colorants doivent être de grade alimentaire et être autorisés dans le pays de commercialisation.

### **e. Les opacifiants**

Ils permettent de protéger le noyau de la lumière et de lui donner une belle coloration. Ce sont souvent des pigments d'origine minérale. Ils permettent une bonne filtration des rayonnements.

### **f. Les anti-adhérents**

Ils sont recommandés avec certains polymères pour éviter le collage des noyaux entre eux, notamment pour le pelliculage de mini granules.

### **g. Les tensioactifs**

Utilisés lorsque l'on désire améliorer la mouillabilité ou faciliter la solubilisation d'un composant.

Une solution filmogène ou suspension filmogène est caractérisée par sa partie sèche (%  $M_{s\grave{e}che\ susp}$ ). Cette partie correspond aux différents excipients qui restent une fois que le solvant évaporé. Elle permet de faire les calculs de gain en masse des noyaux ( $M_{film}$ ) mais aussi les calculs de la quantité de produits à pulvériser ( $M_{susp}$ ).

*Équation 1 : Masse du film déposé*

$$M_{film} = M_{noyaux} \times \%D\acute{e}pot$$

*Équation 2 : Masse suspension de pelliculage à pulvériser*

$$M_{susp} = (100 \times M_{film}) \div \%M_{s\grave{e}che\ susp}$$

### **2. Préparation de la suspension filmogène**

La préparation de la suspension se fait à l'aide d'un agitateur avec une intégration de la partie sèche dans le solvant ou le mélange de solvant utilisé. La chronologie et la durée des opérations diffèrent selon le produit de pelliculage formulé.

### **3. Le process de pelliculage**

Le dispositif de pelliculage comprend globalement deux ensembles principaux. D'une part, le système de pulvérisation avec les fluides correspondants (pistolet, liquide de pelliculage, air comprimé) et, d'autre part, l'appareillage d'enrobage proprement dit (turbine d'enrobage ou cuve à lit fluidisé) (Wehrlé and Collectif, 2012). Pour la réalisation des essais de pelliculage, une pelliculeuse à turbine perforée a été utilisée (Figure 15).



*Figure 15 : Pelliculeuse à turbine perforée Procept®*

Le process de pelliculage se déroule en plusieurs étapes.

**a. Le préchauffage des noyaux**

Les noyaux sont introduits dans le tambour de pelliculage et sont exposés à un courant d'air chaud. Il faut que les noyaux atteignent leur température minimum d'équilibre, leur permettant de recevoir le jet de pelliculage sans s'humidifier.

**b. Le pelliculage des noyaux (dépôt du film)**

Dès qu'ils sont à température (environ 40 - 45 °C), la solution de pelliculage est pulvérisée sur les noyaux en mouvement. Pendant cette pulvérisation, la température des noyaux doit rester stable, on doit réaliser l'équilibre thermodynamique, la masse des comprimés doit augmenter régulièrement.

**c. Le séchage**

Quand la masse cible est atteinte, la pulvérisation est arrêtée, le soufflage d'air chaud continue, jusqu'à ce que les comprimés aient atteint la teneur en eau conforme.

Pour la bonne conduite de l'opération de pelliculage, les paramètres de mouvement, de pulvérisation et de séchage doivent être contrôlés. Les paramètres de mouvement sont principalement représentés par la vitesse de rotation de la turbine. Cette vitesse de rotation doit permettre un passage régulier de l'ensemble des noyaux devant la buse de pulvérisation. Les paramètres de pulvérisation regroupent le débit et la

pression de pulvérisation du produit de pelliculage, et le positionnement de la buse de pulvérisation. Les paramètres de séchage sont représentés par le débit d'air d'entrée, sa température et son hygrométrie (Wehrlé and Collectif, 2012).



# **Nanoformulations nucléolipidiques de bleu de méthylène**



La nanoformulation est un procédé de plus en plus utilisé dans le domaine de la recherche car elle permet d'améliorer l'activité thérapeutique, de protéger, de vectoriser et d'améliorer les propriétés physico-chimiques de la substance active encapsulée. En fonction des matériaux utilisés pour formuler les NPs, on distingue les systèmes polymériques, les systèmes lipidiques, les nanotubes protéiniques ou peptidiques, et les nanostructures métalliques (Pathak and Thassu, 2009).

Les NPs ont été formulées à l'aide de systèmes lipidiques. Ces systèmes sont le plus souvent utilisés pour les substances actives lipophiles où la solubilité aqueuse est le facteur limitatif de son absorption (Hu et al., 2004), ce qui n'est pas le cas du BM. De plus, l'incorporation de telles substances actives lipophiles est plus facile en raison de leur affinité pour les lipides. D'autre part, le piégeage de la substance active hydrophile à l'intérieur de la matrice hydrophobe est un véritable défi car elle a une tendance à se répartir dans l'eau pendant le processus de fabrication (Singh et al., 2010). Bien que quelques molécules hydrophiles aient été incorporées dans des systèmes lipidiques comme la thymocratine (Reithmeier et al., 2001), insuline (Liu et al., 2007) et la thymopentine (Morel et al., 1996), piéger des substances actives hydrophiles dans des nanoparticules lipidiques reste un challenge.

Les NLs ont été utilisés dans le cadre des nano-formulations car ce sont des molécules bio-inspirées (biodégradation), avec une maîtrise de leur synthèse. Les deux NLs utilisés (diC16dT et DOTAU) ont déjà fait l'objet d'utilisation dans plusieurs études de formulation (Benizri et al., 2018; Khiati et al., 2011; Oumzil et al., 2016, 2014).

L'objectif de ce chapitre est de présenter les matériaux utilisés, les différentes techniques de formulation utilisées dans le cadre de notre étude, ainsi que le dispositif expérimental pour la caractérisation physico-chimique et l'évaluation de l'activité antipaludique des NPs formulées. Ce chapitre présente aussi les conditions expérimentales des essais préliminaires de lyophilisation des NPs formulées.



## **I. Matériel et méthodes**

### **A. Formulation des nanoparticules de Bleu de Méthylène**

#### **1. Les différentes techniques de formulation des NPs à base de nucléolipides**

Les NPs formulées dans cette étude sont issues des systèmes lipidiques. Le laboratoire ChemBioPharm a développé des NLs qui sont utilisés pour la formulation de ces types de NPs (Khiati et al., 2009; Tonelli, 2013). Différentes techniques de formulation ont déjà été développées comme le film lipidique ou la nanopréciipitation (Benizri et al., 2018; Khiati et al., 2011; Oumzil et al., 2016, 2014).

Ces différentes techniques ont été utilisées dans le cadre des essais de formulation des NPs de BM (*Provepharm Life Solutions*, France). Elles se basent sur les capacités d'auto-assemblage des NLs pour former des nano-objets.

Dans les essais de formulation, les deux techniques précédemment citées ont été utilisées séparément, puis en combinaison. La diC16dT (Synvec, France) est le NL sélectionné pour formuler les NPs car il a une charge opposée à celle du BM, ce qui va permettre de mettre en place des interactions électrostatiques entre lui et le BM et ainsi favoriser la formation des NPs (Khiati et al., 2011).

##### **a. Le film lipidique**

Cette technique consiste à réaliser une fine pellicule nucléolipidique dans un tube ou une fiole à fond rond en éliminant le solvant organique de la solution nucléolipidique de départ. Lors de l'addition et de l'agitation du milieu de dispersion, des nano-objets se forment (Figure 16) (Zhang, 2017).

Le film lipidique de NLs est obtenu par évaporation du solvant organique à l'aide d'une agitation par vortex (Fisher Scientific® Topmix FB15024, France) et de l'application d'un flux d'azote. Le film de NL réhydraté est ajouté au film de BM et l'ensemble est mis sous agitation vortex pendant 5 min (Figure 16).

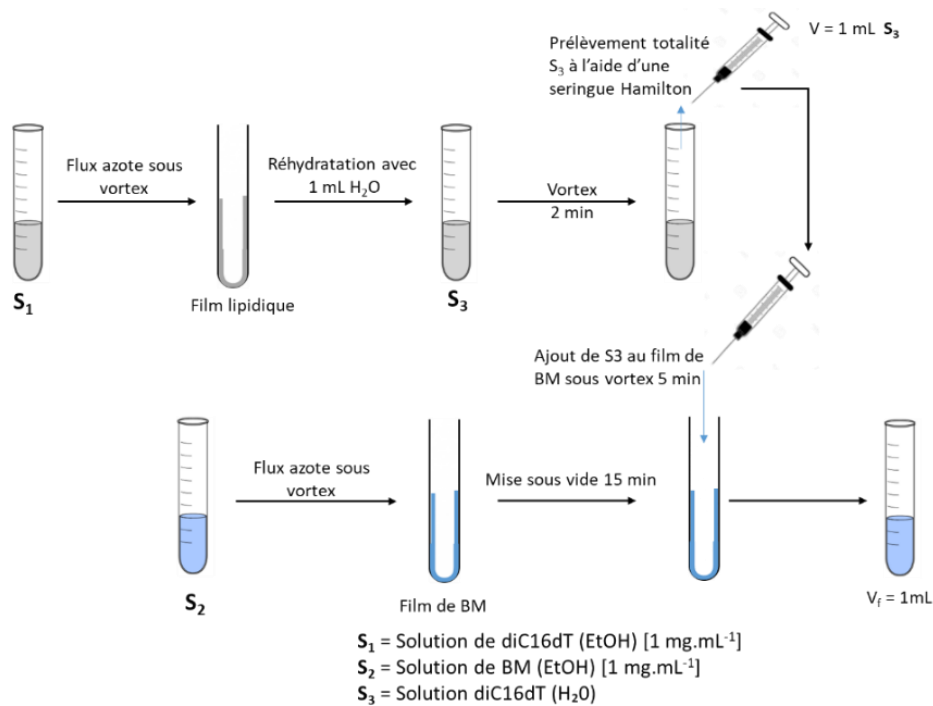
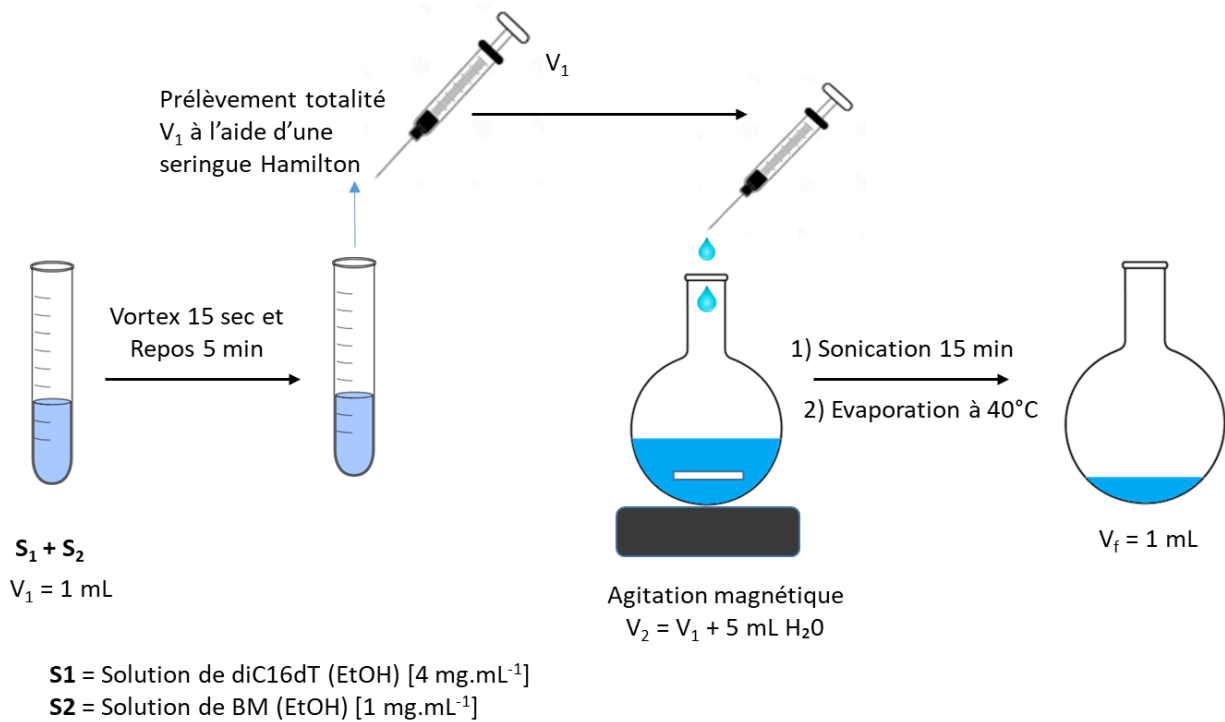


Figure 16 : Technique du film lipidique

### b. La nanoprécipitation

La nanoprécipitation consiste en l'ajout de façon lente d'une phase organique à une phase aqueuse sous agitation. Les NPs sont obtenues dans la suspension colloïdale formulée. La formation des NPs est instantanée (Wang et al., 2016). Le solvant est ensuite éliminé de la formulation par évaporation sous vide.

Le mélange diC16dT et BM est ajouté goutte à goutte à l'aide d'une seringue Hamilton (Avanti, USA) à 5mL d'eau distillée. L'étape d'évaporation pour atteindre un volume final d'environ 1 mL, est réalisée à l'aide d'un rotavapor (Heidolph® Laborota 4001, Allemagne) avec un bain marie à 40°C (Figure 17).



*Figure 17 : Technique de la nanoprecipitation*

### c. Combinaison des techniques de film lipidique et de nanoprecipitation

Lorsque les techniques de film lipidique ou de nanoprecipitation sont insuffisantes pour l'obtention de nanoobjets, celles-ci peuvent être associées (film lipidique puis nanoprecipitation) afin d'optimiser la formulation (Figure 18). Le phospholipide DOPC (Avanti, USA) est intégré à la formulation au moment de la formulation du film afin de former avec la diC16dT une bicouche fluide pour encapsuler le BM.

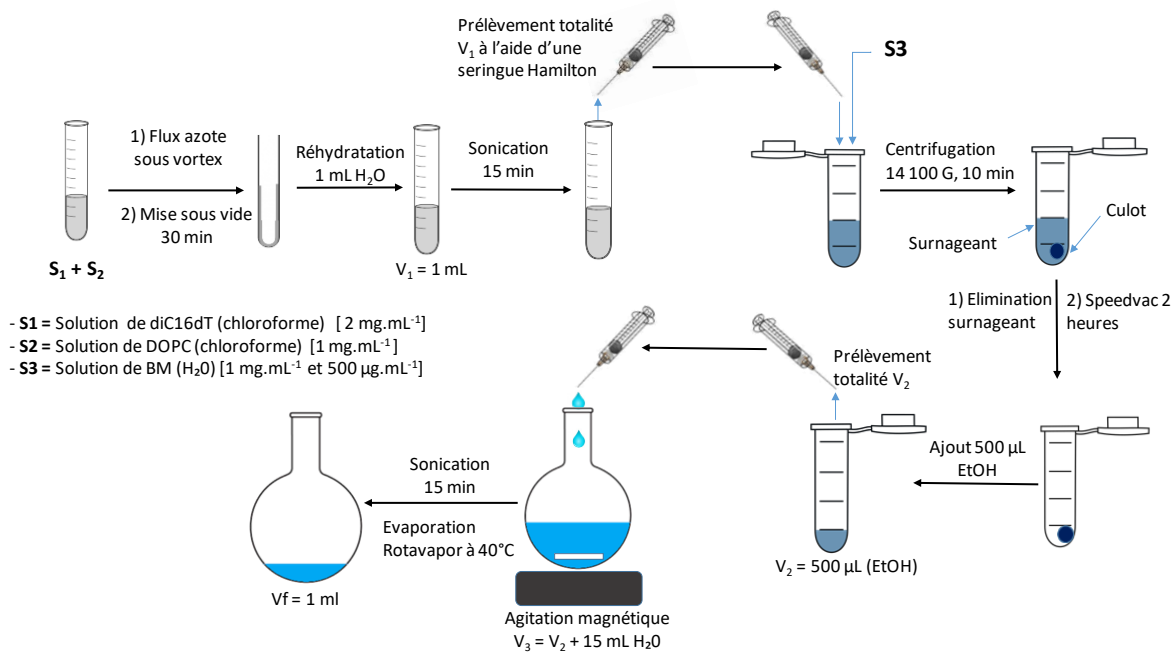


Figure 18 : Technique combinatoire : film lipidique et nanoprecipitation

D'autres options peuvent également être envisageables dont celle employée pour la formulation des NPs de BM.

## 2. Etapes de formulation des NPs de BM

La formulation des NPs de BM se déroule en plusieurs étapes. Elle combine l'utilisation de la nanoprecipitation dans un premier temps, puis du film lipidique dans un second temps. La nanoprecipitation est réalisée avec la diC16dT et le BM, et permet d'obtenir des premiers objets, les BM/diC16dT NPs. Ces BM/diC16dT NPs sont sensibles à la présence d'espèces ioniques. Leur structure est alors renforcée par l'ajout de DOTAU (NL cationique) (Synvec, France) grâce à l'utilisation d'un film lipidique de ce NL. Les BM-NPs sont donc les nano-objets obtenus après l'ajout de la DOTAU aux BM/diC16dT NPs.

### a. Formulation des BM/diC16dT NPs

La nanoprecipitation est réalisée à partir d'une solution éthanolique de BM et d'une solution éthanolique de diC16dT. Afin d'apprécier l'impact du ratio molaire entre le BM et la diC16dT sur la formulation et ainsi optimiser la formulation, différentes concentrations ont été testées (Tableau 6). Les différentes concentrations de solutions éthanoliques de diC16dT sont mélangées à 2,5 mL d'eau distillée (à 24 ± 2°C) à l'aide d'un vortex pendant 10 sec. Les solutions éthanoliques de BM sont elles aussi

mélangées à 2,5 mL d'eau distillée dans les mêmes conditions d'agitation que la diC16dT. Les dilutions obtenues (diC16dT et BM) sont mélangées. Le mélange est réalisé avec 2838  $\mu\text{L}$  de la dilution de diC16dT et 3000  $\mu\text{L}$  de la dilution de BM à l'aide d'un vortex pendant 10 sec à 1500 rpm. Les solutions ainsi obtenues sont conservées pendant 72 h, à l'abri de la lumière et à température ambiante ( $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ) afin de former les BM/diC16dT NPs. Les formulations sont conservées à l'abri de la lumière car le BM est photosensible (Sáenz-Trevizo et al., 2019).

*Tableau 6 : Ratios molaires testés pour la formulation BM/diC16dT NPs*

<b>Ratio (diC16dT/BM)</b>	<b>Dilutions diC16dT (<math>\text{mg.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Dilutions BM (<math>\text{mg.mL}^{-1}</math>)</b>
<b>4/1</b>	0,953	0,083
<b>2/1</b>	0,476	0,083
<b>1/1</b>	0,238	0,083
<b>1/2</b>	0,119	0,083
<b>1/4</b>	0,060	0,083

#### **b. Formulation des BM-NPs**

Les BM/diC16dT NPs obtenues à la fin de la nanoprécipitation sont utilisées pour formuler les BM-NPs par addition de la DOTAU aux BM/diC16dT NPs.

Afin d'ajouter ce second NL aux BM/diC16dT NPs, un film lipidique de DOTAU est d'abord réalisé par évaporation d'une solution éthanolique de DOTAU au rotavapor à  $37^\circ\text{C}$  pendant 15 min à 150 rpm. Une fois le film obtenu, les BM/diC16dT NPs sont ajoutées et l'ensemble est maintenu sous agitation pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$  toujours à la même vitesse afin de permettre une intégration de la DOTAU dans la structure des nano-objets et d'ainsi former les BM-NPs.

De la même manière que pour l'étape précédente, différents ratios (4/1, 2/1, 1/2 et 1/3) ont été testés pour optimiser la formulation des BM NPs.

### **B. Caractérisation des nanoparticules de BM**

Les NPs de BM ainsi obtenues sont caractérisées par différentes techniques physico-chimiques telles que les analyses de taille et du potentiel Zêta, les analyses spectrales, la microscopie électronique à transmission associée ou non à l'EDX, et la spectroscopie infrarouge.

## **1. Analyse de la taille et du potentiel Zêta**

Les analyses de la taille et du potentiel Zêta des NPs ont été réalisées à l'aide du Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instrument).

L'analyse de la distribution de la taille des nano-objets se fait par diffraction dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering DLS). Le mouvement brownien des particules en suspension engendre la diffusion de la lumière laser à différentes intensités. L'analyse de ces fluctuations d'intensité permet d'obtenir la vitesse du mouvement brownien et ainsi de déterminer la taille des particules à l'aide de la relation de Stokes-Einstein (Duclaux, 1940).

La mesure du potentiel Zêta se base sur l'application d'un champ électrique à la solution contenant les NPs. Ces dernières vont se déplacer à une vitesse liée à leur potentiel Zêta. Cette vitesse est mesurée au moyen d'un procédé d'interférométrie laser (*Phase analysis light scattering*) et permet de calculer la mobilité électrophorétique des particules en solution, leur potentiel Zêta et leur distribution (Benizri, 2018).

Les échantillons sont dilués au 1/20<sup>ème</sup> (v/v) dans de l'eau distillée et les analyses sont réalisées à 25°C. Les mesures de la taille et de l'indice de polydispersité (PDI) sont effectuées dans des microcuvettes en polystyrène de 2 mL et celles du potentiel Zêta dans des cellules à capillaires repliés. Toutes les mesures sont réalisées en triplicata. Les données sont analysées par le logiciel Zetasizer Software® (Malvern Instrument).

## **2. Analyse en spectroscopie UV-Visible et rendement d'encapsulation**

Les spectres d'absorption en UV-Visible ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Jasco V630 Spectrophotomètre, Oklahoma, USA).

Pour déterminer le rendement d'encapsulation (RE), 1 mL de formulation a été ultra-centrifugé à 14 100 G pendant 20 min et le dosage du BM est effectué à la fois sur la formulation dans sa totalité, sur le culot et sur le surnageant. D'une part, la formulation totale et le surnageant sont dilués au 1/10<sup>ème</sup> (v/v) dans de l'EtOH et d'autre part de l'EtOH est ajouté au culot sec (séchage à l'aide du speedvac (Christ® AVC 2-18 CD plus, Allemagne)) afin de remettre le BM en solution. Toutes les solutions éthanoliques (totale, surnageant et culot) sont passées au bain à ultrasons à 50°C pendant 20 min.

Le but étant de casser les interactions, entre le BM et les NLs, responsables de l'auto-assemblage des nano-objets et donc de pouvoir analyser le BM spécifiquement en spectroscopie UV-Visible. Les spectres ont été acquis sur la plage spectrale allant de 800 à 200 nm avec une vitesse de balayage de 400 nm.min<sup>-1</sup> en utilisant des cuves en quartz. Toutes les mesures sont réalisées en triplicata et les données sont traitées par Spectramanager® (Jasco V630 Spectrophotomètre, Oklahoma, USA).

Le  $\lambda_{\max}$  du BM est à 665 nm et 655 nm dans l'eau distillée et dans l'éthanol respectivement.

L'équation utilisée pour le calcul de rendement d'encapsulation avec la concentration en BM dans le culot ([BM culot]) et la concentration en BM dans la formulation totale ([BM total]), est la suivante :

*Équation 3 : Rendement d'encapsulation*

$$RE (\%) = \left( \frac{[BM \text{ culot}]}{[BM \text{ total}]} \right) * 100$$

### 3. Microscopie Electronique à Transmission (MET) et analyse des rayons X à dispersion d'énergie (EDX)

La caractérisation morphologique des nano-objets obtenus (BM/diC16dT NPs et BM-NPs) a été faite par TEM / EDX. Deux techniques d'observation ont été utilisées :

- **Observation sans agent de contraste** : 6  $\mu$ L de formulation sont déposés sur une grille d'observation en cuivre possédant un film carbone puis 3 minutes après, la grille est séchée
- **Observation avec agent de contraste, l'acétate d'uranyle** : l'échantillon est déposé sur la grille comme précédemment décrit, puis une goutte d'agent de contraste est rajoutée par-dessus, enlevée 2 min après et l'ensemble est séché à température ambiante pendant 15 min.

Les grilles sont observées avec un microscope Hitachi H-7650 (Tokyo, Japon) équipé d'une caméra SC1000 ORIUS®. Les images sont traitées et analysées sur les logiciels Digital Micrograph TM (GATAN, USA) et ImageJ (NIH, USA).

L'EDX (Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie) est réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission TECNAI couplé à un détecteur Quantax-X-Flash® SVE 6. Cette technique permet de déterminer les éléments chimiques qui composent l'objet observé et ainsi de pouvoir identifier les molécules impliquées dans sa composition.

#### **4. La FT-IR spectroscopie**

La spectroscopie infrarouge est utilisée pour obtenir des informations sur les types d'interactions inter-moléculaires contribuant à la formation de nos nano-objets (Servant et al., 2011).

Les spectres de BM, diC16dT, DOTAU et BM-NPs ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier muni d'un module ATR (FT-IR, UATR, Perkin Elmer, France) et analysés avec le logiciel Spectrum® (Perkin Elmer). Tous les spectres ont été enregistrés avec une moyenne de 8 accumulations et une résolution de  $8 \text{ cm}^{-1}$  entre  $4000 \text{ cm}^{-1}$  et  $450 \text{ cm}^{-1}$ . La ligne de base a été réalisée sur l'air.

### **C. Etudes de stabilité**

#### **1. Stabilité colloïdale dans le NaCl et le RPMI**

La stabilité colloïdale des BM/diC16dT NPs et BM-NPs dans le NaCl (milieu ionique) (COOPER Pharma, France) et le RPMI (milieu utilisé pour le test *in-vitro*) (Sigma Aldrich, France) fut évaluée afin d'apprécier le comportement des différentes formulations dans ces différents milieux. Une solution de NaCl à 5M est ajoutée progressivement à 400  $\mu\text{L}$  de solution de BM pur ou de suspensions de NPs diluées au  $1/20^{\text{ème}}$  (v/v) dans de l'eau distillée pour obtenir des concentrations finales en NaCl de 62, 122, 181, 238 et 294 mM. Pour le RPMI, seule une dilution au  $1/20^{\text{ème}}$  (v/v) fut réalisée. L'évaluation de la stabilité se base sur le suivi de la taille des NPs, du PDI et sur une analyse spectrale. Toutes les mesures DLS ont été réalisées en triplicata.

#### **2. Stabilité colloïdale en fonction de la température de conservation**

Pour une évaluation des meilleures conditions de stockage des formulations, des études de stabilité colloïdale ont été réalisées dans différentes conditions de température. Les BM-NPs ont été stockées dans une étuve (Memmert® UFE 400, Allemagne) à  $37^{\circ}\text{C}$  et à température ambiante ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) à l'abri de la lumière pendant



28 jours. L'évaluation s'est basée sur le suivi de la taille des particules, du PDI et du potentiel Zêta. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata.

### **3. Évaluation de la bio-réduction**

Le BM étant une molécule sensible à la présence de réducteur, formation du leucométhylène (Basu et al., 2012), une évaluation de la sensibilité de sa formulation a été réalisée. Le BM possède une couleur bleue lorsqu'il est sous sa forme oxydée et devient incolore lorsqu'il est réduit. L'acide ascorbique (COOPER Pharma, France) fut le réducteur utilisé pour cette évaluation. Les BM-NPs et une solution de BM (préparée dans les mêmes conditions que BM-NPs mais sans les NLs) ont été testées. Les formulations ont été diluées dans un premier temps au 1/10<sup>ème</sup> (v/v) dans de l'eau distillée. 100 µL d'acide ascorbique à 100 mg.mL<sup>-1</sup> (eau distillée) sont ajoutés par la suite à 1,9 mL des dilutions obtenues précédemment. Une concentration finale en acide ascorbique de 5 mg.mL<sup>-1</sup> est obtenue. Après addition de l'acide ascorbique, une cinétique d'absorption est suivie par spectroscopie UV-Visible à 665 nm pendant 15 min. Un point est mesuré toutes les 2 secondes et la réduction est exprimée en pourcentage en comparant l'absorbance initiale et celle à l'instant T. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata.

### **4. Évaluation de la photosensibilité**

Le BM est une molécule photosensible (Sáenz-Trevizo et al., 2019). Les BM-NPs et une solution de BM (préparée dans les mêmes conditions que BM-NPs mais sans les NLs) ont été diluées au 1/10<sup>ème</sup> (v/v) dans de l'eau distillée. Les solutions obtenues ont été exposées à une source lumineuse polychromatique (visible) de 18 watts pendant 42 h. L'absorbance fut mesurée à 665 nm après 0, 1, 3, 5, 8, 12, 17, 21, 37 et 42 h d'exposition. Les résultats sont présentés en pourcentage avec une comparaison à l'absorption T<sub>0</sub>. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata.

### **D. Les activités *in vitro***

La chimiosensibilité du *P. falciparum* aux différentes formulations de BM a été évaluée sur les souches de référence 3D7 (originaire d'Afrique, sensible à la CQ) et W2 (originaire d'Asie du Sud-Est, résistante à la CQ). La souche W2 est représentative des souches multirésistantes de *P. falciparum*. Elle est résistante à plusieurs antipaludiques dont la CQ et la QN. Alors que la souche 3D7 est sensible à la plupart des antipaludiques dont ceux précédemment cités. Cette résistance acquise de façon

naturelle reste stable même sous les conditions de culture en laboratoire (Rathod et al., 1997). Les techniques de réalisation des tests *in vitro* sont celles utilisées par l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) Marseille. Les tests de chimiosensibilité ont été réalisés en triplicata et répétés cinq fois.

## **1. Les produits testés**

### **a. Les formulations de base**

Une solution de BM et les BM-NPs ont été diluées dans de l'eau distillée afin d'avoir des concentrations de BM finales allant de 2 nM à 125 nM dans les microplaques utilisées pour le test de chimiosensibilité.

### **b. Évaluation de bio-réduction**

La solution de BM et les BM-NPs ont été diluées au 1/10<sup>ème</sup> (v/v) dans une solution d'acide ascorbique à 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Des dilutions successives ont été réalisées sur les solutions obtenues afin de respecter les mêmes dilutions que celles utilisées pour les formulations de base. Le BM se réduit en leucométhylène en présence d'un réducteur (Figure 3). L'acide ascorbique est utilisé afin de pouvoir réduire le BM et d'évaluer l'effet de sa réduction sur son activité antipaludique.

### **c. Évaluation de la photosensibilité**

La solution de BM et les BM-NPs ont été diluées au 1/10<sup>ème</sup> (v/v) dans de l'eau distillée puis exposées pendant 16 h à une source lumineuse (18 Watts). Des dilutions successives ont été réalisées sur les solutions obtenues afin de respecter les mêmes dilutions que celles utilisées pour les formulations de base.

## **2. Test de chimio-sensibilité de *P. falciparum***

Le test a été réalisé sur des GRs infectés par *P. falciparum* (stade trophozoïte jeune) avec une parasitémie finale à environ 0,5 % et un taux d'hématocrite à 1,5 %. Il a été effectué dans des microplaques de 96 puits. 100 µL de GR infectés et 12,5 µL des différentes dilutions de chaque formulation ont été aliquotés dans les microplaques. Les microplaques ont été incubées pendant 72 h en atmosphère contrôlée à 85 % de N<sub>2</sub>, 10 % d'O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> et 37°C, puis elles ont été congelées à -20°C pendant 24 h. Elles ont ensuite été décongelées à 37°C pendant 1 h. La congélation puis décongélation des microplaques permet de lyser les GR, ce qui entraîna une libération des parasites dans le milieu. Les lysats obtenus ont été transférés dans une autre plaque de 96 puits contenant un film d'anticorps anti HRP2. Les protéines HRP2 du

parasite mort interagissent avec les anticorps pour donner un gradient de couleur pour chaque puits.

### 3. Détermination des concentrations inhibitrices 50 % (CI<sub>50</sub>)

La CI<sub>50</sub> est définie comme étant la concentration de produit qu'il faut pour diminuer de 50 % la parasitémie d'une culture mise en contact avec le produit à tester par rapport à la parasitémie d'une culture de croissance sans produit (témoin). Une mesure de l'absorbance de chaque puits a été réalisée par mesure de la fluorescence. Les parasitémies observées par fluorescence ont été rapportées au témoin de culture, en fonction des différentes concentrations de produit, ce qui permet d'établir une courbe « effet-dose ». La CI<sub>50</sub> de tous les produits testés est déterminée par régression linéaire des différentes courbes obtenues.

## E. La lyophilisation des NPs

Les essais préliminaires de lyophilisation des BM-NPs ont été réalisés à l'aide du lyophilisateur VirTis AdVantage Pro EL (Biopharma Technologie, France). Des excipients (cryoprotecteur et / ou lyoprotecteur) ont été ajoutés aux formulations de BM-NPs diluées au 1/5<sup>ème</sup> (v/v) dans de l'eau distillée, avant la lyophilisation.

Des contrôles DLS (taille et PDI) et Zêta ont été réalisés avant et après le cycle de lyophilisation afin de voir son impact sur les caractéristiques physico-chimiques des BM-NPs.

La programmation du cycle de lyophilisation était composée de plusieurs étapes :

- **La pré-congélation** : avant introduction des échantillons, les étagères ont été refroidies dans la chambre de lyophilisation
- **Le traitement thermique** : il correspondit à l'étape de congélation et précise les rampes de température et les temps de maintien des températures appliqués aux échantillons
- **L'évacuation** : elle correspondit aux conditions de température et de pression dans la chambre avant le lancement de l'étape de séchage
- **Le séchage** : il présente le paramétrage pendant la dessiccation primaire et la dessiccation secondaire

- **Le stockage** : il contiendra les conditions de conservation des échantillons une fois le cycle terminé.

Pour l'ensemble des essais, les échantillons avaient une masse totale de 2 g (BM NPs +/- excipients). Les excipients utilisés ont été le Mannitol (M) ( $T_g'$  environ  $-30^{\circ}\text{C}$  (Cavatur et al., 2002)) et le Dextran (D) ( $T_g'$  environ  $-22^{\circ}\text{C}$  (Larsen et al., 2019)). Pour dissoudre l'ensemble des excipients, une agitation au vortex de 45 secondes a été réalisée.

Différentes conditions de lyophilisation ont été testées donnant lieu aux essais A, B et C. Les différentes formulations testées sont présentées dans le Tableau 7.

*Tableau 7 : Préparations testées pendant les essais de lyophilisation*

<b>Formulations</b>	<b>Excipients ajoutés aux BM-NPs</b>
<b>Essai A</b>	
<b>F1</b>	-
<b>F2</b>	10 % M
<b>F3</b>	10 % M + 1 % D
<b>Essai B</b>	
<b>F1</b>	10 % M
<b>F2</b>	10 % M + 1 % D
<b>F3</b>	15 % M
<b>F4</b>	15 % M + 1 % D
<b>Essai C</b>	
<b>F1</b>	10 % M
<b>F2</b>	10 % M + 1 % D
<b>F3</b>	15 % M
<b>F4</b>	15 % M + 1 % D

## **Essai A**

Les différents échantillons lyophilisés et les conditions de lyophilisation sont présentés dans les Tableaux 7 et 8 respectivement.

*Tableau 8 : Cycle de lyophilisation de l'essai A*

Pré-congélation				
-20°C				
Traitement thermique				
Étape	Étagère (°C)	Rampe (min)	Maintien (min)	
1	-40	60	180	
Évacuation				
Condenseur (°C)			-65	
Vide (mTorr)			400	
Séchage				
Étape	Étagère (°C)	Rampe (min)	Maintien (min)	Vide (mTorr)
1	-35	15	420	150
2	25	180	120	150
Stockage				
Étagère (°C)			25	
Vide (mTorr)			400	

## **Essai B**

Pour l'essai B, les différents échantillons lyophilisés et les conditions de lyophilisation sont présentés dans les tableaux 7 et 9 respectivement.

*Tableau 9 : Cycle de lyophilisation de l'essai B*

Pré-congélation				
-50°C				
Traitement thermique				
Étape	Étagère (°C)	Rampe (min)	Maintien (min)	
1	-50	0	180	
Évacuation				
Condenseur (°C)			-65	
Vide (mTorr)			400	
Séchage				
Étape	Étagère (°C)	Rampe (min)	Maintien (min)	Vide (mTorr)
1	-38	45	420	150
2	25	180	120	150
Stockage				
Étagère (°C)			25	
Vide (mTorr)			400	

## **Essai C**

Les différents échantillons lyophilisés et les conditions de lyophilisation sont présentés dans les Tableaux 7 et 10 respectivement.

*Tableau 10 : Cycle de lyophilisation de l'essai C*

Pré-congélation				
5°C				
Traitement thermique				
Étape	Étagère (°C)	Rampe (min)	Maintien (min)	
1	5	0	20	
2	-5	15	15	
3	-40	50	120	
Évacuation				
Condenseur (°C)			-65	
Vide (mTorr)			400	
Séchage				
Étape	Étagère (°C)	Rampe (min)	Maintien (min)	Vide (mTorr)
1	-30	20	600	150
2	25	120	120	150
Stockage				
Étagère (°C)			25	
Vide (mTorr)			400	

Les échantillons lyophilisés ont fait l'objet de contrôle et d'analyse avant (contrôle visuel, taille et potentiel Zêta) et après (aspect visuel, temps de reconstitution, taille et potentiel Zêta) le cycle de lyophilisation. Les échantillons ont été reconstitués avec de l'eau distillée.

## **F. Les analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec une utilisation du test de Student (XLSTAT 2018, Addinsoft, France). Les  $CI_{50}$  ont été calculées en utilisant <http://www.antimalarial-icestimator.net/> (Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, INSERM et Hôpital Bichat Claude Bernard, AP-HP). La différence entre deux groupes est considérée comme statistiquement significative lorsque  $p < 0,05$ .

## II. Résultats et discussions

### A. Études physicochimiques

#### 1. Essais de formulation des NPs à base de nucléolipides

Les techniques de formulation (film lipidique et nanoprécipitation) comme décrites dans les sous-chapitres A.1.a et A.1.b ayant donné des résultats non satisfaisant (polydispersité PDI > 1), l'approche combinatoire (film lipidique et nanoprécipitation) a été envisagée. L'association du film lipidique et de la nanoprécipitation a montré une dispersion de la taille le plus probablement due à la phase au rotavapor (variation des temps d'évaporation pour l'obtention d'un volume final d'environ 1 mL) (Tableau 11).

*Tableau 11 : Caractéristiques physicochimiques des NPs obtenues par l'approche combinatoire*

Essais de formulation	Taille (nm)	PDI	Zêta (mV)
1	105,8	0,077	-40
2	60,06	0,296	-37,5
3	47,64	0,596	-34,1

Cependant, lors de la conservation d'une formulation à température ambiante après l'étape d'agitation magnétique (Figure 18), des NPs se sont formées au bout de 3 jours. Le système de NPs étudiées est donc bel et bien un système dynamique qui a besoin d'un certain temps pour l'établissement des interactions / effets responsables de l'auto-assemblage des NPs.

L'étape suivante consista à optimiser les ratios de chaque substance entrant dans la formulation des NPs.

#### 2. La formulation des BM/diC16dT NPs

Compte tenu des résultats obtenus avec la technique combinant film lipidique et nanoprécipitation, le protocole a été modifié avec la suppression de l'étape d'évaporation au rotavapor. Le nouveau protocole de formulation (sous-chapitre A.2.a) se base sur une nanoprécipitation entre le diC16dT et le BM, mais sans la phase d'évaporation.

### a. Optimisation de la formulation des BM/diC16dT NPs

La formulation des BM/diC16dT NPs a fait l'objet d'optimisation avec l'utilisation de différents ratios entre le diC16dT et le BM. Les nano-objets obtenus avec les différents ratios testés ont été caractérisés par DLS, potentiel Zêta et spectroscopie UV-Visible.

Les ratios (diC16dT/BM) 2/1 et 1/1 présentent des PDI inférieurs à 0,3 et des tailles de particules inférieures à 350 nm (Tableau 12). Un potentiel Zêta négatif a été obtenu pour toutes les formulations. Cette valeur négative est liée à la charge du NL utilisé (diC16dT) (Figure 9) pour former les nano-objets (Benizri et al., 2018; Khiati et al., 2011; Oumzil et al., 2016, 2014). Les différentes valeurs des potentiels Zêta obtenus sont en rapport avec le ratio molaire diC16dT et BM. L'augmentation des proportions de diC16dT entraîne une augmentation du potentiel Zêta des objets formés. Les différentes valeurs de potentiels Zêta obtenues ont été à l'extérieur de l'intervalle [- 30 mV et + 30 mV], signe d'une force répulsive suffisante pour atteindre une meilleure stabilité colloïdale physique (Joseph and Singhvi, 2019; Teng et al., 2013).

*Tableau 12 : Analyse DLS et Zêta des formulations à différents ratios molaires diC16dT/BM*

<b>Ratio molaire diC16dT/BM</b>	<b>Taille (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Zêta (mV)</b>
<b>4/1</b>	1170	0,235	-66,7
<b>2/1</b>	205,8	0,154	-67,8
<b>1/1</b>	301,5	0,173	-42,8
<b>1/2</b>	405,5	0,167	-32,2
<b>1/4</b>	98,17	1	-31,8

En spectroscopie UV-Visible, les lambda max du diC16dT et du BM sont à 266 nm et 665 nm respectivement (Figure 19). L'existence de plusieurs  $\lambda_{\max}$  pour le BM et notamment du  $\lambda_{\max}$  dans le visible (665 nm) où le diC16dT n'absorbe pas, a permis de développer une méthode de quantification spécifique du BM (car pas d'interférences d'autres composés). Une modification du spectre du BM dans le visible a été observée lorsqu'il était en présence du diC16dT avec un effet hypochrome (a) et l'apparition d'un épaulement (b). L'effet hypochrome démontre une interaction entre le BM et le diC16dT, et plus il est prononcé, plus l'interaction est forte (Paul et al., 2017; Zhang and Tang, 2004).



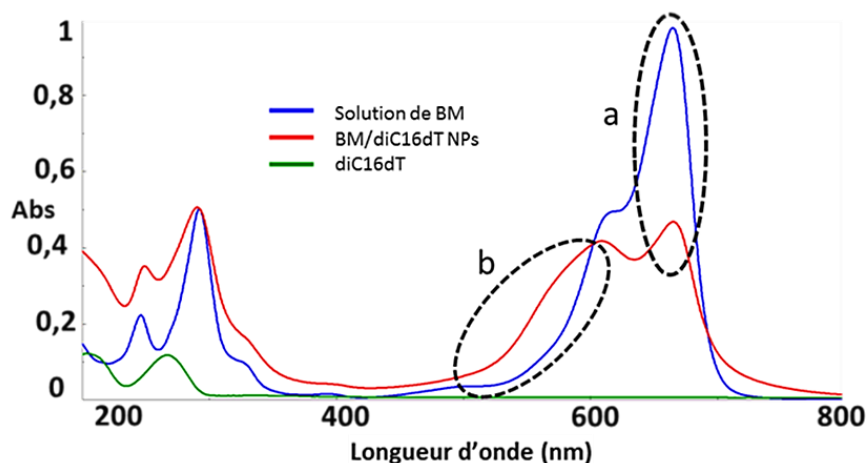


Figure 19 : Spectres de la diC16dT (vert), du BM (bleu) et de BM/diC16dT NPs (rouge)

Les résultats obtenus dans l'étude d'optimisation de la formulation (Figure 20) montrèrent que le ratio (diC16dT/BM) 1/1 a l'effet hypochrome le plus prononcé, démontrant une plus forte interaction entre les composés utilisés.

De plus, un point isobestique à une longueur d'onde de 597 nm a été mis en évidence, démontrant l'existence d'une interaction entre le diC16dT et le BM (Tabbara and El Jamal, 2012).

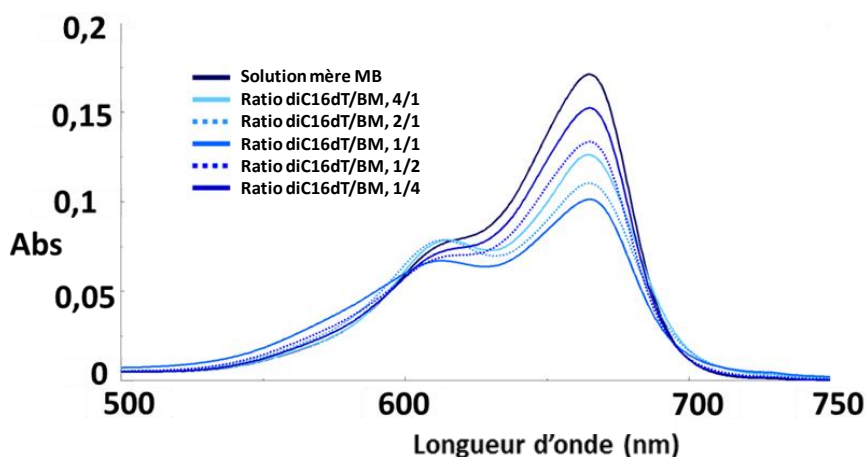


Figure 20 : Signature spectrales des formulations à différents ratios molaires diC16dT / BM

En combinant les données obtenues par les différentes techniques physico-chimiques, le ratio molaire (diC16dT/BM) 1/1 a été retenu, car présentant l'interaction la plus forte et un PDI inférieur à 0,3. La température de l'eau distillée utilisée pour les formulations s'est avérée être un paramètre critique pour l'obtention et l'homogénéité de la taille

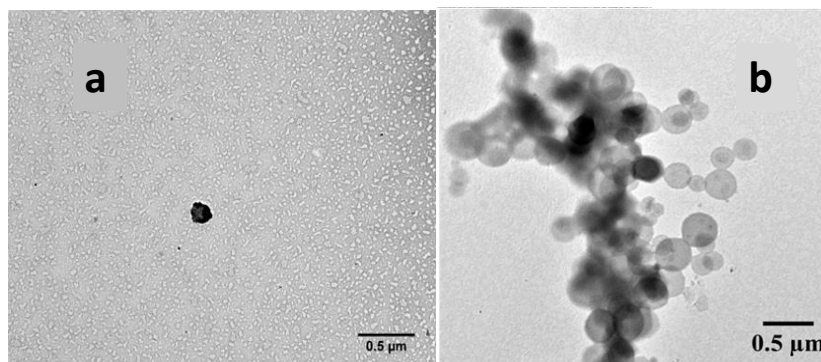
des NPs. Par conséquent, celle-ci a été fixée à  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  pour l'ensemble des formulations réalisées pour les caractérisations et les essais *in vitro*.

La technique de formulation et le ratio diC16dT/BM ayant été choisis, l'étape suivante a été la caractérisation granulométrique et microscopique des NPs formulées.

### **b. Analyse granulométrique et microscopique des BM/diC16dT NPs**

Les BM/diC16dT NPs une fois formulées avec un ratio molaire (diC16dT/BM) 1/1, ont fait l'objet d'analyses DLS et Zêta, afin de voir si elles ont des caractéristiques correspondantes aux attentes. Une taille de  $196,5 \pm 4,2$  nm, un PDI de  $0,078 \pm 0,0078$  et un potentiel Zêta de  $-39,2 \pm 2,7$  mV ont été obtenus, ce qui rentre dans le cahier des charges pour ces formulations.

Des observations en MET associées à de l'EDX ont été réalisées afin de confirmer les informations de l'analyse granulométrique par DLS et de confirmer la présence du BM et du diC16dT dans les nano-objets observés (Figure 21). Différentes méthodes de préparation d'échantillon ont été testées pour la MET. L'observation avec l'acétate d'uranyle (a) n'a pas donné de résultats concluants (absence de nano-objets correspondants aux NPs attendues) alors que l'observation sans agent de contraste a permis de mettre en évidence des structures sphériques (b) dont les tailles correspondent aux résultats de DLS.



*Figure 21 : Image MET des BM/diC16dT NPs avec acétate d'uranyle (a) et sans agent de contraste (b) (barre d'échelle de 0,5 µm)*

L'acétate d'uranyle a la capacité de se lier aux groupes phosphate des acides nucléiques et de fournir des zones de contraste à densité électronique sur les grilles de microscopie électronique (Pandithage, 2013) permettant habituellement

l'observation de NPs formulées avec des NLs (Benizri et al., 2018; Khiati et al., 2011; Oumzil et al., 2016, 2014). Dans l'étude présentée ici cela n'a pas été le cas. L'ion acétate étant chargé positivement (Annexe 1), une compétition avec le BM a pu s'établir provoquant la destruction des NPs préexistantes. A contrario, l'observation sans agent de contraste a permis d'obtenir des images de BM/diC16dT NPs avec des tailles d'objets en adéquation avec les résultats obtenus en DLS. Les objets observés étaient sphériques et parfois regroupés sous forme de « grappes ». Les grappes observées peuvent être dues au mode de préparation des grilles avec un asséchement de l'échantillon favorisant le regroupement des nano-objets.

La seconde étape dans l'analyse microscopique des NPs a été de confirmer la présence de BM et de diC16dT au sein des structures observées. Une analyse en EDX a donc été envisagée car elle permet, par l'utilisation d'un rayon X, d'obtenir le spectre élémentaire du point étudié (Figure 22 (a)). Pour ce faire, cette analyse a été faite à la fois sur une zone ne présentant pas de NPs (point contrôle, spot I) et sur une zone contenant ces dernières (test, spot II). Comme illustré dans la Figure 22 (b), des atomes de phosphore (P), de soufre (S) et de chlore (Cl) ont été mis en évidence sur la zone spécifique des NPs confirmant la présence du BM (par les atomes S et Cl) et du diC16dT (par l'atome P) dans ces nano-objets. Le cuivre (Cu) mis en évidence sur les deux spots correspond à la grille d'observation utilisée. La technique de formulation employée permet donc bien l'obtention par auto-assemblage de NPs de BM.

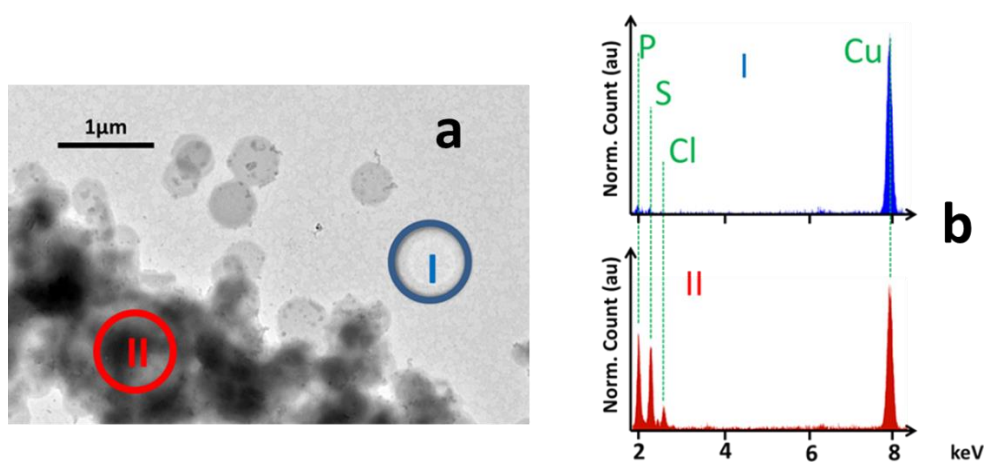


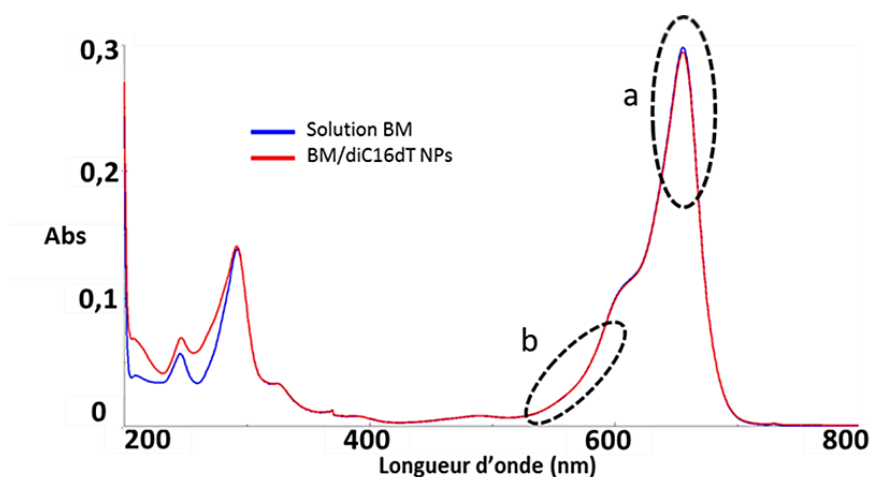
Figure 22 : Image MET et spots EDX (a) (barre d'échelle 1 μm) et spectres des spots EDX (b) des BM/diC16dT NPs

La microscopie électronique ayant mis en évidence la présence du BM dans les NPs, l'étape suivante a consisté à évaluer son taux d'encapsulation dans ces dernières.

### c. Rendement d'encapsulation des BM/diC16dT NPs

L'effet hypochrome et l'épaulement observés avec la formulation BM/diC16dT NPs (Figure 19) ne permettent pas de réaliser un dosage direct du BM. Une préparation d'échantillon doit donc être réalisée afin de casser les interactions entre le BM et le diC16dT, et ainsi libérer le BM pour faciliter son dosage.

Le traitement a donc été réalisé par une dilution au 1/10<sup>ème</sup> (v/v) dans l'EtOH des formulations étudiées (BM/diC16dT NPs et d'une solution de BM) puis un passage au bain à ultrasons pendant 20 min à 50°C (Figure 23) avant analyse en spectroscopie UV-Visible.



*Figure 23 : Spectres des BM/diC16dT NPs et d'une solution BM dans l'EtOH après passage au bain à ultrasons*

Une disparition de l'effet hypochrome (a) et de l'épaulement (b) a été observée après traitement des BM/diC16dT NPs (Figure 19) entraînant, une superposition des spectres de la solution de BM et des BM/diC16dT NPs dans le visible. L'addition d'EtOH puis le passage au bain à ultrasons a permis de casser les interactions entre le BM et le diC16dT, et donc de libérer le BM.

Afin de déterminer le rendement d'encapsulation des BM/diC16dT NPs, une courbe d'étalonnage de BM a été réalisée dans l'EtOH (Figure 24).  $y = 292,52x + 0,0064$  et  $R^2$  de 0,998.

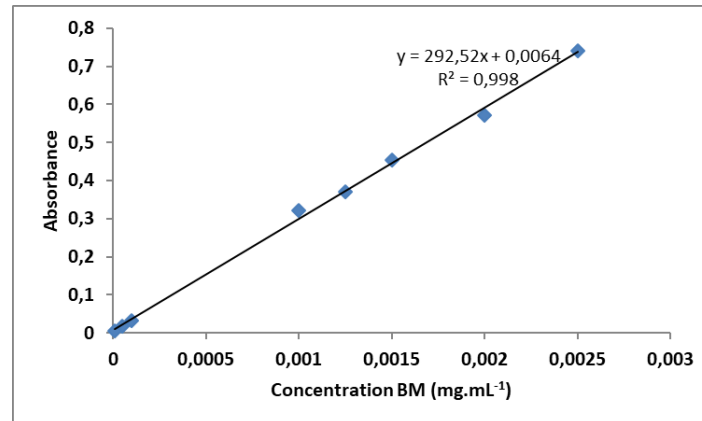


Figure 24 : Courbe d'étalonnage du BM dans l'EtOH

Pour déterminer le rendement d'encapsulation des BM/diC16dT NPs, le BM encapsulé doit être séparé du BM libre. Cette séparation a été réalisée par centrifugation des formulations à 14 100 G pendant 20 min, permettant l'obtention d'un culot bleu. Afin de déterminer la nature du culot obtenu, la centrifugation a également été effectuée sur une solution de BM (même concentration en BM que les formulations) et aucun culot n'a été observé (Annexe 2) confirmant la nature nanoparticulaire du culot précédemment cité. La centrifugation a donc permis de séparer le BM libre (surnageant) du BM encapsulé (culot).

Un rendement d'encapsulation de  $86,7 \pm 1,33$  % a été déterminé, ce qui est bien supérieur aux 10 % obtenus par Oumzil et al. dans le cadre du traitement de l'athérosclérose (Oumzil et al., 2016).

Les formulations étant destinées à des applications *in vitro*, une évaluation de la stabilité colloïdale de celles-ci en milieu ionique comme le NaCl et le RPMI a été nécessaire.

#### d. Stabilité colloïdale des BM/diC16dT NPs dans le NaCl et le RPMI

L'étude de la stabilité colloïdale des BM/diC16dT NPs en milieu ionique a été réalisée dans le NaCl et le RPMI du fait de leur utilisation pour les tests *in vitro* (Bizmark and Ioannidis, 2015; Kumar, 2014; Tseng et al., 2015).

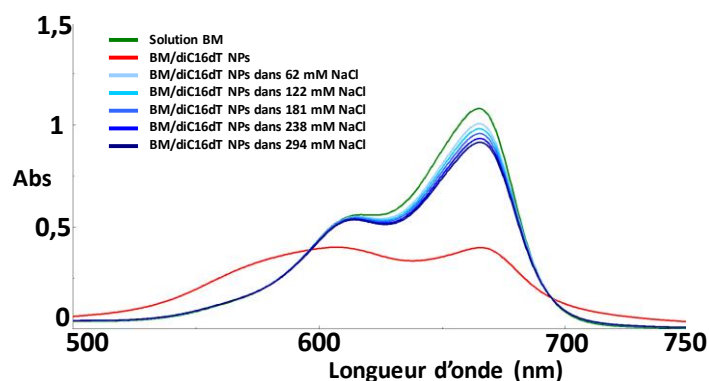
Des analyses DLS et spectrales dans l'UV-Visible ont été menées. Différentes concentrations de NaCl allant de 0 mM à 294 mM ont été utilisées, l'objectif étant d'encadrer la concentration isotonique, soit 154 mM (Tableau 25).

Tableau 13 : Analyses DLS des BM/diC16dT NPs à différentes concentrations de NaCl

Concentrations NaCl	Taille (nm)	PDI
0 mM	153,17 ± 9,03	0.097 ± 0.0065
62 mM	8,5 ± 0,25	0,423 ± 0,0045
122 mM	-	-
181 mM	-	-
238 mM	-	-
294 mM	-	-

À partir d'une concentration de 62 mM en NaCl, une désorganisation des NPs a été observée et à partir de 122 mM, aucun objet n'a pu être détecté en DLS. Le NaCl interagit potentiellement avec les BM/diC16dT NPs entraînant la destruction de ces dernières.

De manière similaire, l'analyse spectrale a montré que l'effet hypochrome et l'épaule observé avec les BM/diC16dT NPs seules, disparaissent dès la première concentration en NaCl (Figure 25), correspondant à la désorganisation observée dans le Tableau 13 aux mêmes concentrations. L'ajout de NaCl entraîne donc une modification de l'équilibre thermodynamique existant entre le BM et le diC16dT d'où une diminution progressive des liaisons ioniques et donc la destruction des NPs. Cela corrobore les précédents résultats obtenus en DLS et l'origine ionique des interactions à l'origine des NPs.



*Figure 25 : Analyse spectrale des BM/diC16dT NPs à différentes concentrations de NaCl*

Pour le RPMI une seule analyse a été réalisée avec la dilution des formulations au  $1/20^{\text{ème}}$ . L'analyse DLS donna des résultats avec un PDI à 1, preuve d'une distribution de taille très large (Malvern Instruments, 2011). Une analyse spectrale n'a pas été possible car les différents éléments composant le RPMI se superposent aux signaux du BM.

Les BM/diC16dT NPs n'étant pas stables en milieu ionique, un renforcement de la structure des NPs a été nécessaire.

### 3. Formulation des BM-NPs

La stratégie développée dans cette partie reposa sur l'addition d'un second NL (DOTAU) de charge opposée à celle du diC16dT pour renforcer la structure comme présenté par Khiati et al. et Oumzil et al. (Khiati et al., 2011; Oumzil et al., 2014). Le rationnel de cette approche, fut de tirer parti des interactions électrostatiques et base-base entre les NLs à la surface des NPs (Khiati et al., 2011).

La DOTAU a été rajoutée par l'intermédiaire d'un film lipidique (sous chapitre A.2.b) du fait de son caractère cationique pour obtenir de nouveaux objets : les BM-NPs (Khiati et al., 2011; Oumzil et al., 2014).

### a. Optimisation de la formulation des BM-NPs

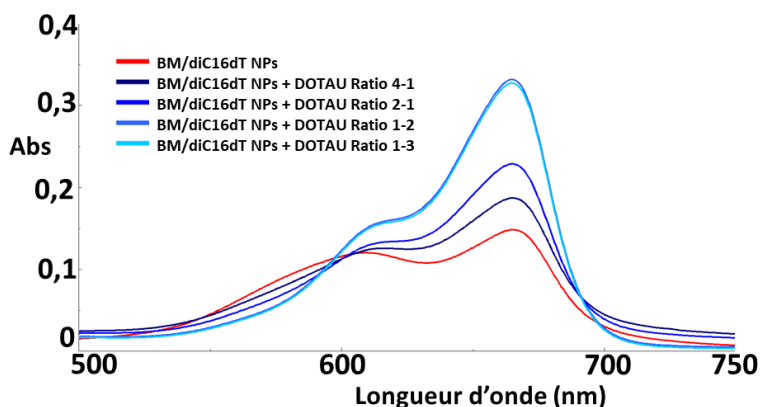
La formulation a fait l'objet d'optimisation avec l'utilisation de différents ratios entre le diC16dT et le DOTAU et les échantillons obtenus ont été caractérisés par DLS, potentiel Zêta (Tableau 14) et par spectroscopie UV-Visible (Figure 26).

*Tableau 14 : Analyse DLS et Zêta des formulations à différents ratios molaires diC16dT/DOTAU*

Ratio molaire diC16dT/DOTAU	Taille (nm)	PDI	Zêta (mV)
4/1	220,1	0,158	-35,5
2/1	452,3	0,289	-37,1
1/2	49,8	1	NA
1/3	176,8	0,775	NA

Le ratio (diC16dT/BM) 4/1 présente le PDI le plus bas (inférieur à 0,3) et une taille moyenne s'approchant des 200 nm fixés dans le cahier des charges.

D'un point de vue spectral (Figure 26), une augmentation de la concentration en DOTAU comparativement au diC16dT a entraîné une modification du spectre UV-Visible pour présenter une allure similaire à celle du BM seul. La DOTAU, du fait de sa charge positive, entre donc en compétition avec le BM pour l'établissement d'interactions avec le diC16dT.



*Figure 26 : Spectres des formulations à différents ratios molaires entre diC16dT et DOTAU*

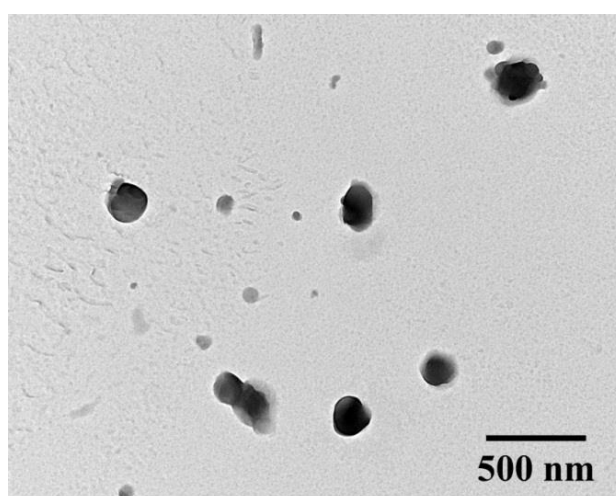
À la vue de l'analyse physico-chimique menée, le ratio (diC16dT/DOTAU) 4/1 correspondit au meilleur compromis pour ce projet permettant de poursuivre la caractérisation d'un point de vue granulométrique et microscopique.



### **b. Analyse granulométrique et microscopique des BM-NPs**

Les BM/diC16dT NPs (taille  $196,5 \pm 4,2$  nm, PDI  $0,078 \pm 0,0078$  et Zêta  $-39,2 \pm 2,7$  mV) formulées précédemment ont été utilisées pour formuler les BM-NPs. Ces dernières présentèrent une taille de  $169,9 \pm 6$  nm avec un PDI de  $0,08 \pm 0,0086$  et un potentiel Zêta de  $-34,87 \pm 1,38$  mV.

La MET sans agent de contraste a mis en évidence des nano-objets dont les tailles correspondirent aux résultats de DLS (Figure 27). Ces nano-objets présentèrent une forme moins sphérique et plus opaque que celle observée pour les BM/diC16dT NPs (Figure 21 (b)) mettant en évidence la réorganisation des NPs.



*Figure 27 : Image MET des BM-NPs sans agent de contraste (barre d'échelle 500 nm)*

L'impact de l'addition de la DOTAU fut étudié également du point de vue du rendement d'encapsulation du BM.

### **c. Rendement d'encapsulation du BM dans les BM-NPs**

Comme réalisée précédemment, une comparaison du spectre de BM-NPs à celui d'une solution de BM (aux mêmes concentrations) et des NLs employés dans la formulation a été effectuée (Figure 27).

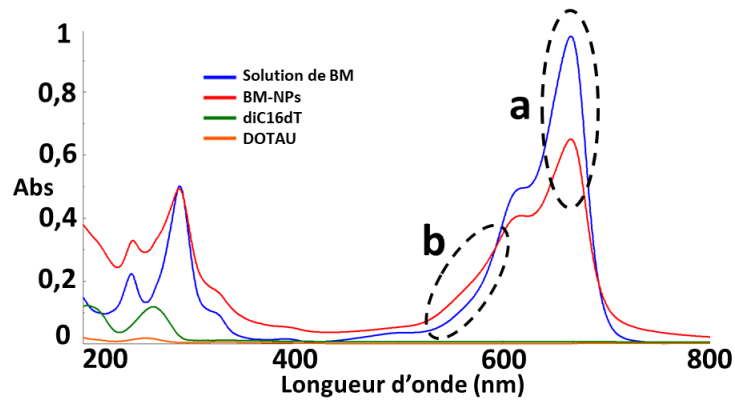


Figure 28 : Spectres de la diC16dT (vert), de la DOTAU (orange), d'une solution de BM (bleu) et de BM-NPs (rouge) dans l'eau distillée

La DOTAU n'absorbe que dans l'UV, ce qui permet un dosage plus facile du BM dans le domaine du visible. L'effet hypochrome (a) et l'épaulement (b) ont de manière similaire été observés confirmant la nécessité de préparer l'échantillon par dilution dans EtOH et passage au bain à ultrasons (Figure 29).

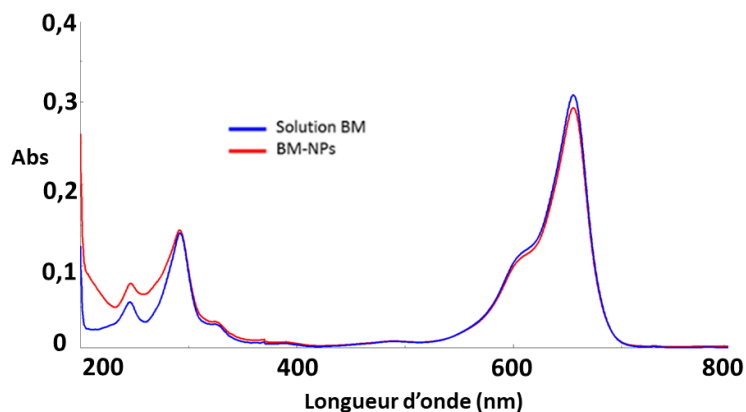


Figure 29 : Spectres des BM-NPs et d'une solution BM après préparation d'échantillon

Une superposition des spectres de la solution de BM et des BM-NPs après traitement à l'éthanol a été observée dans le visible confirmant la déstabilisation des liaisons entre le BM et les NLs à l'origine des NPs.

Le rendement d'encapsulation obtenu de  $79,3 \pm 0,97 \%$  fut du même ordre de grandeur que celui obtenu par Beniziri et al (Beniziri et al., 2018) mais inférieur à celui obtenu pour les BM/diC16dT NPs ( $86,7 \pm 1,33 \%$ ) du fait notamment de la phase d'addition de la DOTAU qui provoqua le relargage d'une partie du BM qui interagissait avec le diC16dT. Les spectres UV-Visible des différents ratios diC16dT/DOTAU ont montré ce

phénomène de relargage par la disparition progressive de la modification de spectre observée dans le cas des BM/diC16dT NPs (Figure 26).

#### d. Stabilité colloïdale des BM-NPs dans les milieux ioniques

De manière similaire à l'étude effectuée pour les BM/diC16dT NPs, l'impact du NaCl et du RPMI a été testé. Les BM-NPs ont conservé leur taille avec une augmentation du PDI mais qui reste inférieur à 0,3, lorsqu'elles ont été exposées à des concentrations croissantes en NaCl (Tableau 15).

Tableau 15 : Analyses DLS des BM-NPs à différentes concentrations de NaCl

Concentrations NaCl	Taille (nm)	PDI
0 mM	182,4 ± 6,7	0,121 ± 0,011
62 mM	159,2 ± 11,79	0,227 ± 0,037
122 mM	159,4 ± 12,46	0,221 ± 0,034
181 mM	161,3 ± 11,77	0,212 ± 0,039
238 mM	159,9 ± 11,22	0,238 ± 0,037
294 mM	160 ± 12,16	0,236 ± 0,049

L'analyse spectrale a quant à elle montré une conservation des interactions BM / NLs malgré l'augmentation progressive de la concentration en NaCl ce qui représente une amélioration comparativement aux BM/diC16dT NPs (Figure 30).

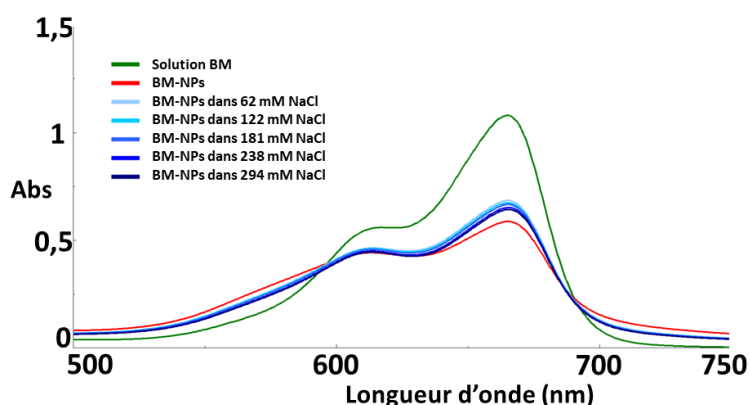


Figure 30 : Analyse spectrale des BM-NPs à différentes concentrations de NaCl

Dans le RPMI, une taille moyenne de  $164,3 \pm 6,42$  nm et un PDI de  $0,357 \pm 0,021$  ont été obtenus. La taille était proche de celle observée dans le NaCl ( $160 \pm 12,16$  nm) mais une augmentation du PDI fut observée ( $\text{PDI} > 0,3$ ).

L'ajout de la DOTAU a permis de renforcer la structure des NPs et ainsi d'améliorer leur stabilité dans les milieux ioniques (Khiati et al., 2011; Oumzil et al., 2014).

La bonne stabilité des BM-NPs dans les milieux ioniques étant vérifiée, l'étape suivante a été de caractériser les interactions moléculaires à l'origine de cette structuration en trois dimensions.

#### e. FT-IR spectroscopie

En spectroscopie IR, les bandes des groupements caractéristiques des matières premières ont été retrouvées sur le spectre des NPs confirmant la composition des nano-objets. De plus, les différences de nombres d'ondes de ces dernières entre les spectres des produits purs et celui des NPs, n'étant pas statistiquement significatives, la nature ionique des interactions entre le BM et les NLs a été confirmée (Tableau 16).

*Tableau 16 : Nombres d'onde des liaisons chimiques du BM, du diC16dT, de la DOTAU et des BM-NPs*

Liaison chimique (cm <sup>-1</sup> )	BM	diC16dT	DOTAU	BM-NPs
N-H	N/A	N/A	3380	3370
C-H	N/A	2916	2919	2920
		2850	2854	2850
C=O	N/A	1688	1692	1693
(aromatic) C=C	1593	N/A	N/A	1601
C=S	1337	N/A	N/A	1334
Phosphate group	N/A	1231	N/A	1246
C-N	N/A	N/A	1166	1175
C-O	N/A	1066	1111	1061

## B. Études de stabilité des BM-NPs

Des études de stabilité ont été réalisées sur les BM-NPs afin de connaître l'impact de la température sur leur conservation, et d'évaluer la capacité des NLs à protéger le BM contre la bio-réduction et la photo-dégradation.

### 1. Impact de la température sur la stabilité colloïdale des NPs

L'étude de l'impact de la température sur la stabilité des BM-NPs a été menée pour 2 conditions de conservation : température ambiante (24 ± 2°C) et 37°C.

Une augmentation significative de la taille des BM-NPs lorsqu'elles sont stockées à température ambiante (de 169,9 nm à 309,4 nm) a été observée dès le premier jour pouvant s'expliquer par une réorganisation des NPs liée à l'équilibre thermodynamique

de ce système. À l'inverse, la taille est restée stable et inférieure à 200 nm lors d'une conservation à 37°C (test student,  $p < 0,05$ ) (Figure 31). Aucune différence n'a été observée dans l'évolution du PDI (test student,  $p > 0,05$ ), avec des valeurs qui sont restées inférieures à 0,3.

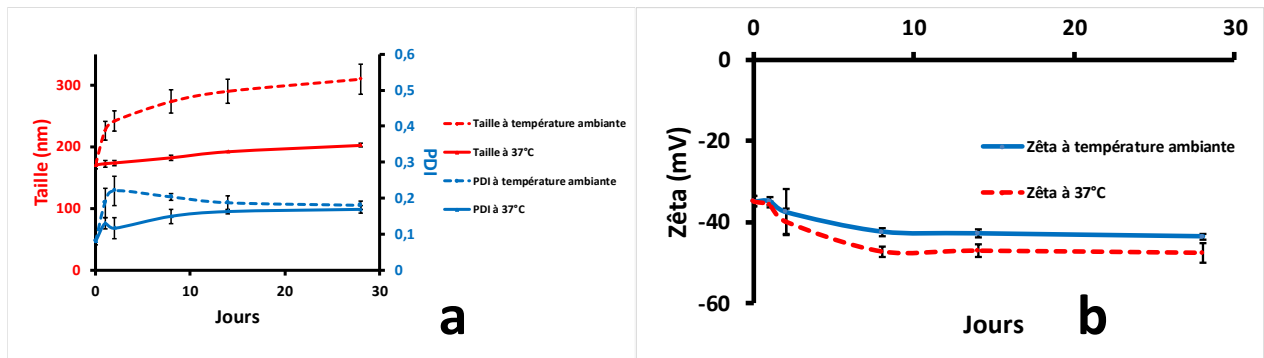


Figure 31 : Stabilité colloïdale taille et PDI (a), et Zêta (b) des BM-NPs en fonction de la température

Une diminution non significative (test student,  $p > 0,05$ ) du potentiel Zêta a été observée entre les deux conditions de conservation.

La stabilité colloïdale (taille et Zêta) des BM-NPs formulées permet d'envisager une application *in vitro* de celles-ci.

## 2. Evaluation de la bio-réduction

L'étude de la bio-réduction a été réalisée dans le but d'évaluer la capacité des NLs à protéger le BM jusqu'à son site d'action contre de potentiels réducteurs.

Les BM-NPs et une solution de BM ont été exposées à l'acide ascorbique qui joue le rôle de réducteur notamment en co-administration avec des antipaludiques (Ganiyu et al., 2012; Ioele et al., 2017; Marwaha, 2016). La solution de BM en présence d'acide ascorbique, perdit sa couleur bleue et présenta une faible couleur bleue résiduelle moins intense que dans le cas des BM-NPs (Figure 32). La cinétique de réduction de la solution de BM était 1,4 fois plus rapide que celle de BM-NPs. Un plateau de réduction a été observé à 12% pour la solution de BM et à 22% pour les BM-NPs.

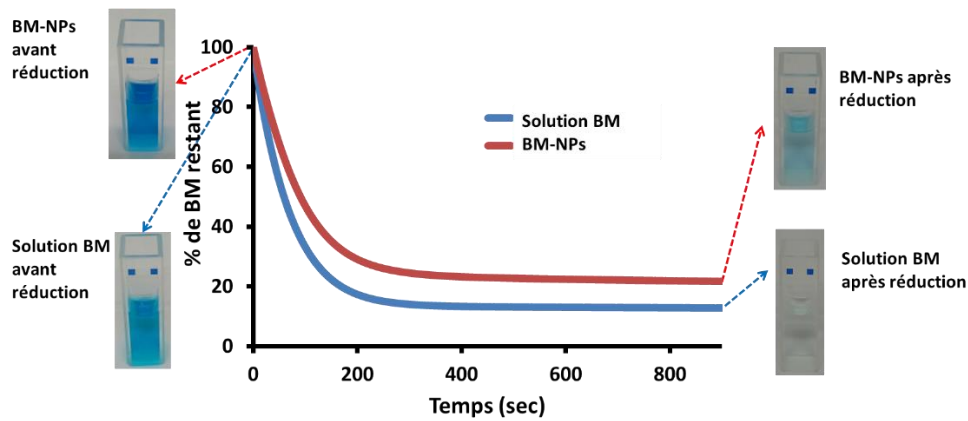


Figure 32 : Evaluation de la bio-réduction des solutions de BM-NPs et de BM

Comparativement à la solution de BM, les NPs ont présenté une cinétique de réduction plus lente et un plateau atteint pour des concentrations plus élevées en BM.

Les NLs ont donc permis de protéger une partie du BM contre l'effet réducteur de l'acide ascorbique en ralentissant sa réduction. Avec les BM-NPs, la pente observée correspondrait à la réduction du BM libre et la différence avec le plateau de la solution de BM représenterait le BM protégé par les NLs. Cette capacité de protection fut aussi directement observée en comparant la couleur plus intense de la suspension de BM-NPs par rapport à celle de la solution de BM en fin d'évaluation.

### 3. Évaluation de la photo-sensibilité

L'étude de la photosensibilité a été réalisée dans le but d'évaluer la capacité des NLs à protéger le BM contre la photo-dégradation lorsqu'il est exposé à une source lumineuse polychromatique (Figure 33).

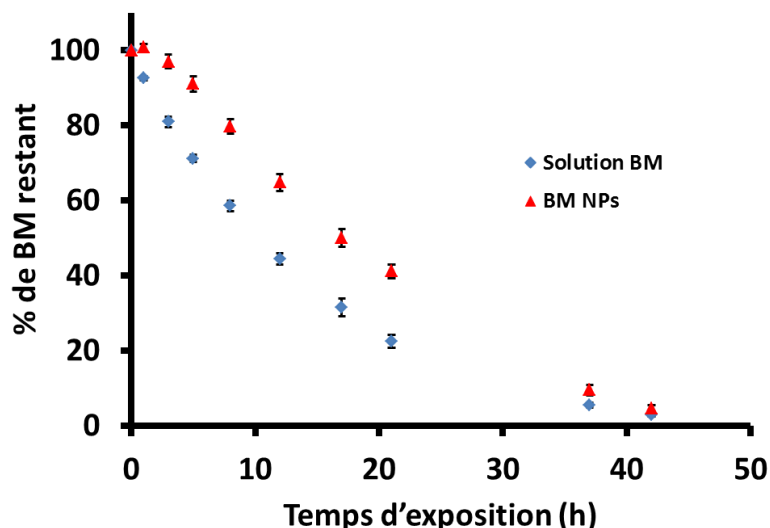


Figure 33 : Photosensibilité des solutions de BM-NPs et de BM

Les BM-NPs présentent une cinétique de dégradation 1,6 fois plus lente que celle de la solution de BM (test student,  $p < 0,05$ ). Le temps d'exposition nécessaire pour photo-dégrader la moitié de la quantité de BM dans la solution BM est 1,6 fois plus court comparativement au BM dans les BM-NPs (10,5h vs 16,6h respectivement).

La cinétique de dégradation des BM-NPs était plus lente que celles de la solution de BM, ce qui a montré que la formulation à base de NLs protège partiellement le BM contre la photo-dégradation. Cette capacité de photo-protection des substances actives à l'aide de structures auto-assemblées a été soulignée par loele et al (loele et al., 2017).

### C. Évaluation de l'activité antipaludique *in vitro* des BM-NPs

Le travail a consisté à évaluer le potentiel antipaludique *in vitro* des BM-NPs et à étudier son activité antipaludique sur deux souches de *P. falciparum* dont l'une est sensible et l'autre résistante à la chloroquine. L'évaluation a aussi été réalisée après exposition des formulations à la lumière ou à l'acide ascorbique (Tableau 17).

Tableau 17 : Résultats des tests *in vitro* des BM-NPs

		Substance BM (nM)						
		BM	BM-NPs	BM + lumière	BM-NPs + lumière	BM + Asc	BM-NP + Asc	
Souches	3D7 n=17	Moyenne CI <sub>50</sub>	5,23	3,67	15,9*	24,2*	5,12	7,93
		Écart type	2,18	1,93	9,16	5,43	3,19	1,87
		CI <sub>95</sub>	[4,09-6,38]	[2,69-4,65]	[11,09-20,69]	[21,33-27,02]	[3,55-6,7]	[6,82-9,04]
	W2 n=15	Moyenne CI <sub>50</sub>	12,56	9,38	26,50*	21,49*	6,61*	6,88*
		Écart type	2,39	5,11	9,13	6,3	1,38	1,8
		CI <sub>95</sub>	[11,38-13,73]	[6,87-11,89]	[22,02-31]	[18,40-24,58]	[5,93-7,29]	[5,86-7,90]

\* valeur de p < 0,0001 versus BM

Les résultats ne montrèrent pas de différence statistique entre l'activité de la solution de BM et des BM-NPs sur les souches 3D7 et W2. Les CI<sub>50</sub> sur la souche W2 étaient deux fois supérieures à celles obtenues sur la souche 3D7 et était plus faibles dans le cas des BM-NPs (p > 0,005). Cela démontra que la nano-encapsulation du BM à l'aide des NLs n'altère pas l'activité du BM, et cela suggéra également une potentielle amélioration de son efficacité.

L'évaluation de l'impact de la photo-dégradation du BM sur son activité antipaludique a démontré qu'il perdait en efficacité quel que soit la forme utilisée (solution BM ou BM-NPs) (p < 0,0001). D'où la nécessité de protéger le BM de l'effet de la lumière peu importe la forme développée afin de pouvoir garder son efficacité antipaludique.

Une concentration en acide ascorbique à 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> a été utilisée pour les tests afin d'éviter une trop forte présence de réducteur dans le milieu mais aussi pour ne pas trop influencer le pH du milieu de culture des globules rouges infectés. Utilisé à de faibles concentrations en association avec le BM, l'acide ascorbique n'a pas modifié l'activité antipaludique sur la souche 3D7 mais a amélioré l'activité sur la souche W2 (p < 0,0001) qui est la souche résistante à la chloroquine. Ces résultats suggèrent une amélioration de l'activité antipaludique du BM lorsqu'une faible quantité d'acide ascorbique lui est associée. Cette amélioration a été observée avec la solution de BM mais aussi avec les BM-NPs. Les NLs ne bloquent donc pas cette probable potentialisation. Lorsqu'il a été utilisé seul aux mêmes concentrations, l'acide ascorbique n'a montré aucun effet sur les parasites de *P. falciparum*, mais à des concentrations élevées (supérieures à 100 µM), celui-ci a amélioré la croissance *in*



*vitro* des parasites de *P. falciparum* et a eu un effet antagoniste sur l'activité de certains médicaments antipaludiques comme l'artésunate et la doxycycline, en raison de ses propriétés antioxydantes et capteur de radicaux libres (Pradines et al., 2002).

Du fait de la mauvaise stabilité des BM-NPs à température ambiante, des essais de lyophilisation ont été réalisés afin d'améliorer leur stabilité dans le temps.

#### **D. Lyophilisation des NPs**

La lyophilisation est une technique de dessiccation à basse température sous vide (pour les produits ne supportant pas des températures élevées), qui permet d'améliorer la stabilité à long terme des NPs (Abdelwahed et al., 2006). C'est dans cet objectif que des essais de lyophilisation ont été réalisés sur les BM-NPs.

Plusieurs cycles ont été testés (essais A, B et C) avec les BM-NPs en utilisant différentes conditions de préparation. Les essais réalisés sont considérés comme des étapes préliminaires à l'élaboration de formes pharmaceutiques lyophilisées pour une potentielle transposition *in vivo* puis dans un second temps chez l'homme par injection.

L'introduction de sondes de température à l'intérieur des préparations a permis de suivre leur évolution thermique tout au long du cycle de lyophilisation.

Toutes les formulations avant lyophilisation étaient limpides et ne présentaient pas de dépôts, signe d'une dissolution totale des différents excipients rajoutés aux BM-NPs.

##### **Essai A**

La formulation BM-NPs utilisée pour préparer les différentes conditions était caractérisée par une taille de 173 nm, un PDI de 0,121 et un potentiel Zêta de -38,5 mV. Les différentes conditions testées et le suivi du cycle sont présentés dans le Tableau 7 et la Figure 34 respectivement.

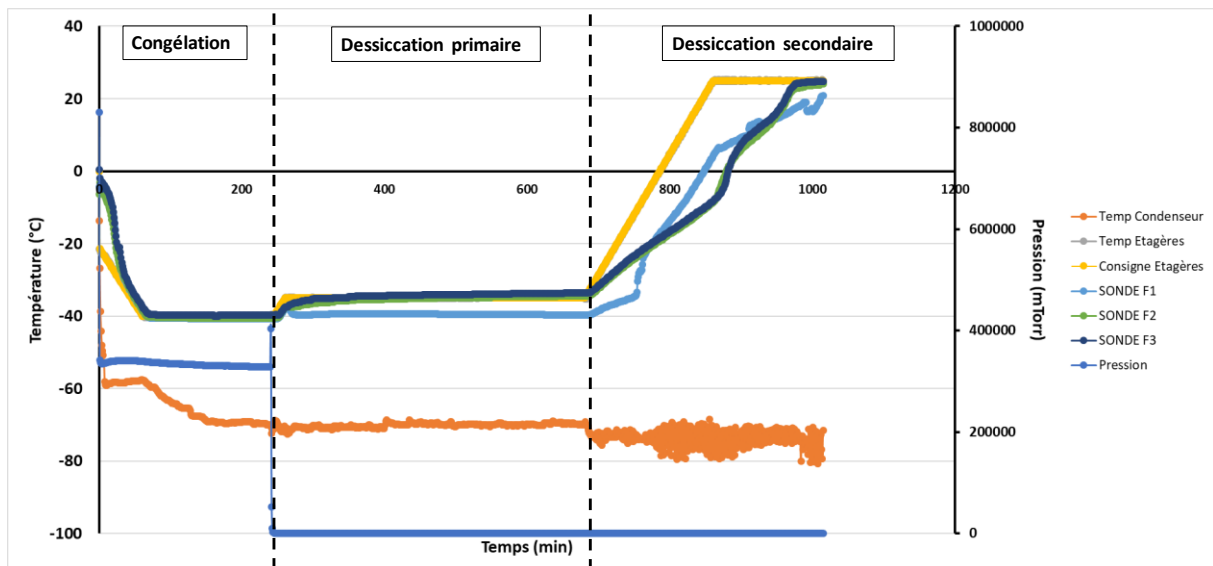


Figure 34 : Graphique du cycle de lyophilisation Essai A

Dans le graphique du cycle de lyophilisation de l'essai A, F1 se décrocha rapidement de la température des étagères car il y avait principalement que de la glace se lyophilisant rapidement. Dans l'étape de dessiccation secondaire, les températures des produits n'ont pas évolué de façon régulière et l'évolution de la température de F1 ne s'est pas superposée à la température étagère jusqu'à la fin du cycle.

Après lyophilisation, le contenu des flacons est représenté par des traces bleues dans F1 et des structures poreuses caractérisant la prise en « gâteau » du mannitol et du mélange mannitol/dextran dans F2 et F3 respectivement (Figure 35). Une différence de couleur fut notée entre la partie supérieure (bleutée) et la partie inférieure (blanche) de ces structures poreuses. Cette différence de couleur s'explique par le phénomène de concentration du soluté au moment de la congélation (Bogdani, 2011). La congélation ayant commencée par le fond des flacons, une grande partie du soluté a été repoussée vers la partie supérieure de la structure.

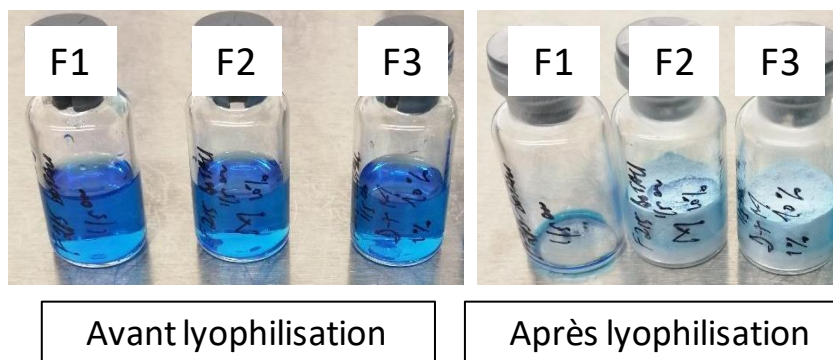


Figure 35 : Contenu des flacons avant et après lyophilisation Essai A

Un temps de reconstitution de 45 secondes par agitation manuelle a été nécessaire en amont des analyses granulométriques et de potentiel Zêta (Tableau 18) (Abdelwahed et al., 2006; Hedoux, 2013). Ces dernières n'ont pas été réalisées pour F1 du fait de problèmes lors de la reconstitution de l'échantillon (NPs fixées sur la paroi du flacon). F3 présenta un PDI de 0,983 signe d'une polydispersité élevée des NPs. Pour cette raison, le potentiel Zêta de F3 n'a pas été mesuré. F2 après lyophilisation a présenté une augmentation de la taille des NPs d'un facteur de 1,36 associée à une augmentation du PDI d'un facteur de 3,5. Cette augmentation du PDI de F2 montre une perte de la monodispersité de la formule de départ.

Tableau 18 : Résultats de la lyophilisation des BM-NPs essai A

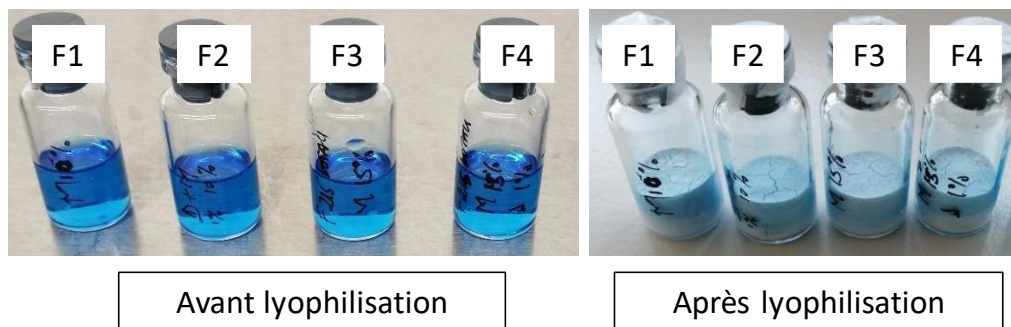
Avant lyophilisation					
Formulation	Taille (nm) ( $T_{av}$ )	Ratio taille ( $T_{av}/T_i$ )	$PDI_{av}$	Ratio PDI ( $PDI_{av}/PDI_i$ )	Potentiel Zêta (mV)
F1 (BM-NPs)	173	-	0,121	-	-38,5
F2 (10%M)	180,5	1,04	0,13	1,07	-47,4
F3 (10%M+1%D)	184	1,06	0,189	1,56	-41,4
Après lyophilisation					
Formulation	Taille (nm) ( $T_{ap}$ )	Ratio taille ( $T_{ap}/T_{av}$ )	$PDI_{ap}$	Ratio PDI ( $PDI_{ap}/PDI_{av}$ )	Potentiel Zêta (mV)
F1 (BM-NPs)	-	-	-	-	-
F2 (10%M)	245,7	1,36	0,457	3,51	-37
F3 (10%M+1%D)	162,6	-	0,983	5,20	-

## Essai B

Comparativement à l'essai A, la vitesse de congélation a été augmentée avec la charge des étagères du lyophilisateur et l'étape de congélation à une température de  $-50^{\circ}\text{C}$  (sans rampe d'évolution).

La formulation de BM-NPs utilisée pour préparer les différentes conditions (Tableau 7) avait pour caractéristiques : une taille de 190,6 nm, un PDI 0,131 et un potentiel Zêta de -40,9 mV.

Après lyophilisation, le contenu des flacons était représenté par des structures poreuses dans la totalité des flacons (Figure 36).



*Figure 36 : Contenu des flacons avant et après lyophilisation Essai B*

Avec une agitation manuelle, 45 sec ont été nécessaires pour la reconstitution des échantillons.

Avant la lyophilisation, une légère augmentation de la taille des NPs fut notée dans les différentes formulations (Tableau 19) ainsi qu'une augmentation de la polydispersité pour F2 et F4 uniquement. La présence de dextran dans le milieu pourrait être à l'origine de cette modification du PDI. Les potentiels Zêta présentèrent quant à eux des variations de  $\pm 5$  mV par rapport au potentiel Zêta de départ.

Tableau 19 : Résultats de la lyophilisation des BM-NPs essai B

Avant lyophilisation					
Formulation	Taille (nm) ( $T_{av}$ )	Ratio taille ( $T_{av}/T_i$ )	$PDI_{av}$	Ratio PDI ( $PDI_{av}/PDI_i$ )	Potentiel Zêta (mV)
F1 (10%M)	203,5	1,07	0,12	0,92	-45,8
F2 (10%M+1%D)	203,1	1,07	0,198	1,51	-36,6
F3 (15%M)	214	1,13	0,132	1,00	-43,4
F4 (15%M+1%D)	213	1,12	0,201	1,53	-38,2
Après lyophilisation					
Formulation	Taille (nm) ( $T_{ap}$ )	Ratio taille ( $T_{ap}/T_{av}$ )	$PDI_{ap}$	Ratio PDI ( $PDI_{ap}/PDI_{av}$ )	Potentiel Zêta (mV)
F1 (10%M)	350,8	1,72	0,412	3,43	NA
F2 (10%M+1%D)	228	1,12	0,504	2,54	NA
F3 (15%M)	299	1,40	0,292	2,21	-37,4
F4 (15%M+1%D)	235	1,1	0,348	1,73	-33,3

Après lyophilisation, toutes les formulations présentèrent une augmentation de la taille et du PDI des NPs. Plus particulièrement, F3 et F4 ont présenté une augmentation de la taille d'un facteur de 1,4 et 1,1 respectivement, associée à une augmentation du PDI d'un facteur de 2,21 et 1,73 respectivement. L'association M et D a permis de mieux conserver la taille et le PDI pendant le cycle de lyophilisation (F4). L'application d'une cinétique de congélation rapide (comparativement à l'essai A) a permis d'améliorer la stabilité du PDI en faisant baisser le facteur de 3,5 à 2,21 (F3) et 1,73 (F4).

Les potentiels Zêta pour F1 et F2 ne furent pas mesurés à cause de la forte augmentation de la taille (F1) et/ou de la polydispersité (F2). Ils présentèrent des variations de  $\pm 7$  mV par rapport au potentiel Zêta de départ, mais restèrent élevés ( $< -30$  et  $> +30$  mV). Pour cette raison, le potentiel Zêta n'a donc plus fait l'objet de suivi pour le reste de l'étude.

### **Essai C**

L'effet d'une congélation lente sur la lyophilisation des BM-NPs a été évalué dans l'essai C.

La solution de BM-NPs utilisée pour préparer les différentes conditions (Tableau 7) a eu pour caractéristiques une taille de 242,5 nm et un PDI de 0,257.

Une surfusion a été observée pour tous les échantillons entre -11 et -13°C pendant l'étape de congélation. Les températures des produits ont suivi la même évolution que celle des étagères, démontrant une absence de collapse ou d'effondrement (tous les échantillons sous forme de structures poreuses en fin de cycle). La dessiccation secondaire a été complète car les températures des échantillons se sont superposées à la température des étagères avant la fin du cycle (Figure 37).

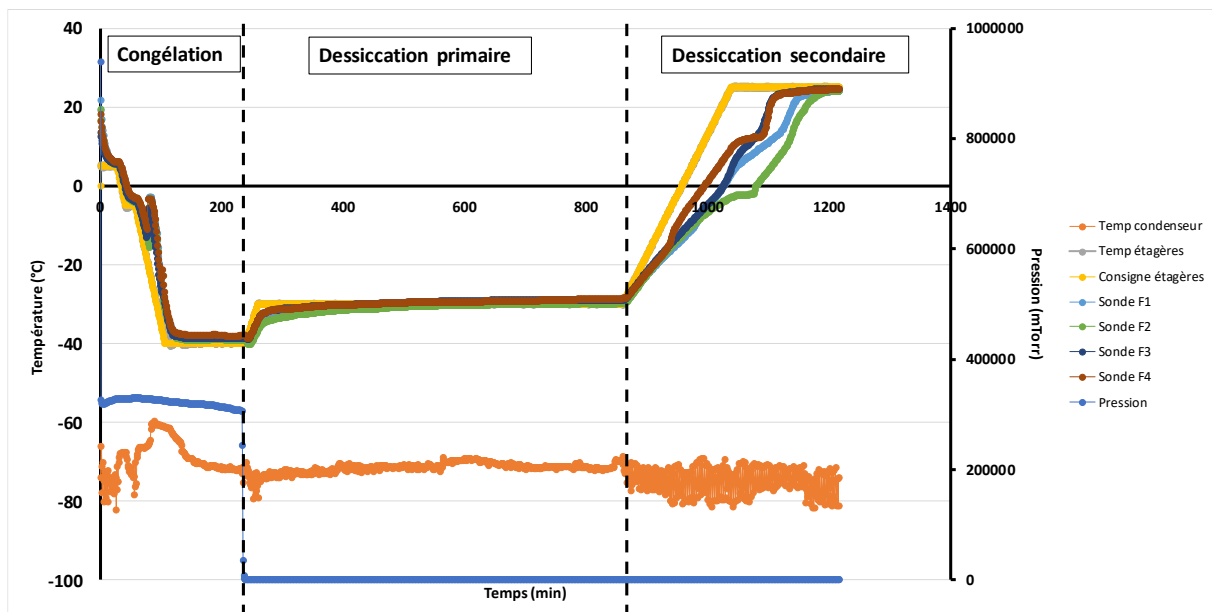


Figure 37 : Cycle de lyophilisation de l'essai C

La congélation lente des échantillons n'a pas permis de conserver les NPs car une polydispersité importante ( $PDI > 0,5$ ) a été obtenue pour tous les échantillons (Tableau 20). Pour ces raisons les calculs des ratios n'ont pas été réalisés après lyophilisation.

Tableau 20 : Résultats de la lyophilisation des BM-NPs essai C

Avant lyophilisation				
Formulation	Taille (nm) ( $T_{av}$ )	Ratio taille ( $T_{av}/T_i$ )	$PDI_{av}$	Ratio PDI ( $PDI_{av}/PDI_i$ )
F1 (10%M)	264,7	1,09	0,243	0,95
F2 (10%M+1%D)	242,6	1,00	0,433	1,68
F3 (15%M)	261,5	1,07	0,340	1,32
F4 (15%M+1%D)	245	1,01	0,464	1,80
Après lyophilisation				
Formulation	Taille (nm) ( $T_{ap}$ )	Ratio taille ( $T_{ap}/T_{av}$ )	$PDI_{ap}$	Ratio PDI ( $PDI_{ap}/PDI_{av}$ )
F1 (10%M)	263	-	0,697	-
F2 (10%M+1%D)	137	-	1	-
F3 (15%M)	29,3	-	0,848	-
F4 (15%M+1%D)	58,5	-	0,896	-

Les essais préliminaires de lyophilisation réalisés avec les BM-NPs ont consisté en une application de différents cycles de lyophilisation sur des mélanges BM-NPs et excipients. Le mélange BM-NPs, mannitol et dextran, associé à l'application d'une cinétique de congélation rapide ont permis d'obtenir des résultats prometteurs (ratio d'augmentation de taille 1,1). Des essais complémentaires mériteraient d'être réalisés afin d'optimiser le cycle de lyophilisation et de tester l'action d'autres agents stabilisants (glucose, saccharose, tréhalose ...).

### III. Conclusion

Dans une stratégie d'amélioration de l'activité de BM et de réduction des quantités administrées, une nano-formulation de BM a été envisagée. Cette nano-formulation peut présenter plusieurs avantages comme l'amélioration de la  $CI_{50}$  et de la stabilité, la protection de la substance active jusqu'au site d'action. La formulation des NPs de BM a été réalisée à l'aide de NLs. Ces NLs ont déjà démontré dans leur utilisation, une amélioration de l'activité des substances actives avec lesquelles ils ont été associés pour former des NPs (Benizri et al., 2018; Khiati et al., 2011; Oumzil et al., 2016, 2014). Deux NLs ont été utilisés, le diC16dT et la DOTAU. L'assemblage par interactions ioniques du BM et des NLs a permis d'obtenir des BM-NPs (Khiati et al., 2011). Ceux-ci sont stables dans le NaCl et le RPMI ce qui est prometteur pour des applications *in*

*vitro* et *in vivo*. Cette formulation à base de NLs permet de protéger partiellement le BM contre la réduction et la photo-dégradation sans altérer son activité antipaludique *in vitro*. Des études *in vivo* de l'activité des BM-NPs sont à envisager pour une évaluation en milieu physiologique de la protection, de la prolongation de la  $\frac{1}{2}$  vie plasmatique et de l'effet synergique potentiel des NLs par rapport à l'activité du BM. L'ajout d'une faible concentration d'acide ascorbique au BM et BM-NPs a permis de potentialiser leur activité antipaludique. Des études complémentaires de cette potentialisation d'activité avec l'acide ascorbique et d'autres types de réducteurs seraient nécessaires afin de mieux comprendre le mécanisme et les concentrations efficaces.

Compte tenu des avantages qu'elles offrent, les NPs à base de NLs doivent faire l'objet d'une lyophilisation optimisée afin d'améliorer leur conservation dans le temps et d'obtenir d'éventuelles formes pharmaceutiques administrables (pH, isotonicité ...). Les premiers résultats obtenus pour l'étude de lyophilisation des BM-NPs ont été prometteurs, mais des essais complémentaires seraient nécessaires pour l'optimisation.





# **Formulation des comprimés gastro- résistants de BM**



L'objectif général de ce travail a été de mettre au point de comprimés de BM à libération retardée. Cette forme orale est destinée à une utilisation pour le traitement du paludisme simple chez l'adulte ou pour réduire la transmission du paludisme.

La mise au point du comprimé de BM a été associée à plusieurs défis qui ont porté sur la manipulation du BM, les doses utilisées, et les effets indésirables liés à son utilisation pendant les essais cliniques.

Le BM est obtenu sous forme d'aiguilles cristallines. Cette forme spécifique ne facilite pas son écoulement. Sa finesse et le fait qu'il soit très électrostatique l'ont rendu extrêmement polluant pendant les manipulations.

Les doses indiquées pour le traitement du paludisme ont représenté un autre défi pour la formulation des comprimés. La posologie utilisée dans les dernières études avait été de  $15\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{jr}^{-1}$  (Coulibaly et al., 2015; Dicko et al., 2018; Mendes Jorge et al., 2019). Cette posologie a correspondu à une dose journalière de 900 mg pour un adulte de 60 kg (Walpole et al., 2012). Avec une fréquence de deux prises par jour, cela est revenu à des prises de 450 mg.

L'effet émétisant du BM a provoqué pendant certaines études cliniques des cas de vomissement (Meissner et al., 2005; Mendes Jorge et al., 2019; Zoungrana et al., 2008). Une coloration de la muqueuse buccale a été aussi associée à la prise du BM. Ces problèmes ont eu une influence négative sur l'observance du traitement par les patients.

Les matériaux et les différentes techniques de fabrication, utilisés pour les formulations des comprimés gastro-résistants de BM, ainsi que les contrôles réalisés pendant les différentes étapes de formulation seront présentés dans ce chapitre. Les formulations ont été développées de façon à répondre aux différents problèmes précités.

## I. Matériels et méthodes

### A. Matériels

#### 1. Les produits

Pour formuler les comprimés, le BM a été associé à des excipients. Les excipients ont été choisis pour leurs propriétés galéniques afin de faciliter la formulation et de conférer des propriétés aux comprimés obtenus. Des agents de pelliculage ont été utilisés pour pelliculer les comprimés nus obtenus.

##### a. La substance active

Le BM (*Provepharm Life Solutions*, Marseille, France) présente une monographie à la pharmacopée européenne. Les essais de caractérisation physico-chimique ont été réalisés par le fournisseur (Annexe 3).

##### b. Les diluants

La cellulose microcristalline est le diluant utilisé dans le cadre des formulations. Elle présente une monographie dans la pharmacopée européenne. Elle a été utilisée car permettant d'améliorer l'écoulement des mélanges (Levis and Deasy, 2001), de faciliter l'obtention des comprimés et d'améliorer le transport des liquides dans la matrice du comprimé, ce qui accélère la diffusion et l'action capillaire et facilite la désagrégation (Spence et al., 2005).

Elle est utilisée dans les process de compression directe et de granulation humide (Yassin et al., 2015). Comme diluant, elle est utilisée dans les proportions de 20 à 90 % (Sheskey et al., 2017).

Pour la réalisation des formulations, différentes granulométries de cellulose microcristalline ont été testées (Tableau 21).

*Tableau 21 : Comparaison physico-chimique des celluloses microcristallines testées*

Grades (fournisseur)	Taille nominale des particules ( $\mu\text{m}$ )	Humidité (%)	Densité vrac ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )
Avicel PH 200 (FMC)	180	2 à 5	0,29 – 0,36
Avicel PH 102 (FMC)	100	3 à 5	0,28 – 0,33
Avicel PH 301 (FMC)	50	3 à 5	0,34 – 0,45

### **c. Les liants**

La granulation du BM a été réalisée avec le polyvinylpyrrolidone (PVP) (KOLLIDON 30®, BASF) comme liant. Il a été utilisé pour la granulation du BM, car en granulation humide il donne généralement des grains durs et compacts avec de bonnes propriétés d'écoulement (Kasperek et al., 2016).

Comme liant, le PVP est utilisé dans les proportions de 0,5 à 5 % (Sheskey et al., 2017).

### **d. Les désintégrants**

La croscarmellose (JRS) et la crospovidone (Polyplasdone XL 10, AHSLAND/ISP) ont été les désintégrants utilisés.

Ces deux désintégrants ont été choisis car leurs mécanismes d'activité sont différents. La crospovidone présente une activité capillaire élevée et une capacité d'hydratation prononcée (Sheskey et al., 2017), alors que la croscarmellose gonfle rapidement dans l'eau jusqu'à augmenter de 4 à 8 fois son volume d'origine ce qui accélère la désagrégation des comprimés (Eyjolfsson, 2015).

Ils ont été utilisés à la fois dans les formules de compression directe et dans celles de granulation humide. Les proportions de crospovidone conseillées sont de 2 à 5 % et celles de croscarmellose sont de 0,5 à 5 % (Sheskey et al., 2017).

### **e. Les lubrifiants**

Les lubrifiants utilisés dans les différentes formulations sont :

- Le stéarate de magnésium (Greven Quimidis) comme agent anti-friction
- L'aérosil 200 (UNIVAR) comme agent d'écoulement.

Le stéarate de magnésium est l'agent antifricition le plus utilisé (Uzunović and Vranić, 2007). La finesse des particules et la grande surface spécifique de l'aérosil 200 lui ont conféré des propriétés d'amélioration d'écoulement des poudres sèches (York, 1975).

Ils sont utilisés à de faibles proportions, 0,5 à 5 % pour le stéarate de magnésium et 0,1 à 1 % pour l'aérosil (Sheskey et al., 2017).

#### f. PROSOLV® Easytab SP

Le PROSOLV® (JRS Pharma) est un produit de compression directe, préformulé, contenant de la cellulose microcristalline (diluant), silice colloïdale (agent d'écoulement), glycolate d'amidon sodique (superdésintégrant), sodium stéaryl fumarate (agent antifriction).

#### g. L'éosine

C'est un antiseptique/colorant qui a été utilisé pour « mimer » l'action colorante du BM dans la formulation des comprimés placébos et pour vérifier l'intégrité des films de pelliculage testés.

#### h. Les produits de pelliculage

Les produits de pelliculage utilisés sont classés en plusieurs groupes (Tableau 22). Chaque produit de pelliculage a une procédure de préparation définie par le fabricant.

*Tableau 22 : Les produits de pelliculage*

Produit de pelliculage	Polymères	Fabricant	pH de dissolution
<b>Gastro-résistant acrylique</b>			
Vivacoat® Protect E	Copolymère d'acide méthacrylique et d'acrylate d'éthyle	JRS Pharma	5,5
Eudragit® S100	Copolymère d'acide méthacrylique et de méthacrylate de méthyle	Evonik	7
Kollicoat® MAE 100P	Copolymère d'acide méthacrylique et d'acrylate d'éthyle	BASF	5,5
<b>Gastro-résistant vinylique</b>			
SURETERIC®	Phtalate d'acétate de polyvinyle	Colorcon	5
<b>Gastro-soluble</b>			
OPADRY® II	Alcool polyvinylique	Colorcon	-

## **2. Les appareillages**

Différents matériels ont été utilisés dans le cadre de la fabrication et des contrôles (Annexe 4).

## **B. Méthodes**

Dans cette partie sont présentés les conditions de manipulation du BM, son prétraitement avant introduction dans les mélanges, les différents process utilisés pour la fabrication et les contrôles des comprimés nus, les process de pelliculage testés et les différents contrôles réalisés sur les comprimés pelliculés.

### **1. La préparation de l'environnement de travail**

Compte tenu des problèmes de dissémination des fines particules de BM, les appareils et les différentes surfaces ont été recouverts par un film plastique. Le manipulateur a porté pendant les différentes manipulations des équipements de protection individuelle : blouse, gants, masque, lunettes, charlotte, une combinaison jetable avec capuche (pour les opérations de tamisage des grands volumes de BM). Le tamisage a été réalisé sous hotte afin d'éviter toute dissémination de particules.

### **2. La préparation du BM**

Le BM se présente à la réception sous forme de poudre avec un grand nombre d'amas, ce qui n'a pas facilité sa manipulation. Afin de casser ces amas et obtenir une poudre plus facilement manipulable, il a fallu réaliser un prétraitement du BM. Deux essais de prétraitement ont été testés : un broyage et un tamisage forcé.

Le broyage a été réalisé à l'aide d'un broyeur à billes (Retsch® PM100, Allemagne). Un bol de broyage de 45 mL et 180 billes inox de 5 mm de diamètre ont été utilisés. La masse d'échantillon broyé a été de 5 g, avec un paramétrage de 3 cycles de 40 sec à une vitesse de rotation de 400 rpm. La micronisation de la matière s'est basée sur son écrasement entre les billes, mais aussi entre les billes et la paroi du bol.

Le tamisage a consisté en un passage forcé du produit de départ à travers un tamis de 400 µm dans le procédé de compression directe et un tamis de 800 µm dans le procédé de granulation humide. Cette opération a été réalisée sous une hotte avec un filtre à particules afin de d'éviter toute dissémination des particules fines issues de la division des amas BM.



Les excipients ont été ajoutés à la poudre obtenue après prétraitement du BM, afin de passer à l'étape suivante qui a été celle de la fabrication des comprimés nus.

### 3. Fabrication des comprimés nus de BM

Différents mélanges ont été réalisés avec la poudre de BM obtenue après l'étape de prétraitement. Les propriétés galéniques des excipients ont orienté leur choix et leur intégration dans les différents mélanges. Ces mélanges sont utilisés pour la fabrication des comprimés nus soit par la voie de la compression directe, soit par la voie de la granulation humide suivie d'une compression. Des poinçons ronds avec des rayons de courbures ont été utilisés pour la compression, afin d'obtenir des comprimés ronds bombés, plus facilement pelliculables que les comprimés plats (Levina and C.R, 2005).

#### a. Compression directe des mélanges de BM

La compression directe a consisté en un mélange du BM et des excipients, suivi de la compression du mélange obtenu.

Différents grades de diluants ont été testés afin d'étudier l'impact de la granulométrie du diluant sur le comportement du mélange et sur le produit final (Tableau 23). La proportion maximale de BM a été de 60 %.

*Tableau 23 : Les formulations réalisées en compression directe*

		F1	F2	F3	F4
Rôle	Produit	%	%	%	%
<b>Substance active</b>	BM	50	50	50	60
<b>Agent d'écoulement</b>	Aérosil® 200	1,5	1,5	1,5	2
<b>Diluant</b>	Avicel® PH 301	43			
<b>(Proportions entre diluants)</b>	Avicel® PH 200		43	11 (1/4)	8,9 (1/4)
	Avicel® PH 102			33 (3/4)	26,6 (3/4)
<b>Lubrifiant</b>	Stéarate de magnésium	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Désintégrant</b>	Polyplasdone XL10	5	5		
	Croscarmellose			4	2
<b>Total</b>		100	100	100	100

Le process de fabrication utilisé pour toutes les formulations en compression directe est présenté dans la Figure 38.

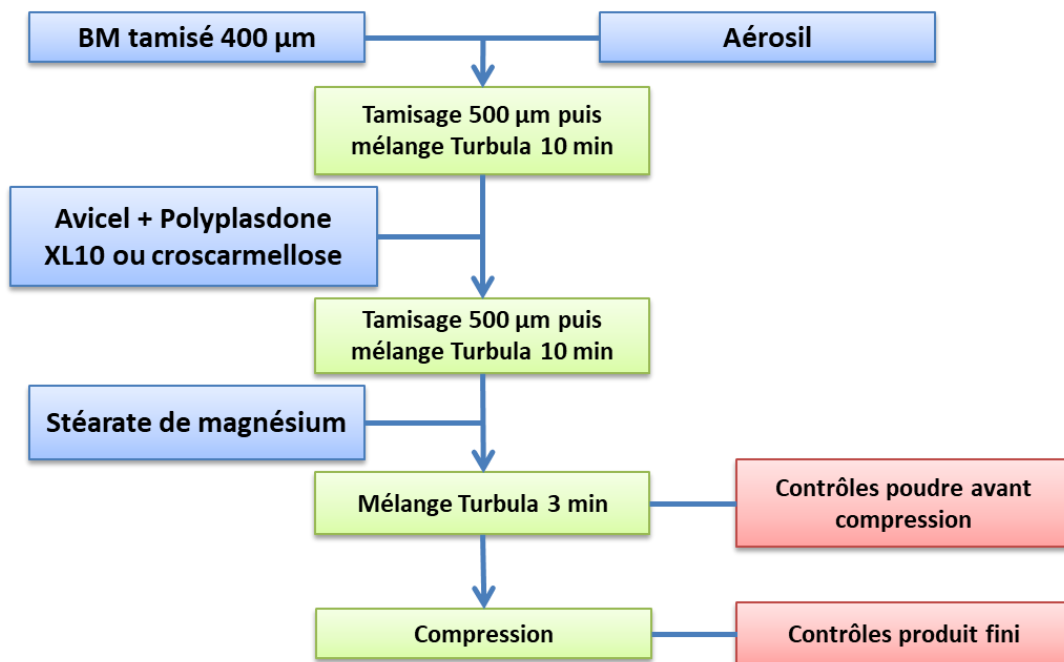


Figure 38 : Process de fabrication par compression directe du BM

Les mélanges F3 et F4 ont été séchés à l'étuve (Binder ED400, Allemagne) à 40°C pendant 24h avant d'être utilisés en compression, afin d'apprécier l'impact du séchage sur l'écoulement des mélanges. Le contrôle de l'écoulement des mélanges a été réalisé avant l'étape de compression.

La compression a été réalisée à l'aide d'une presse rotative (Dott Bonapace CPR-18/D-8, Italie) équipée de 04 poinçons de taille D10 R12 (diamètre 10 mm et rayon de courbure 12 mm). Aucune masse cible n'a été définie pour les essais en compression directe, mais une résistance à la rupture entre 50 et 100 N(Newton) était visée afin d'obtenir des comprimés adaptés à l'étape de pelliculage.

Une fois les comprimés nus fabriqués, différents contrôles (masse moyenne, résistance à la rupture, friabilité et désagrégation) ont été réalisés sur ces derniers.

### b. Granulation humide suivie d'une compression

La seconde voie de fabrication testée a été celle de la granulation humide. Dans ce process, des grains de BM (phase interne) ont été fabriqués par granulation humide dans un premier temps avec les mélanges de BM et d'excipients (Tableau 24), puis dans un second temps, ces grains ont été mélangés à de nouveaux excipients (phase externe). Ce mélange a été ensuite aggloméré par compression pour obtenir des comprimés nus de BM.

Tableau 24 : Les formules des grains F5, F6, F7 et F9

		Grain F5	Grain F6	Grain F7	Grain F9
Rôle	Produit	%	%	%	%
Substance active	BM	65	79,59	79,59	82,3
Diluant	Avicel pH 301	24	12,47	12,47	12,7
Liant	Kollidon 30	8	5,66	5,66	2,5
Désintégrant	Croscarmellose	2	2,28	-	-
	Polyplasdone	-	-	2,28	2,5
Agent d'écoulement	Aerosil 200	1	-	-	-
<b>Total</b>		<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Le process de fabrication (granulation humide et compression) des comprimés est présenté dans la Figure 39.

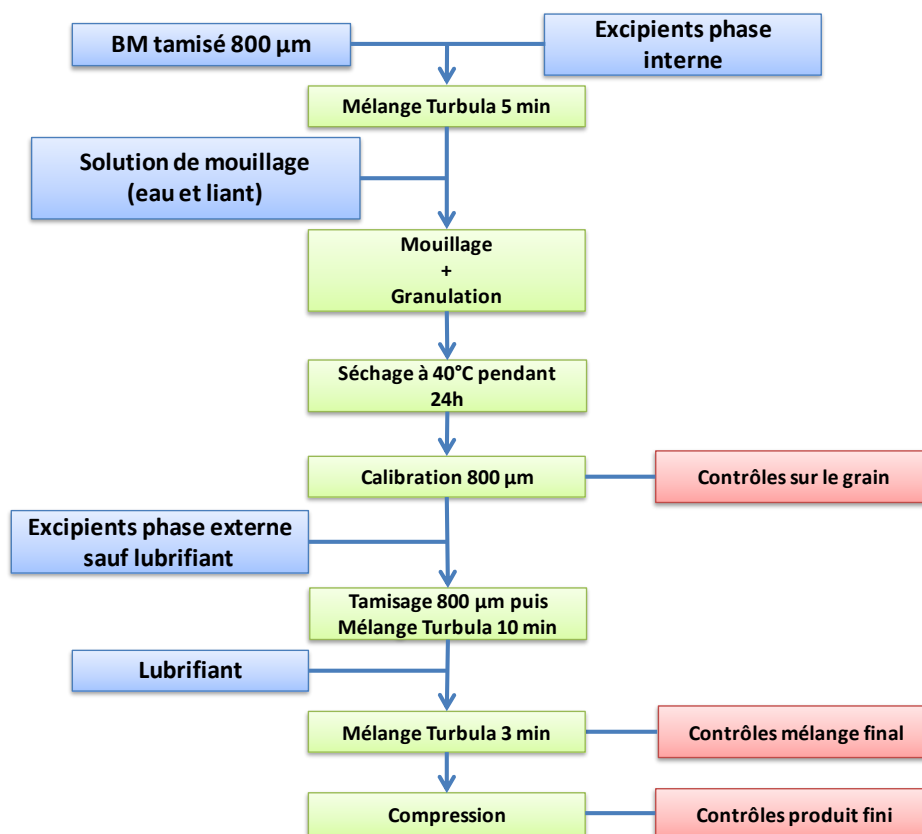


Figure 39 : Process de granulation humide et de compression du BM

La granulation humide a été réalisée dans la cuve de 4L du granulateur (GLATT TMG1/6, Allemagne) avec les paramétrages présentés dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Paramétrage du granulateur et les conditions de granulation

	Grains F5	Grains F6	Grains F7	Grains F9
<b>Taille lot (g)</b>	150	100	628	486
<b>Temps de mélange (min)</b>	5	5	5	5
<b>Vitesse organes de mélange (rpm)(agitateur/émoteur)</b>	200/300	200/300	200/350	250/300
<b>Temps de granulation (min)</b>	5	14	8	5
<b>Vitesse organes de mélange (rpm)(agitateur/émoteur)</b>	350/350	300/350	200/650	350/350
<b>Taux de mouillage (%)</b>	33	30	22,8	21,6
<b>Calibration humide</b>	2 mm	800 µm	2 mm	-
<b>Calibration grains</b>	800 µm	800 µm	800 µm	800 µm

L'analyse granulométrique, l'évaluation de l'écoulement et de la densité sont réalisées sur tous les grains avant l'ajout de la phase externe.

La calibration humide des grains F5, F6 et F7 a été réalisée dans le granulateur oscillant (Erweka AR400, Allemagne) avec différentes grilles (800 µm ou 2 mm). Le séchage de tous les grains a été réalisé dans l'étuve (Binder ED400, Allemagne) à 40°C pendant 24 h. Les grains séchés ont été calibrés à l'aide d'un tamisage (800 µm).

Les excipients de la phase externe ont été tamisés (800 µm) avec les grains de BM, puis l'ensemble a été mélangé (Tableau 26). Le grain F7 a été utilisé pour la réalisation des comprimés F7 et F8. La presse alternative (Frogerais Type OA, France) a été utilisée pour réaliser les comprimés avec l'utilisation de différents types de poinçons :

- F5 et F6 : poinçons D12 R12, masse cible de substance active de 300 mg par unité et une dureté non définie
- F7 et F8 : poinçons D13R10, masse cible de substance active de 450 mg par unité et une dureté non définie
- F9 : poinçons D12 R16 R2,5 (double rayon de courbure) masse cible de substance active de 300 mg par unité et une dureté non définie (F9a), et poinçons D13 R10, masse cible de substance active de 450 mg par unité et une dureté non définie (F9b).

Tableau 26 : Les mélanges de grains de BM et d'excipients (phase externe) avant compression

		F5	F6	F7	F8	F9
Rôle	Produit	%	%	%	%	%
<b>Phase interne</b>		88,76	87,66	87,66	87,66	79
<b>Substance active</b>	BM	57,69	69,77	69,77	69,77	65
<b>Liant</b>	Kollidon 30	7	4,96	4,96	4,96	2
<b>Diluant</b>	Avicel PH 301	21,4	10,93	10,93	10,93	10
<b>Agent d'écoulement</b>	Aérosil 200	0,89	-	-	-	-
<b>Désintégrant</b>	Croscarmellose	1,78	2	-	-	-
	Polyplasdone	-	-	2	2	2
<b>Phase externe</b>		11,24	12,34	12,34	12,34	21
<b>Diluant</b>	Avicel PH 200	8,98	8,84	8,84	6,84	16,5
<b>Agent d'écoulement</b>	Aérosil	-	1	1	1	1
<b>Lubrifiant</b>	Stéarate de Mg	0,48	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Désintégrant</b>	Croscarmellose	1,78	2	-	-	-
	Polyplasdone	-	-	2	4	3
<b>Total</b>		100	100	100	100	100

Différents contrôles (masse moyenne, résistance à la rupture, friabilité et désagrégation) sont réalisés sur les comprimés nus obtenus.

### c. La formulation des comprimés placebos

Pour évaluer les différents produits de pelliculage et éviter de consommer trop de BM, une formule placebo a été utilisée pour les premiers essais de pelliculage. Elle a contenu de l'éosine afin de pouvoir « mimer » les capacités de coloration du BM mais aussi de pouvoir apprécier l'étanchéité du film déposé. Ces comprimés ont été fabriqués à partir d'un mélange binaire, un colorant (éosine) et un diluant de compression directe prêt à l'emploi (PROSOLV® Easytab SP) (Tableau 27).

Tableau 27 : Formule des comprimés placébos

Rôle	Produit	Proportion %
<b>Produit de compression</b>	PROSOLV® Easytab SP	99,5
<b>Colorant</b>	Eosine	0,5
<b>Total</b>	-	100

Les comprimés placebos ont été réalisés par compression directe (mélangeur conique Erweka, Allemagne, presse alternative Frogerais ) avec des poinçons de taille D12 R8 (Figure 40).

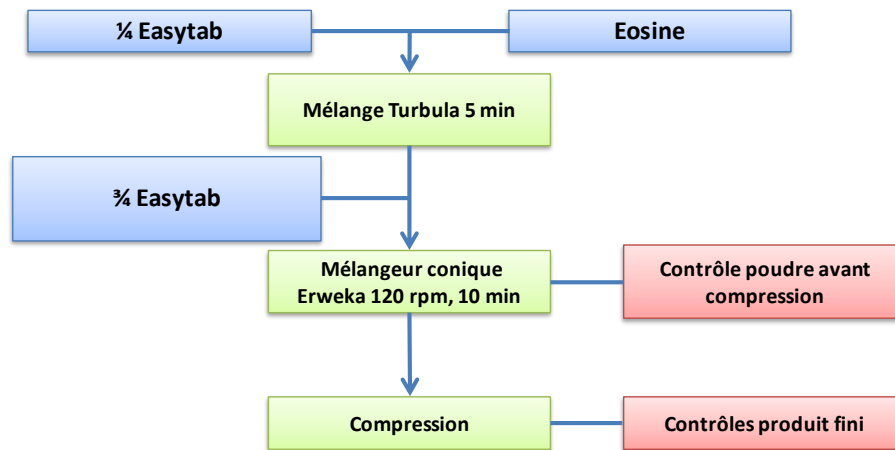


Figure 40 : Process de compression directe des comprimés placébos

#### 4. Le pelliculage des comprimés

Le pelliculage a consisté en un dépôt de film fin à la surface des comprimés. Différents produits de pelliculage sont commercialisés avec des mélanges de polymères et en fonction des propriétés que l'on veut conférer au film déposé. Avant utilisation, ces produits de pelliculage ont été préparés de différentes manières en fonction du fabricant. Les différents process de pelliculage ont fait l'objet de paramétrages. Les techniques de préparation des suspensions filmogènes et les paramétrages des process de pelliculage sont présentés dans cette partie du sujet.

##### a. Préparation des suspensions filmogènes

Plusieurs suspensions de pelliculage ont été testées. Ces suspensions n'ont pas les mêmes techniques de préparation.

#### **Eudragit® S100**

La formule et la technique de préparation sont présentées dans le Tableau 28 et la Figure 41 respectivement.

Tableau 28 : Formule pour la préparation d'Eudragit® S100

Rôle	Produit	Proportion %
Polymère	Eudragit® S100	10
Plastifiant	Triéthylcitrate	5
Stabilisant	KOH 1N	7
Antiagglomérant	Talc	5
Solvant	Eau distillée	73
<b>Total</b>	-	<b>100</b>

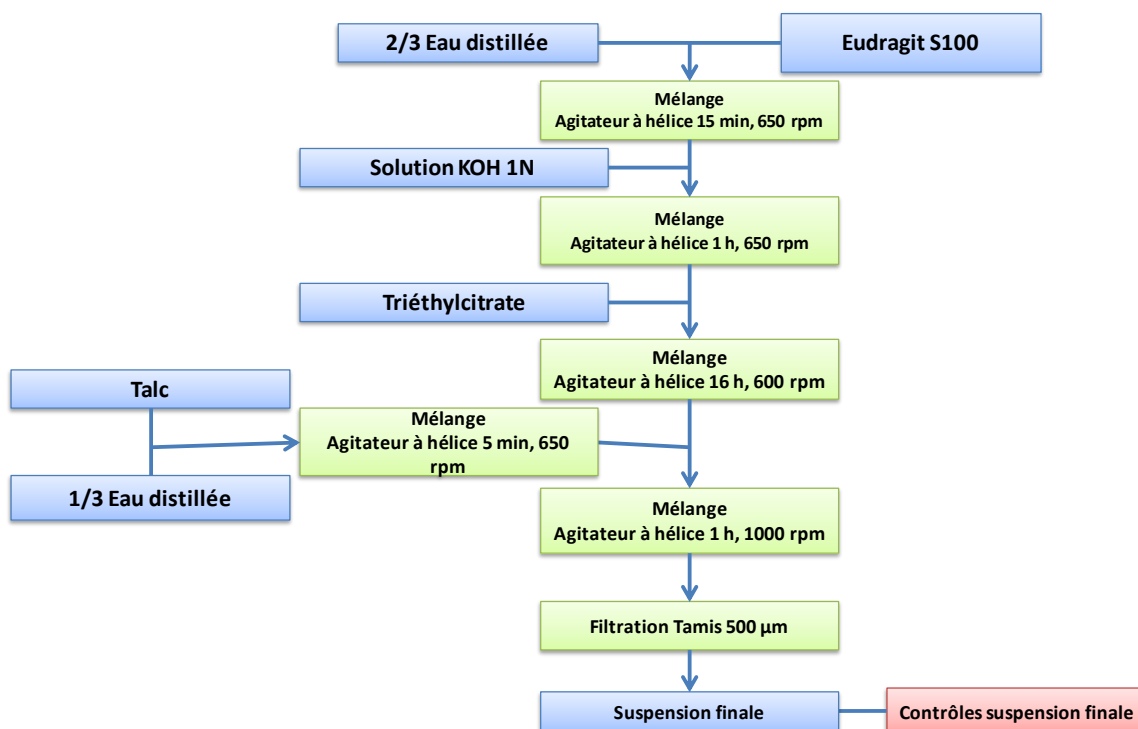


Figure 41 : Préparation de la suspension d'Eudragit® S100

Le talc (lubrifiant) a été introduit dans la préparation de la suspension de pelliculage afin d'éviter les problèmes de collage des comprimés pendant le processus de pelliculage. Son introduction a été recommandée par le fabricant.

### **Vivacoat® Protect E**

Sa préparation a consisté en un ajout d'eau distillée (tableau M).

Tableau 29 : Formule pour la préparation de Vivacoat® Protect E

Rôle	Produit	Proportion %
<b>Polymère et agents de pelliculage</b>	Vivacoat® Protect E	20
<b>Solvant</b>	Eau distillée	80
<b>Total</b>	-	100

La préparation de la suspension a été effectuée à l'aide d'un agitateur à hélice (IKA T18, Allemagne). Le mélange a été réalisé avec une vitesse d'agitation de 560 rpm, pendant 45 min.

### Kollicoat® MAE 100P

La formule et la technique de préparation du Kollicoat® MAE 100P sont présentées dans le Tableau 30 et la Figure 42 respectivement.

Tableau 30 : Formule pour la préparation du Kollicoat® MAE 100P

Rôle	Produit	Proportion %
<b>Agent de pelliculage</b>	Kollicoat®	25
<b>Plastifiant</b>	Propylène glycol	4
<b>Solvant</b>	Eau distillée	71
<b>Total</b>	-	100

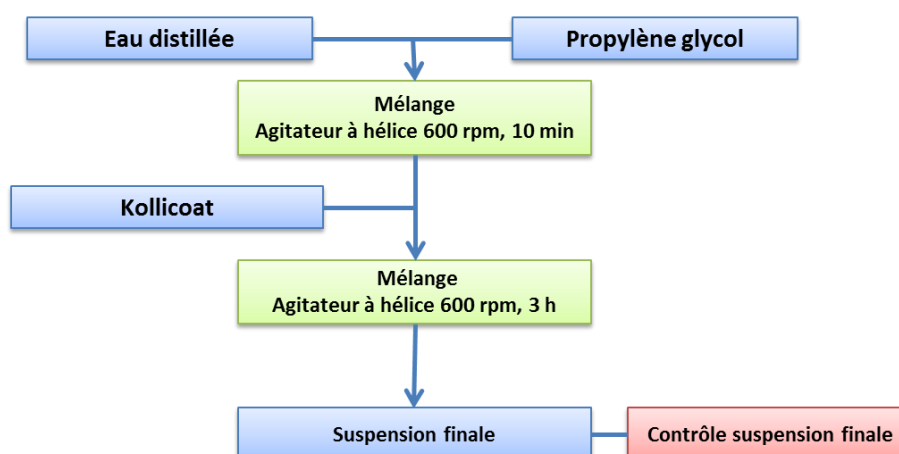


Figure 42 : Préparation de la suspension de Kollicoat® MAE 100P

### Opadry® II

Sa préparation a consisté en un ajout d'eau distillée (Tableau 31, Figure 43).



Tableau 31 : Formule pour la préparation d'Opadry® II

Rôle	Produit	Proportion %
Agent de pelliculage	Opadry®II	15
Solvant	Eau distillée	85
<b>Total</b>	-	<b>100</b>

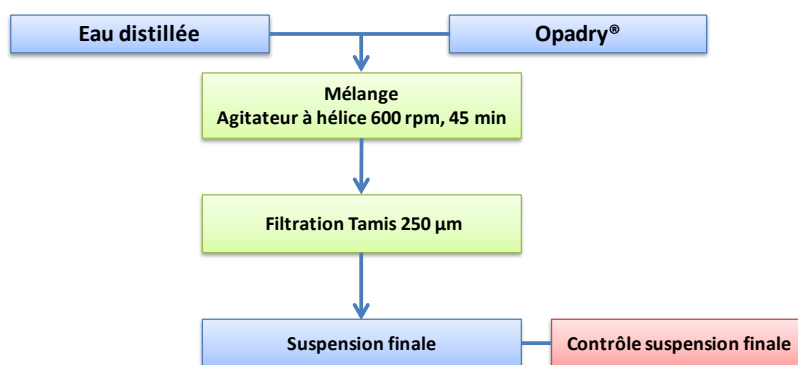


Figure 43 : Préparation de la suspension d'Opadry® II

### Sureteric®

La formule et la technique de préparation sont présentées dans le Tableau 32 et la Figure 44 respectivement.

Tableau 32 : Formule pour la préparation de Sureteric®

Rôle	Produit	Proportion %
Agent de pelliculage	Sureteric®	15
Anti-mousse	Silfan 184®	0,1
Solvant	Eau distillée	84,9
<b>Total</b>	-	<b>100</b>

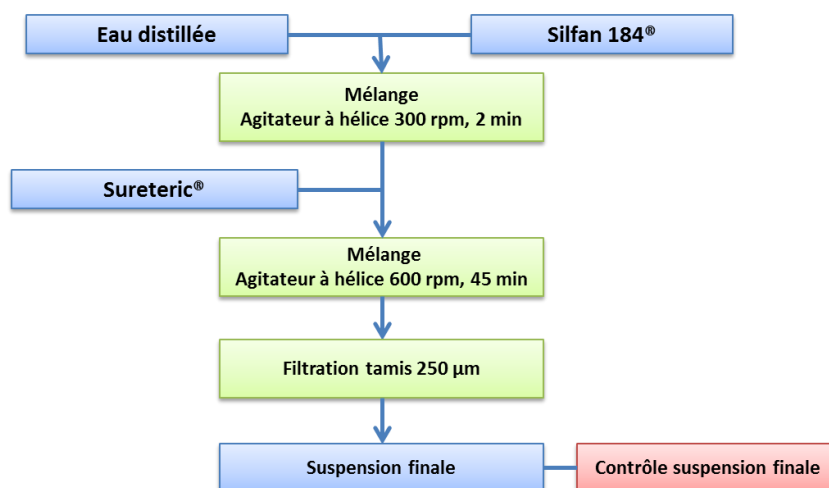


Figure 44 : Préparation de la suspension de Sureteric®

### b. Le process de pelliculage

Le pelliculage a été réalisé à l'aide d'une pelliculeuse (Procept 4m8 Trix, Belgique), avec une turbine perforée de 2 L. Les paramètres de pelliculage utilisés sont présentés dans les Tableaux 33 et 34.

Tableau 33 : Les paramètres de pelliculage des comprimés placébos et des comprimés F6

Paramètres	Eudragit® S100 (Placébo)	Kollicoat®MAE 100P (Placébo)	Vivacoat® (Placébo et F6)
<b>Préchauffage</b>			
Vitesse tambour (rpm)	5	5	5
Débit d'air (m <sup>3</sup> .min <sup>-1</sup> )	0,5	0,5	0,5
Température air d'entrée (°C)	50	60	50
<b>Pelliculage</b>			
Vitesse tambour (rpm)	20	20	25
Débit d'air (m <sup>3</sup> .min <sup>-1</sup> )	0,55	0,55	0,55
Température air d'entrée (°C)	55	60	55
Pompe de pulvérisation (rpm)	120	110	70
Débit air de pulvérisation (L.min <sup>-1</sup> )	23	22	29
<b>Séchage</b>			
Vitesse tambour (rpm)	20	-	25
Débit d'air (m <sup>3</sup> .min <sup>-1</sup> )	0,55	-	0,55
Température air d'entrée (°C)	60	-	50

Pour le pelliculage des comprimés F9a et F9b, une sous couche non fonctionnelle a été déposée en premier, puis une couche gastro-résistante a été déposée par-dessus.

Tableau 34 : Les paramètres de pelliculage des comprimés F9a et F9b

Paramètres	Opadry®II (Sous couche)	Sureteric® (Couche gastro-résistante)
<b>Préchauffage (5 min)</b>		
Vitesse tambour (rpm)	5	5
Débit d'air (m <sup>3</sup> .min <sup>-1</sup> )	0,3	0,3
Température air (°C)	60	60
<b>Pelliculage (40 min sous couche - 70 min gastro-résistante)</b>		
Vitesse tambour (rpm)	24	25
Débit d'air (m <sup>3</sup> .min <sup>-1</sup> )	0,3	0,26
Température air (°C)	60	65
Pompe de pulvérisation (rpm)	105	125
Débit air de pulvérisation (L.min <sup>-1</sup> )	30	31
<b>Séchage (5 min)</b>		
Vitesse tambour (rpm)	5	5
Débit d'air (m <sup>3</sup> .min <sup>-1</sup> )	0,3	0,3
Température air (°C)	24	24

La température des comprimés a été maintenue entre 35°C et 45°C pendant tous les essais de pelliculage.

## 5. Les contrôles pharmacotechniques

Différents contrôles ont été réalisés sur les mélanges de poudre en compression directe, les grains après la granulation, les comprimés nus obtenus après compression des grains et les comprimés pelliculés. La pharmacopée européenne a été la référence utilisée.

### a. Les contrôles des mélanges de poudre et des grains

#### Le test d'écoulement

L'essai d'écoulement est destiné à déterminer, dans des conditions définies, l'aptitude des solides divisés (poudres, granulés...) à s'écouler verticalement. Il permet d'avoir une idée sur le comportement du mélange final par rapport à son écoulement dans l'ensemble trémie-matrice de la comprimeuse. L'écoulement est considéré comme bon si, dans un entonnoir pharmacopée, 100 g de poudre s'écoulent en un temps inférieur ou égal à 10 secondes (Collectif and Levacher, 2016).

## Le test de tassement

La masse volumique est obtenue après tassement en provoquant, par voie mécanique, le tassement d'un échantillon de poudre placé dans une éprouvette graduée. Après relevé du volume initial de la masse de poudre, le récipient est soumis à des chocs mécaniques et des lectures de volume sont effectuées jusqu'à obtention de résultats sensiblement constants. Les chocs mécaniques sont produits en élevant le récipient puis en le laissant retomber d'une hauteur spécifiée, sous l'effet de son propre poids (utilisation d'un volumétre de tassement conforme à la pharmacopée européenne (J.Engelsmann type 2003, Allemagne)). 10 chutes, 500 chutes, puis 1250 chutes sont effectuées sur le même échantillon et les lectures à la plus proche graduation des volumes correspondants  $V_{10}$ ,  $V_{500}$  et  $V_{1250}$ . Si  $V_{500}-V_{1250}$  est supérieur à 2 mL faire  $V_{2500}$ . Des échantillons de 50 g sont utilisés pour les différents essais. Les valeurs obtenues déterminent l'indice de compressibilité et l'indice de Hausner. Ces indices permettent de caractériser indirectement l'aptitude à l'écoulement de la poudre et sa capacité à se comprimer facilement (Tableau 35).

*Équation 4 : Indice de compressibilité*

$$\text{Indice de compressibilité} = \frac{V_0 - V_f}{V_0} * 100$$

*Équation 5 : Indice de Hausner*

$$\text{Indice de Hausner} = \frac{V_0}{V_f}$$

*Tableau 35 : Echelle d'aptitude à l'écoulement ((EDQM, 2018)*

<b>Indice de compressibilité (%)</b>	<b>Aptitude à l'écoulement</b>	<b>Indice de Hausner</b>
<b>1-10</b>	Excellente	1,00-1,11
<b>11-15</b>	Bonne	1,12-1,18
<b>16-20</b>	Assez bonne	1,19-1,25
<b>21-25</b>	Passable	1,26-1,34
<b>26-31</b>	Médiocre	1,35-1,45
<b>32-37</b>	Très médiocre	1,46-1,59
<b>&gt; 38</b>	Extrêmement médiocre	> 1,60

## Étude granulométrique par tamisage analytique

La granulométrie est étudiée grâce aux tamis vibrant (Retsch AS200, Allemagne). Le tamisage est l'une des plus anciennes méthodes de classification des poudres et granulés en fonction de leur distribution granulométrique. Des tamis pesés vides sont empilés les uns sur les autres par ordre décroissant de finesse, puis la poudre à analyser est placée sur le tamis supérieur. Après agitation de la colonne de tamis pendant une durée normalisée, on pèse exactement la quantité de produit retenue sur chaque tamis. L'essai donne le pourcentage en masse de particules comprises dans chaque intervalle granulométrique. Les tailles de tamis utilisés étaient 90, 125, 180, 250, 355, 500 et 710  $\mu\text{m}$ . 25 g de poudre sont utilisés pour le test.

## Détermination de l'humidité résiduelle

L'essai a été réalisé afin de déterminer le taux d'humidité résiduelle (HR) des échantillons analysés. L'essai a été réalisé avec une balance à infrarouge (SARTORIUS® MA35, Allemagne). C'est une méthode qui utilise un rayonnement direct infrarouge pour sécher l'échantillon. Le rayonnement infrarouge est absorbé par l'échantillon. L'énergie absorbée provoque l'échauffement souhaité de la substance et la perte en masse est déterminée.

### **b. Les contrôles des comprimés**

#### L'uniformité de masse

Pour la réalisation de l'essai, 20 comprimés ont été pesés individuellement puis la masse moyenne et l'écart type ont été déterminés. La masse individuelle de 2 au plus des 20 comprimés peut s'écarter de la masse moyenne d'un pourcentage plus élevé que celui qui est indiqué dans le Tableau 36 ci-dessous, mais la masse d'aucune unité ne peut s'écarter de plus du double de ce pourcentage.

*Tableau 36 : Ecarts limites en fonction de la masse des comprimés non enrobés (EDQM, 2018)*

<b>Masse moyenne</b>	<b>Ecarts limites (%)</b>
<b>80 mg ou moins</b>	10
<b>Plus de 80 mg et moins de 250 mg</b>	7,5
<b>250 mg ou plus</b>	5

Pour la réalisation de cet essai une balance de précision a été utilisée (portée maximum 120g, d=0,0001g).

### **Le test de résistance à la rupture**

Cet essai est destiné à déterminer, dans des conditions définies, la résistance à la rupture des comprimés, mesurée par la force nécessaire pour provoquer leur rupture par écrasement. L'essai a été réalisé à l'aide d'un duromètre (Pharma-test PT B111E, Allemagne) sur 10 comprimés.

### **Le test de friabilité**

La réalisation de l'essai de friabilité a permis d'évaluer la capacité des comprimés à résister à des successions de chutes. Le friabilimètre (Erweka TA20, Allemagne) a fait subir 100 chutes successives aux comprimés, avec une vitesse de rotation à 25 rpm. Une pesée de l'échantillon a été réalisée avant (masse de comprimés proche de 6,5 g) et après les chutes. Pour avoir un contrôle conforme, la perte en masse doit être inférieure à 1 %.

### **L'essai de désagrégation**

Cet essai a été destiné à déterminer l'aptitude des comprimés à se désagréger dans un temps prescrit, en milieu liquide et dans des conditions expérimentales définies. L'essai a été jugé conforme lorsque le temps de désagrégation était inférieur à 15 minutes pour les comprimés nus et à 30 minutes pour les comprimés pelliculés. Pour les comprimés pelliculés gastro-résistants, l'essai a été réalisé dans un milieu qui était dans un premier temps acide (pH 2) (Tableau 37), puis ce milieu a été neutralisé par la suite (pH 7) (Tableau 38). L'essai a été réalisé sur 6 comprimés à l'aide de l'appareil à désagrégation (Pharma-Test Dist-3).

*Tableau 37 : Préparation de 2 L de solution pH 2*

<b>Composants</b>	<b>Quantités</b>
<b>NaCl</b>	5,85 g
<b>HCl à 36%</b>	2 mL
<b>Eau distillée</b>	QSP

Tableau 38 : Préparation de la solution pH neutre à partir de 800 mL de solution pH 2

Composants	Quantités
Tris (hydroxyméthyl) aminométhane	4,192 g
Acétate de sodium anhydre	2,848 g
Acide citrique anhydre	1,336 g
Eau distillée	QSP

## II. Résultats et discussions

### A. Le prétraitement du BM

Le BM a été réceptionné sous forme de mélange d'amas de tailles grossières et de particules fines. Pour faciliter sa manipulation, améliorer son écoulement et permettre l'obtention de mélanges homogènes, le BM a été soumis à un prétraitement pour casser les amas. Deux techniques ont été évaluées à savoir un broyage à l'aide d'un broyeur à billes et un passage forcé à travers un tamis.

Avec le broyage, le BM a été micronisé, mais une grande partie du BM a adhéré aux billes et n'a pas pu être récupérée. La capacité du broyeur utilisé était limitée (environ 5 g par opération).

Le prétraitement par tamisage avec des tamis de 400 $\mu$ m et 800  $\mu$ m a permis de casser les amas de BM mais avec quelques émissions de fines poudres qui ont été aspirées par la hotte.

Afin d'éviter de perdre du BM, d'avoir à répéter l'opération de broyage plusieurs fois compte tenu de la faible capacité du broyeur et d'avoir à ajouter une opération couteuse à l'ensemble du process de fabrication, le prétraitement du BM par tamisage a été retenu. Le tamis de 400  $\mu$ m a été utilisé pour le prétraitement du BM avant la compression directe car l'obtention de particules de BM de tailles inférieures à 400  $\mu$ m était recherchée, mais aussi parce que l'utilisation de tamis de maillage inférieur à cette taille a présenté des difficultés à cause du rapide colmatage des grilles. Le tamis de 800  $\mu$ m a été utilisé pour le prétraitement avant la granulation humide car cette dernière est une opération qui permet un réarrangement de la granulométrie de la poudre (pas besoin d'avoir une granulométrie trop petite), mais aussi afin d'aller plus vite comparativement au tamis de 400  $\mu$ m.

Le BM ayant fait l'objet d'un prétraitement a pu être utilisé pour réaliser les mélanges avec les différents excipients pour la fabrication des comprimés.

## B. La fabrication des comprimés nus de BM

La compression directe et la granulation humide suivie d'une compression ont été les deux voies utilisées pendant les essais de fabrication des comprimés de BM. La voie de fabrication par granulation sèche n'a pas été utilisée dans cette étude car elle est source de production de poussière ce qui n'est pas désiré dans le cadre de la manipulation du BM (Jannat et al., 2016).

Des poinçons ronds avec des rayons de courbures ont été utilisés afin d'obtenir des comprimés ronds bombés, et d'avoir une bonne fluidité de mouvement des comprimés pendant l'étape de pelliculage (Le Hir et al., 2016).

### 1. La voie de fabrication par compression directe du BM

Pour le développement des comprimés de BM, le premier process utilisé a été la compression directe. C'est le plus simple, très souvent le plus rapide à mettre en place et le plus facilement transposable. La voie de fabrication par compression directe a été divisée en deux étapes, le mélange du BM et des excipients, puis la compression du mélange obtenu. Chaque étape a fait l'objet de contrôles.

Les premiers contrôles ont porté sur les mélanges avant l'étape de compression (Tableau 39).

*Tableau 39 : Homogénéité et écoulement des mélanges avant compression*

	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>
<b>Taille de lot (g)</b>	100	100	100	100
<b>Diluant</b>	Avicel PH 301	Avicel PH 200	Avicel PH 200 Avicel PH 102	Avicel PH 200 Avicel PH 102
<b>Séché</b>	Non	Non	Oui	Oui
<b>Homogène (visuel)</b>	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Écoulement</b>	Très mauvais	Très mauvais	Très mauvais	Très mauvais

Des modifications ont été apportées aux formules après chaque essai (Tableau 23). Dans F2 comparativement à F1, le diluant a été changé (granulométrie plus grande) afin d'évaluer l'impact de la granulométrie sur l'écoulement du mélange. Pour F3, un mélange de diluants de différentes granulométries a été utilisé et un changement de







désintégrant a été réalisé. Dans F4, les proportions de BM et d'agent d'écoulement ont été augmentées.

Visuellement tous les mélanges étaient homogènes. Les tests d'écoulement sur l'ensemble des formules ont été très mauvais car les mélanges ne se sont pas écoulés dans l'entonnoir pendant les tests.

Les contrôles des mélanges avant compression (Tableau 39) ont montré que la variation du type de diluant (Avicel PH301, Avicel PH 200 et Avicel PH102), la variation des proportions de ces diluants et le séchage du mélange, n'ont pas eu d'influence sur l'écoulement du mélange et sur l'uniformité de remplissage de la matrice lorsque la presse a été utilisée en fonctionnement automatique. L'intégration d'agent d'écoulement (aérosil) à 2%, deux fois supérieur aux proportions conseillées (Sheskey et al., 2017), n'a pas permis de résoudre le problème de non écoulement des mélanges.

Les différents contrôles réalisés sur les comprimés une fois fabriqués sont présentés dans le Tableau 40.

*Tableau 40 : Les contrôles pendant et après compression directe des mélanges*

	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>
<b>Taille poinçons</b>	D10 R12	D10 R12	D10 R12	D10 R12
<b>Remplissage matrice (fonctionnement automatique)</b>	Non uniforme	Non uniforme	Non uniforme	Non uniforme
<b>Démélange pendant compression</b>	Oui	Oui	Non	Non
<b>Masse moyenne (mg)</b>	257± 6,2	256,7 ± 8,1	266 ± 4,3	254 ± 3,9
<b>Résistance à la rupture (N)</b>	84,8 ± 1,2	80 ± 1,1	78,9 ± 1,4	75,2 ± 0,8
<b>Friabilité</b>	0.43 %	0.48 %	0%	0%
<b>Désagrégation (s)</b>	43 ± 5	35 ± 7	23 ± 4	83 ± 13
<b>Photos comprimés</b>				

L'objectif de ces formulations n'a pas été d'ajuster le poids ou la taille des comprimés, mais d'évaluer le comportement des différents mélanges en compression directe.

La compression des mélanges a été réalisée de façon manuelle car en utilisant la presse en fonctionnement automatique, des problèmes de remplissage de la matrice ont été observés. Une forte dissémination de poudre a été aussi notée pendant

l'utilisation en fonctionnement automatique. Des démêlages ont été observés avec F1 et F2 pendant l'utilisation de la presse en fonctionnement automatique.

La friabilité de l'ensemble des formulations a été bonne (< à 1 %), avec des temps de désagrégation inférieurs à 15 min ; ce qui a correspondu aux exigences de la norme.

A cause des problèmes de dissémination de poudre et de remplissage irrégulier de la matrice, la presse a été utilisée en fonctionnement manuel de façon à ce que les matrices puissent se remplir lentement pour obtenir des résultats plus homogènes. Ne pas pouvoir utiliser la presse en fonctionnement automatique représente un frein à l'utilisation à grande échelle de ces formules telles qu'elles se présentent.

Parmi les résultats présentés dans le Tableau 40, F4 a présenté le temps de désagrégation le plus long car il avait la plus grande proportion de BM et le taux de désintégrant le plus bas par rapport aux autres formules. L'utilisation d'un seul diluant (F1 et F2) a entraîné pendant l'étape de compression un problème de démêlage, qui a été résolu par l'utilisation d'un mélange de diluants de différentes tailles de particules afin de ne pas avoir un trop grand écart granulométrique entre les particules (Collectif and Levacher, 2016).

Après analyse des résultats obtenus par compression directe, différents problèmes ont été soulevés :

- Mauvais écoulement des mélanges
- Mauvais remplissage des matrices
- Dissémination de fines poudres de BM pendant la compression
- Problème de démêlage pendant la compression.

Afin de résoudre tous ces problèmes, une granulation humide a été réalisée sur les mélanges avant l'étape de compression.

## **2. La voie de fabrication par granulation humide suivie d'une compression du BM**

La granulation humide est une technique qui permet de résoudre différents problèmes observés en compression directe, ceci grâce à une densification du mélange de départ (Cuq et al., 2013; Le Hir et al., 2016).

Plusieurs essais de granulation ont été réalisés avec des variations de la proportion de BM, de liant, d'agent d'écoulement, et du taux de mouillage.

L'analyse granulométrique des grains obtenus est présentée dans la Figure 45.

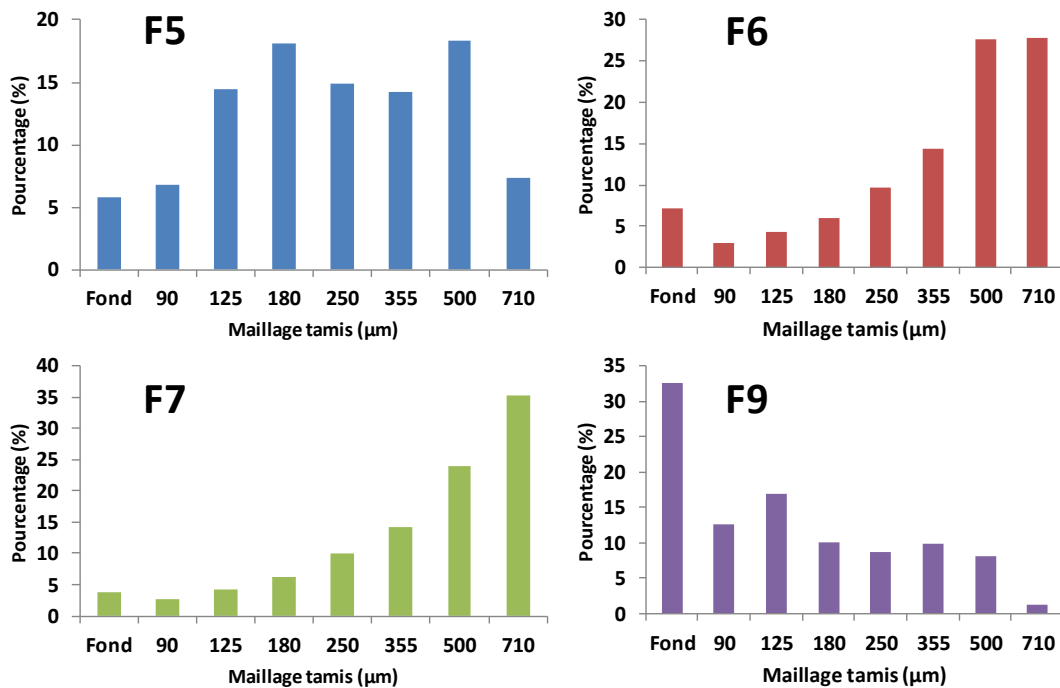
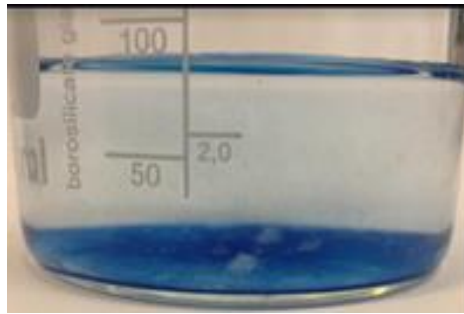


Figure 45 : L'analyse granulométrique des grains

Une augmentation de la proportion de BM, une diminution de la proportion de liant et un retrait de l'aérosil ont été effectués dans F6 comparativement à F5. Un changement de désintégrant a été effectué dans F7. La corscarmellose étant un superdésintégrant anionique, des interactions ioniques ont été notées entre elle et le BM (Balasubramaniam et al., 2008), avec une apparition de floculation lorsqu'un mélange binaire de BM et de corscarmellose a été réalisé dans l'eau (Figure 46). Une augmentation de la proportion de BM et de désintégrant, associée à une diminution du taux de liant et de mouillage ont été effectuées pour le grain F9.



*Figure 46 : Flocculations observées avec le mélange binaire BM et croscarmellose dans l'eau*

Les résultats de l'analyse granulométrique (Figure 45) ont montré que le grain F5 est composé de proportions élevées de particules dont les tailles sont comprises entre 125  $\mu\text{m}$  et 710  $\mu\text{m}$ , ce qui n'est pas le cas des autres grains. Les grains F6 et F7 ont présenté les mêmes répartitions granulométriques avec une proportion élevée de particules à plus de 500  $\mu\text{m}$ . A l'inverse, le grain F9 a été composé au 1/3, de particules de tailles inférieures à 90  $\mu\text{m}$ . Cette répartition granulométrique du grain F9 s'explique par le faible taux de liant utilisé et le faible taux de mouillage du mélange, ce qui n'avaient pas permis une plus grande croissance de la taille des particules pendant la granulation (Collectif and Levacher, 2016).

Les autres contrôles réalisés sur les grains F5, F6 et F7 sont présentés dans le Tableau 41.

*Tableau 41 : Les contrôles réalisés sur les grains F5, F6 et F7*

<b>Contrôle</b>	<b>F5</b>	<b>F6</b>	<b>F7</b>
<b>Ecoulement (sec./100g)</b>	13	14	16
<b>Densité vrac</b>	0,41	0,45	0,51
<b>Densité après tassement</b>	0,42	0,47	0,56
<b>Indice Hausner (Aptitude à l'écoulement)</b>	1,05 (Excellente)	1,04 (Excellente)	1,09 (Excellente)

Les contrôles réalisés sur le grain et le mélange final (ajout de la phase externe) F9 sont présentés dans le Tableau 42.

Tableau 42 : Les contrôles réalisés sur le grain et le mélange final F9

Contrôles	Grain F9	Mélange final F9
<b>Ecoulement (sec./100g)</b>	8	6
<b>Densité vrac</b>	0,39	0,45
<b>Densité après tassement</b>	0,50	0,54
<b>Indice Hausner</b>	1,28	1,22
<b>HR (%) 105°C critère d'arrêt : automatique 6min30sec</b>	13,66	12

Le test d'écoulement sur l'ensemble des grains a montré que seul le grain F9 a eu un temps d'écoulement inférieur à 10 sec. Ce meilleur temps d'écoulement du grain F9 s'explique par la présence d'une majorité de particules de petites tailles (< 90 µm), qui ont la propriété de s'intercaler entre les plus grandes et d'améliorer ainsi l'écoulement (Tea, 2015). Une attention particulière a donc été portée sur le grain F9.

En comparant les densités vrac et les densités après tassement des différents grains, le grain F9 a présenté la plus grande différence. Le grain F9 a donc eu la plus grande capacité de tassement. Cette capacité s'explique par le réarrangement des fines particules entre les grosses particules (Tea, 2015).

Une fois la phase externe ajoutée au grain F9, le temps d'écoulement est resté inférieur à 10 sec, ce qui correspond aux attentes.

La granulation a permis de résoudre les problèmes d'écoulement et de dissémination de poudre observée pendant l'utilisation de la voie par compression directe. L'étape suivante a été d'évaluer le comportement de ces grains pendant l'étape de compression, et de réaliser les contrôles sur les comprimés obtenus.

Avant l'étape de compression, une phase externe a été rajoutée aux grains. La phase externe et le grain ont contenu un désintégrant dans toutes les formules réalisées, car l'introduction du désintégrant dans les deux phases permet d'améliorer son action (Sheskey et al., 2017).

Les contrôles réalisés sur les comprimés nus obtenus sont présentés dans les Tableaux 43 et 44.

Tableau 43 : Les contrôles réalisés sur les comprimés nus F5, F6, F7 et F8

	F5	F6	F7	F8
<b>Taille lot (g)</b>	150	150	120	120
<b>Taille poinçons</b>	D12 R12	D12R12	D13 R10	D13 R10
<b>Masse cible (mg)</b>	520 ± 26	430 ± 22	645 ± 32	645 ± 32
<b>Masse moyenne (mg)</b>	539 ± 29	438 ± 10	674 ± 20	678 ± 16
<b>Coefficient de variation (%) (Ecartype/ masse moyenne)</b>	5,3	2,3	3,0	2,4
<b>Résistance à la rupture (N)</b>	75 ± 5	89 ± 7	71 ± 10	55 ± 8
<b>Friabilité (%)</b>	0	0,1	0,3	0,32
<b>Désagrégation (min)</b>	>15	>15	>15	>15

Tableau 44 : Les contrôles réalisés sur les comprimés nus F9a et F9b

	F9a	F9b
<b>Taille lot (g)</b>	535	
<b>Taille poinçons</b>	D12 R16 R2,5	D13 R10
<b>Masse cible (mg)</b>	462 ± 23	692 ± 35
<b>Masse moyenne (mg)</b>	472 ± 2	700 ± 3
<b>Coefficient de variation (%)</b>	0,4	0,4
<b>Résistance à la rupture (N)</b>	63 ± 4	66 ± 4
<b>Friabilité (%)</b>	0	0,12
<b>Désagrégation (min)</b>	3,5	4,5

Pendant l'étape de compression, aucune dissémination de poudre n'a été notée pour toutes les formulations.

En compression, l'atteinte des masses cibles n'a pas pu se faire pour les formules F5, F6, F7 et F8, à cause de la petite taille des lots fabriqués et de la variation importante de la masse des comprimés obtenus (Tableau 43). Le grain F9 a été utilisé pour fabriquer les comprimés de BM dosés à 300 mg (F9a) et 450 mg (F9b) (Tableau 44). Pour changer de dosage, seul l'ensemble poinçons/matrice a été changé. Le calcul des coefficients de variation (CV) pour chacune des formules a mis en évidence la régularité de masse des comprimés F9a et F9b en comparativement aux autres formules.

Tous les comprimés obtenus après granulation humide ont eu une bonne friabilité, ce qui a démontré une bonne résistance mécanique par rapport aux chutes. Ils pourront donc être utilisés pour le pelliculage (Collectif and Levacher, 2016).

Les comprimés de F5, F6, F7 et F8 ont un temps de désagrégation supérieur à 15 min, ce qui n'a pas été le cas pour F9a et F9b. Ces meilleurs temps de désagrégation obtenus avec F9a et F9b s'expliquent par la faible proportion en liant de la formule F9.

L'aspect des comprimés F9b est présenté dans la Figure 47.



*Figure 47 : Aspects des comprimés F9b*

Les comprimés F9b ont présenté un aspect régulier.

Après l'étape de compression, la formule F9 s'est présentée comme étant la meilleure avec un temps d'écoulement de son grain inférieur à 10 sec, le coefficient de variation de masse des comprimés le plus faible, une non-dissémination de poudre pendant la compression, une friabilité compatible avec la manipulation en pelliculage, un temps de désagrégation conforme aux recommandations de la pharmacopée. L'utilisation d'un seul mélange (F9) pour la réalisation des comprimés F9a et F9b, offre des possibilités de fabrication de comprimés plus faiblement dosés permettant de viser des tranches d'âge plus faibles.

### **3. La formulation des comprimés placébos**

Les comprimés placébos ont été formulés afin qu'ils soient utilisés pour la réalisation des essais préliminaires de pelliculage et ainsi éviter de consommer trop de BM.

Les résultats des contrôles réalisés sur les comprimés placebo ont été les suivants :

- Masse moyenne  $601 \pm 3$  mg
- Résistance à la rupture moyenne  $95 \pm 3$  N
- Friabilité 0,35 %

Un colorant (éosine) a été introduit dans la formule afin d'apprécier le comportement du film par rapport à une imprégnation de colorant, et de détecter les fuites au moment du contrôle de la fonctionnalisation. Les comprimés ont été obtenus par compression directe, en utilisant un produit de compression directe préformulé (PROSOLV®Easytab) prêt à l'utilisation. Les comprimés obtenus étaient ronds et bombés, avec une friabilité permettant leur utilisation en pelliculage (inférieure à 1 %).

### **C. L'étape de pelliculage**

Le pelliculage des comprimés a eu pour rôles de les protéger contre la lumière (BM photosensible), de faciliter leur manipulation (éviter de se tâcher la main et de colorer la muqueuse buccale pendant l'administration), de masquer le goût métallique et amer, et de les fonctionnaliser en les recouvrant d'un film gastro-résistant.

Les premiers essais de pelliculage ont été réalisés avec les comprimés placebo afin d'évaluer les différents agents de pelliculage avant de les déposer sur les comprimés de BM.

Tous les produits de pelliculage ont été contrôlés visuellement avant utilisation (homogénéité et absence d'amas).

#### **1. Le pelliculage des comprimés placebo**

Les comprimés placebo ont été pelliculés en suivant les process du Tableau 33 et les aspects des comprimés en fin de pelliculage sont présentés dans la Figure 48. Les produits de pelliculage utilisés pour les essais avec la formule placebo sont des produits de fonctionnalisation gastro-résistante.

#### **Eudragit® S100**

Un film de 4,06 % a été déposé sur les noyaux, alors que la cible était de 10 % par rapport à la quantité de suspension pulvérisée. Une fine poudre a été retrouvée dans la pelliculeuse à la fin du process. La coloration de la surface des comprimés pelliculés n'était pas homogène (Figure 48). Plongés dans une solution pH 2 à 37°C, les comprimés pelliculés ont gonflé en moins de 5 min et la couche de pelliculage a fini par céder et s'ouvrir sous la pression exercée par le gonflement des noyaux, sans toutefois se désagréger.



Le gonflement observé a démontré la présence de fuites dans le film de pelliculage. La quantité de film déposée sur les noyaux ne correspondait pas à la quantité pulvérisée. La matière retrouvée dans la pelliculeuse pourrait être liée à un problème d'adhésion du film aux noyaux. Avec les résultats obtenus et le temps de préparation assez long (plus de 18h), l'Eudragit® S100 n'a pas été utilisé avec les comprimés de BM.

### **Kollicoat® MAE 100P**

Le pelliculage a permis de déposer 2,74 % de film. Le process a été interrompu pendant la phase de dépôt du film car des problèmes d'adhésion aux parois de la turbine de pelliculage et de collage des comprimés entre eux ont été observés. La coloration de la surface des comprimés pelliculés n'a pas été homogène (Figure 48).

Les problèmes de collage et d'adhésion, ont rendu le process de pelliculage moins efficace car ne permettant plus d'avoir une circulation fluide des comprimés dans la turbine. Avec les résultats qui ont été obtenus, le Kollicoat® n'a pas été utilisé avec les comprimés de BM.

### **Vivacoat® Protect E**

Un film de 9,4 % a été déposé sur les noyaux. La coloration de la surface des comprimés pelliculés a été homogène (Figure 48). Plongés dans une solution pH 2 à 37°C pendant 2 heures, les comprimés pelliculés étaient restés intacts.

Le Vivacoat® Protect E a permis de déposer un film qui a tenu lorsque les comprimés ont été plongés dans une solution pH 2 à 37°C. Les comprimés ont été fonctionnalisés. Vivacoat® Protect E a donc été retenu pour les essais avec les comprimés de BM.



*Figure 48 : Aspects des comprimés placébos pelliculés*

## 2. Le pelliculage des comprimés de BM

Les comprimés de BM ont été pelliculés en suivant les process des Tableaux 33 et 34.

### **Vivacoat® Protect E**

Les comprimés F6 ont été pelliculés avec le dépôt d'un film de 8,2 %. Les comprimés avaient un aspect homogène à la surface (Figure 49). Plongés dans une solution pH 2 à 37°C, les comprimés pelliculés se sont ouverts au niveau des arrêtes en moins de 5 min sans désagrégation totale du film.



*Figure 49 : Aspect d'un comprimé F6 pelliculé avec Vivacoat® Protect E*

L'utilisation du Vivacoat® Protect E pour pelliculer les comprimés F6, a montré une non-acquisition de la fonctionnalisation. L'ouverture des comprimés pelliculés a démontré une fragilisation du film au niveau des arrêtes. L'épaisseur de la couche de film déposée sur les arrêtes est inférieure à l'épaisseur de la couche de film sur les côtés et les faces (Levina and C.R, 2005), ce qui a fragilisé le film au niveau des arrêtes. Le Vivacoat® Protect E est composé de copolymères anioniques (Kadian and Harikumar, 2009), alors que le BM s'ionise et donne des cations en solution. Cette différence de charge a créé des interactions entre l'agent de pelliculage et le BM, fragilisant ainsi encore plus le film.

Le Vivacoat® Protect E n'a donc pas été retenu pour la fonctionnalisation des comprimés de BM.

### **Opadry® et Sureteric®**

Afin de résoudre les problèmes d'adhésion du film de pelliculage et d'interactions entre le film et le BM, un double pelliculage a été réalisé avec le dépôt d'une première couche non fonctionnelle Opadry® II (non ionique), suivi du dépôt d'une couche fonctionnelle Sureteric®. Cette sous couche est utilisée pour permettre un meilleur accrochage de la couche fonctionnelle (Dewan et al., 2015). Le Sureteric® a été utilisé

parce que n'étant pas ionique (permet d'éviter les possibles interactions avec le BM au moment de sa libération) et étant compatible avec la sous-couche (excellente adhésion) (Dewan et al., 2015).

Les comprimés de F9a et F9b ont été pelliculés en suivant les paramétrages du Tableau 34.

3,36 % et 3,53 % de sous couche (Opadry®) ont été déposés sur les comprimés F9a et F9b respectivement. Les comprimés ont été contrôlés après le dépôt de la couche gastro-résistante (Tableaux 45 et 46).

Différents pourcentages de dépôts de couche gastro-résistante ont été réalisés. Pour F9a, les pourcentages intermédiaires de couche gastro-résistante de 5 et 9,7 % ont été obtenus grâce à la réalisation de prélèvements pendant le process de pelliculage. A la fin, 11,6% de film gastro-résistant ont été déposés. Pour F9b, les pourcentages intermédiaires de couche gastro-résistante de 4,6 et 7,8 % ont été obtenus. A la fin, un film de 9,4 % a été déposé sur les comprimés F9b.

*Tableau 45 : Les contrôles des comprimés pelliculés F9a*

<b>Contrôles</b>	<b>Couche gastro-résistante déposée</b>	
	<b>9,7 %</b>	<b>11,6 %</b>
<b>Apparence</b>	Comprimé rond et blanc	Comprimé rond et blanc
<b>Masse (mg)</b>	531 ± 5	542 ± 6
<b>Dureté (N)</b>	113 ± 8	108 ± 3
<b>Tampon pH 2 à 37°C pendant 2h</b>	Pas d'ouverture	Pas d'ouverture
<b>Tampon pH neutre à 37°C Désagrégation complète</b>	10 min	10 min

Tableau 46 : Les contrôles des comprimés pelliculés F9b

Contrôles	Couche gastro-résistante déposée	
	7,8 %	9,4 %
Apparence	Comprimé rond et blanc	Comprimé rond et blanc
Masse (mg)	788 ± 8	802 ± 5
Dureté (N)	136 ± 23	152 ± 17
Tampon pH 2 à 37°C pendant 2h	Pas d'ouverture	Pas d'ouverture
Tampon pH neutre à 37°C Désagrégation complète	11 min	12 min

Les aspects des comprimés F9b après le dépôt de la sous couche et de la couche fonctionnelle sont présentés dans la figure M.

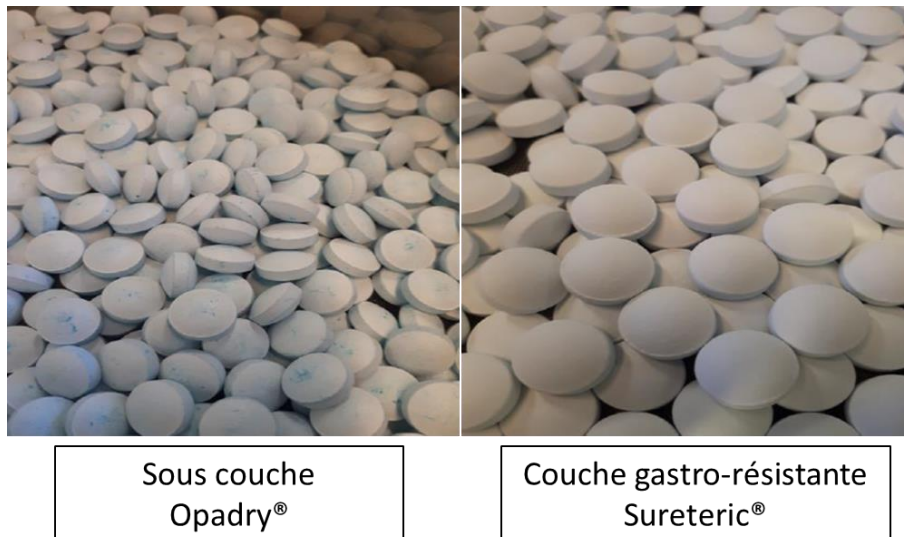


Figure 50 : Aspects des comprimés pelliculés F9b (sous couche et couche gastro-résistante)

Quelques taches bleues ont été retrouvées à la surface des comprimés après le dépôt de la sous-couche. Les comprimés qui n'étaient pas encore assez recouverts de film ont taché ceux qui commençaient à l'être (Figure 50). L'aspect de surface des comprimés pelliculés après le dépôt de la couche gastro-résistante a été homogène (Figure 50). Aucune poudre n'a été retrouvée à l'intérieur de la turbine de pelliculage, signe d'une absence de perte de produit de pelliculage (bonne adhésion du film).

Le pelliculage a provoqué une augmentation de la dureté des comprimés de l'ordre de 70% à 140%, ces mêmes résultats ont été obtenus par Stern et al (Stern, 1976).

Les pourcentages intermédiaires de couche gastro-résistante de 5 % (F9a) et 4,6 % (F9b) n'ont pas permis de fonctionnaliser les comprimés, car les comprimés se sont ouverts à pH 2.

Les tests de désagrégation réalisés sur les comprimés pelliculés F9a (à partir de 9,7 % de film gastro-résistant) et F9b (à partir de 7,8 % de film gastro-résistant), ont été conformes aux exigences de la pharmacopée, avec des temps de désagrégation inférieurs à 30 min dans le milieu pH neutre.

Le double pelliculage avec le dépôt dans un premier temps d'une couche non fonctionnelle permettant une bonne adhésion de la couche suivante (Opadry®II), suivi du dépôt d'une seconde couche fonctionnelle à base de dérivés vinyliques (Sureteric®), a permis de fonctionnaliser les comprimés F9a et F9b.

### **III. Conclusion**

Le développement des comprimés gastro-résistants fortement dosés de BM a soulevé différents problèmes qui ont été le mauvais écoulement des mélanges, la dissémination de fines particules de BM pendant certaines opérations (tamisage, compression), et la fonctionnalisation des comprimés.

Le développement a été réalisé en plusieurs étapes, avec dans un premier temps la fabrication des comprimés nus de BM, puis dans un second temps leur fonctionnalisation à l'aide d'un pelliculage. Il existe différentes voies de fabrication des comprimés, la voie par compression directe, la voie par granulation (sèche ou humide) suivie d'une compression. La compression directe a été utilisée premièrement car étant la voie la plus rapide à mettre en place et la plus facilement transposable. Son utilisation a soulevé des problèmes d'écoulement des mélanges, de non-uniformité de remplissage des matrices lorsque la presse a été utilisée en fonctionnement automatique, une dissémination de fines particules de BM et un démélange pendant la compression. Afin de résoudre tous ces problèmes, une granulation a été utilisée. La granulation par voie sèche n'a pas été utilisée car elle a la particularité de produire beaucoup de poussières, ce qui a été évité pour le BM. La granulation humide a donc été utilisée. Elle a permis de densifier le mélange et de résoudre les différents problèmes observés avec la compression directe. Elle a aussi permis d'obtenir un

mélange final offrant des possibilités de variation de doses grâce à une utilisation de différentes tailles de poinçons.

La fonctionnalisation des comprimés nus formulés par granulation humide a été réalisée à l'aide d'un double pelliculage. Le double pelliculage a consisté en un dépôt d'une sous-couche non fonctionnelle permettant une bonne adhésion de la couche suivante, puis d'une seconde couche fonctionnelle non ionique afin d'éviter toute interaction avec le BM.

La voie de fabrication des comprimés par granulation humide et le dépôt d'une double couche de pelliculage ont permis d'obtenir des comprimés de BM gastro-résistants fortement dosés.



## **Conclusion et perspectives**





Face à l'apparition et au développement des résistances aux bithérapies utilisées actuellement dans la lutte contre le paludisme, plusieurs stratégies basées sur le développement de nouvelles molécules ou de remise à jour de molécules existantes, ont été mises en œuvre. Mon travail de thèse a consisté à proposer de nouveaux outils thérapeutiques concernant le BM, molécule synthétisée pour la première fois au XIX<sup>ème</sup> siècle et utilisée au début du XX<sup>ème</sup> siècle comme antipaludique. Le BM n'a pas beaucoup fait l'objet de recherches en termes de formulation galénique.

Le développement, par la société *Provepharm Life Solutions*, d'un BM détoxifié, a relancé l'intérêt du BM dans le traitement de plusieurs maladies, en particulier le traitement de la méthémoglobinémie. De nouvelles stratégies incluant le BM peuvent à présent être proposées pour la lutte contre le paludisme.

Les études cliniques réalisées pour démontrer d'efficacité du BM sur les parasites sexués et asexués du paludisme, ont soulevé plusieurs problèmes liés à l'utilisation de formes non élaborées de BM, souvent non détoxifiées, présentant un effet émétisant empêchant ainsi une bonne observance et une acceptabilité par les populations concernées. D'autre part, la courte  $\frac{1}{2}$  vie du BM impose des doses élevées de BM et il est intéressant d'identifier des moyens de prolonger cette demi-vie et de pouvoir ainsi réduire les doses d'administration. Nous avons donc proposé deux axes de travail, le premier portant sur le développement d'une nanoformulation nucléolipidique de BM et le second, sur le développement de comprimés gastro-résistants de BM.

### **Potentiel de développement des nanoformulations à base de nucléolipides :**

L'encapsulation du BM avec des NLs a été réalisée en laboratoire à petite échelle. Les nanoparticules obtenues ont permis de protéger partiellement le BM contre la réduction et la photo-dégradation. Cette optimisation pourrait permettre une meilleure conservation du BM en solution avant administration, et prolonger sa demi-vie plasmatique. L'activité antipaludique *in vitro* du BM sur des souches chloroquinosensibles et multirésistantes n'a pas été altérée par cette encapsulation. D'après nos recherches, cette étude représente la première nanoformulation de BM réalisée dans le cadre du traitement du paludisme. La réalisation de la nanoformulation a présenté des difficultés, car le BM (hydrosoluble) et les NLs (base lipidique) utilisés

étaient de natures opposées. Après la formulation, la caractérisation physicochimique et l'évaluation de l'activité antipaludique *in vitro* des BM-NPs, des essais préliminaires de lyophilisation de ces NPs ont été réalisés. Ces essais ont été les premiers réalisés avec les NLs synthétisés par le laboratoire ChemBioPharm. Les résultats obtenus ont été prometteurs.

Par contre, la transposition d'échelle vers une production de volume plus important des BM-NPs semble difficile, compte tenu de différents facteurs, en particulier le coût de synthèse des NLs, leur stabilité, et la difficulté de la réalisation des différentes techniques de formulation à grande échelle. Par contre, la recherche sur l'optimisation de l'activité du BM en solution par la technique d'encapsulation est intéressante, surtout depuis la commercialisation d'une forme intra veineuse de BM par la société *Provepharm Life Solutions*, dont l'indication est actuellement restreinte au traitement de la méthémoglobinémie. Une forme injectable de BM encapsulé pourrait être développée avec une indication pour le traitement du paludisme grave.

#### **Potentiel de développement d'une forme gastro-résistante de BM :**

Suite à nos travaux, nous sommes en mesure de proposer une formulation de comprimés gastro-résistants fortement dosés en BM, en utilisant la voie de fabrication des comprimés par granulation humide, suivie d'une fonctionnalisation par pelliculage. La formule développée offre la possibilité de varier les doses en jouant sur la taille des comprimés, ouvrant ainsi la voie vers des comprimés adaptés au poids et à l'âge des patients. Les grains obtenus après l'étape de la granulation humide, pourront faire l'objet d'études complémentaires pour des essais de pelliculage, afin d'obtenir une forme pédiatrique gastro-résistante.

Le temps et les moyens financiers limités ne nous ont pas permis d'avancer sur les études de stabilité, ni d'entreprendre des études de biodisponibilité chez l'animal. Le laboratoire *Provepharm Life Solutions*, par l'intermédiaire d'un sous-traitant, a pris en charge la transposition d'échelle, les études analytiques et la réalisation des études de stabilité. Les études chez l'animal suivront, permettant ainsi d'aborder les études cliniques de phase I afin de comparer la biodisponibilité du comprimé gastro-résistant avec celle des comprimés utilisés dans les études cliniques antérieures.

Une possible activité synergique a été noté entre le BM et l'acide ascorbique sur la souche chloroquinorésistante de *P. falciparum* en *in vitro*. Cette activité mérite d'être confirmée et caractérisée par des études complémentaires, qui seront conduites dans le laboratoire du Dr Bruno Pradines à Marseille.

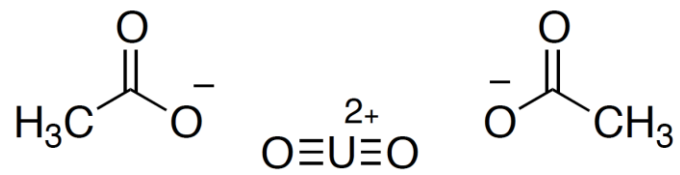
Ce travail de thèse m'a permis d'aborder i) une problématique de recherche fondamentale avec les nanoparticules, et ii) une recherche galénique par la réalisation de comprimés gastro-résistants. J'ai pu ainsi me familiariser avec plusieurs techniques de formulation (nanoformulation, lyophilisation, compression, pelliculage), en travaillant avec deux laboratoires complémentaires, Chembiopharm et le LTPIB. La réalisation de ce travail m'a permis de comprendre et aborder une démarche scientifique à la fois fondamentale et appliquée, mais également d'avoir accès à différentes formations qui me seront utiles pour mes futures activités d'enseignement et de recherche en pharmacie galénique. J'ai pu également acquérir une bonne connaissance du paludisme et de sa complexité, maladie qui reste prioritaire au Togo, mon pays d'origine.

L'utilisation du BM dans la lutte contre le paludisme reste toujours d'actualité, surtout dans le cadre de l'élimination de la transmission dans les zones de pré-élimination. Dans cet objectif, la production de la forme orale gastro-résistante dans des conditions de bonnes pratiques de fabrication (BPF) doit être entreprise par un industriel afin de pouvoir réaliser des lots cliniques. Ce projet est actuellement étudié par un consortium créé par *Provepharm Life Solutions* autour du BM et paludisme, et représenterait pour moi un aboutissement de mon travail de thèse. J'espère que ma carrière d'enseignant chercheur me donnera l'occasion de participer à des activités cliniques autour du BM et paludisme.

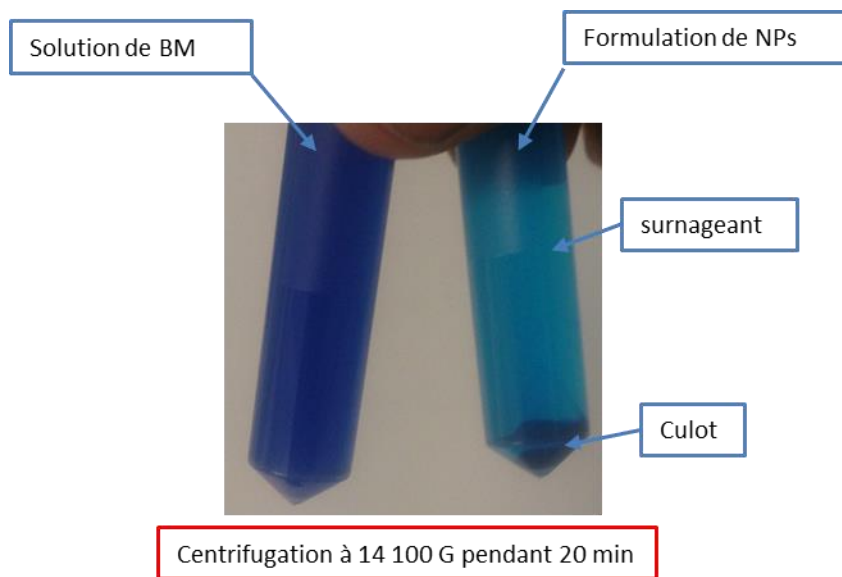


## Annexes

Annexe 1 : Formule chimique de l'acétate d'uranyle



Annexe 2 : Centrifugation des NPs avec obtention d'un culot





Certificate of Analysis

Product Name:	<b>PROVEBLUE™</b>	Product Code:	<b>PB-EU1</b>
Grade:	<b>Ph. Eur. Grade Standard</b>	Batch Number:	<b>25002301</b>
Official name:	<b>Methylthionium chloride</b>	Date of manufacture:	<b>02/08/2013</b>
Molecular Formula:	<b>C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S · x H<sub>2</sub>O</b>	Batch Size:	<b>8.890 kg</b>
Molecular Weight:	<b>319.9 + x*18 g/mol</b>	Delivery Quantity:	<b>624g</b>
Customer:	<b>Université de Bordeaux</b>	Retest date:	<b>17/07/2015</b>
Manufacturer:	<b>NOVASEP</b>		

Analysis	Reference methods	Specifications PB-EU1	Results
<b>Ph. Eur. Monograph tests</b>			
ASSAY	Ph. Eur. (2.2.29)	93.0 - 102.0 % on dry substance	99.8 %**
<b>CHARACTERS</b>			
Appearance	Ph. Eur. Monograph n° 1132	Dark blue or dark green crystalline powder with a metallic sheen	Complies**
Solubility	Ph. Eur. (5.11)	Slightly soluble in water, slightly soluble in ethanol (96 %)	Complies
<b>IDENTIFICATIONS</b>			
A. UV&VIS	Ph. Eur. (2.2.25)	Absorption maxima : at 255-260 nm, 285-290 nm, 670-680 nm and 740-750 nm	Complies
B. TLC	Ph. Eur. (2.2.27)	The principal spot (test solution) is similar in position and size to the principal spot (ref solution)	Complies
C.	Ph. Eur. (2.3.1)	The filtrate gives reaction (a) of chlorides	Complies
<b>TESTS</b>			
<b>Related substances</b>			
Impurity A (Azure B)	Ph. Eur. (2.2.29)	≤ 5.0 %	0.75 %**
Each other impurity	Ph. Eur. (2.2.29)	≤ 0.10 %	<0.02 % (LD)**
Sum of impurities, other than impurity A	As described in Ph. Eur. Monograph n° 1132	≤ 0.5 %	Not Quantifiable**
<b>Metals (ICP/MS)</b>			
Al	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 100 ppm	< 20 ppm
Cd	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 1 ppm	< 0.2 ppm
Cr	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 100 ppm	< 20 ppm
Cu	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 300 ppm	< 60 ppm
Sn	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 10 ppm	< 2.0 ppm
Fe	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 200 ppm	< 40 ppm
Mn	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 10 ppm	< 2.0 ppm
Hg	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 1 ppm	< 0.2 ppm
Mo	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 10 ppm	< 2.0 ppm
Ni	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 10 ppm	< 2.0 ppm
Pb	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 10 ppm	< 2.0 ppm
Zn	Ph. Eur. (2.2.22)	≤ 100 ppm	< 20 ppm
Loss on drying	Ph. Eur. (2.2.32)	8.0 - 24.0 %	21.4%**
Sulphated Ash	Ph. Eur. (2.4.14)	≤ 0.25 %	0.04 %

<b>Additional Provepharm tests</b>			
<b>Synthesis impurities</b>			
Other synthesis impurities*	In house HPLC method n°P00712 and Ph. Eur. (2.2.29)	≤ 0.10 % (each)	< LD (0.02 %)

\* Test performed once a year or every 10 batches, whatever comes first  
 \*\* Result extracted from stability T18 months  
 Data extracted from Novasep CoA n°70000010633 dated 25/07/2013

Batch manufactured, packaged and tested in accordance with ICH Q7 guideline

**CONCLUSION:** *Batch conforms to this specification at release. To be re-tested before use*

Store between +2°C and +8°C  
 Protect from light in original packaging

Retest period: **24 months**  
 Retest date: **to be retested before use**

Avoid contact with metals or any materials that can contain them

Primary packaging: PE sachet; Secondary packaging: PE liner; Tertiary packaging: Fiber or Polymer drum

Muriel DEMAEGDT, Quality Director

*19 June 2016*

REFERENCE: QA 070/ F 014  
 DATE D'APPLICATION: 01/04/2016  
 DATE D'EXPIRATION: Avril 2019

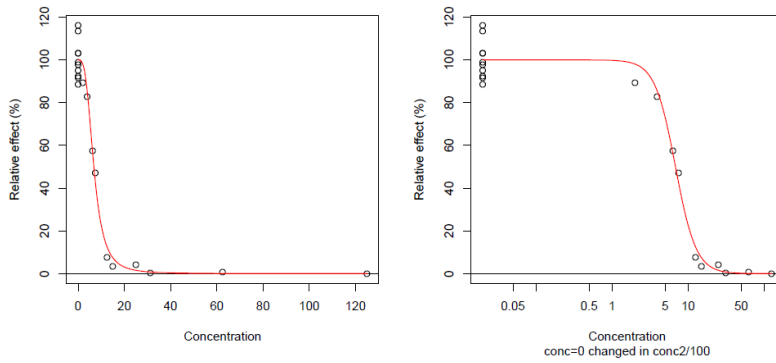
version 12

Certains appareils sont sous métrologie (M) :

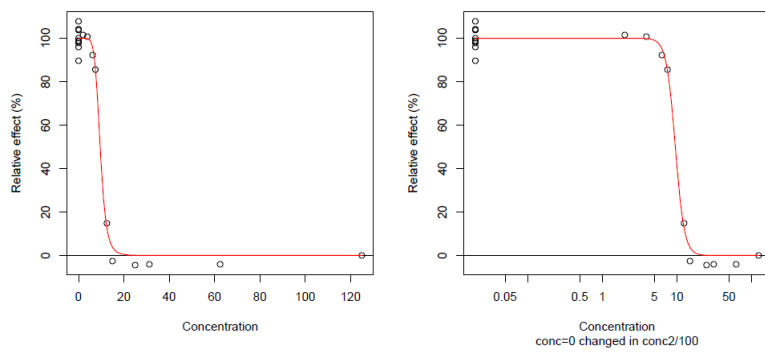
- Matériel de fabrication
  - Presse alternative Frogerais Type OA,
  - Presse rotative Dott Bonapace CPR-18/D-8,
  - Mélangeur Turbula type T2C,
  - Mélangeur conique Erweka,
  - Granulateur oscillant Erweka AR400,
  - Granulateur GLATT TGM1/6 avec une cuve de 4L,
  - Pelliculeuse Procept 4m8 Trix (M)
  - Agitateur à hélice IKA,
  - Etuve Binder ED400 (M)
  - Broyeur à billes Retsch PM100
- Matériel de contrôle
  - Voluménoètre de tassement J. Engelsmann type 2003,
  - Tamis vibrant Retsch AS200,
  - Appareil de désagrégation Pharma-Test Dist-3 (M)
  - Friabilimètre Erweka TA20,
  - Analyseur d'humidité à infrarouge SARTORIUS MA35 (M)
  - Duromètre Pharma-Test PT B111E (M)



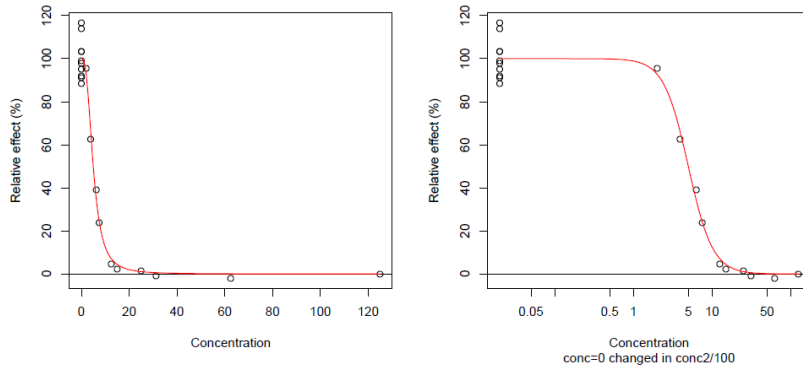
Souche 3D7 : BM



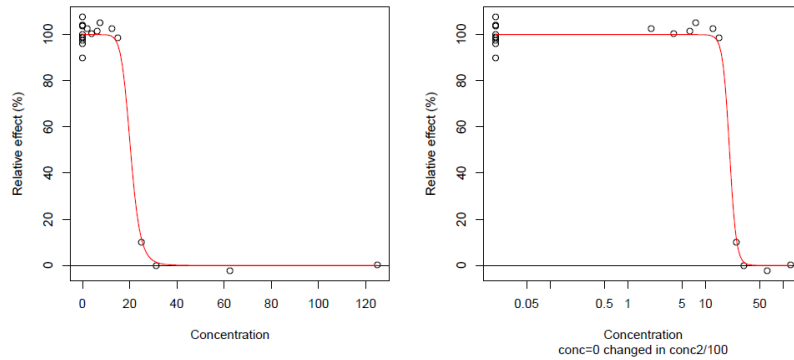
Souche W2 : BM



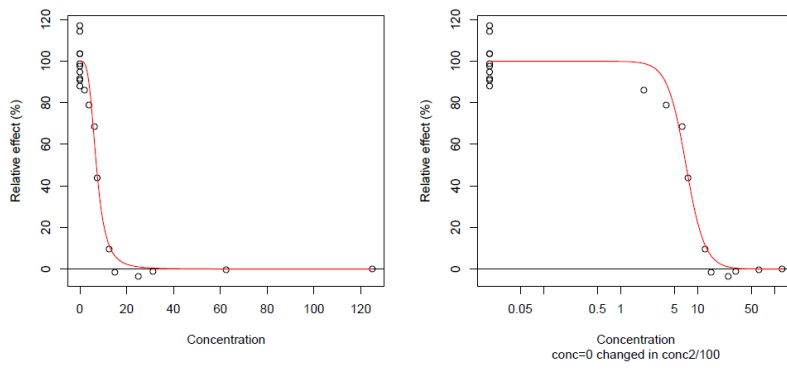
Souche 3D7 : BM-NPs



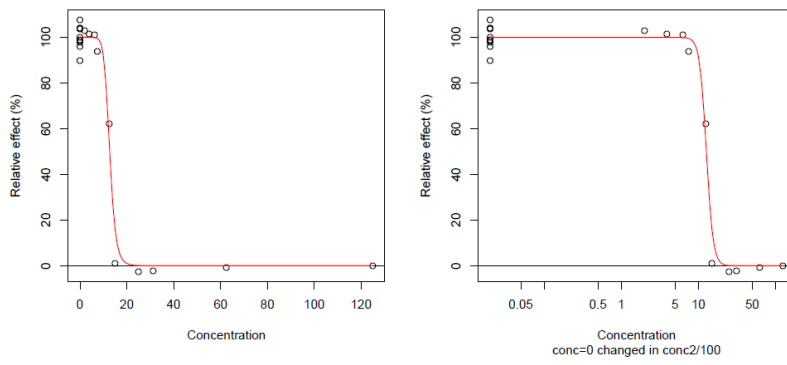
Souche W2 : BM-NPs



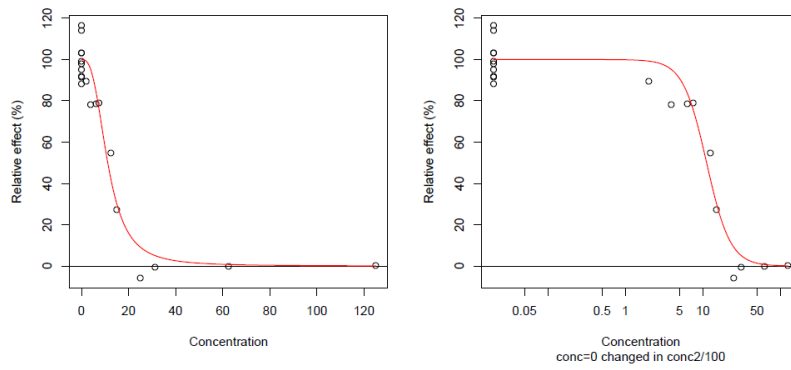
### Souche 3D7 : BM + Lumière



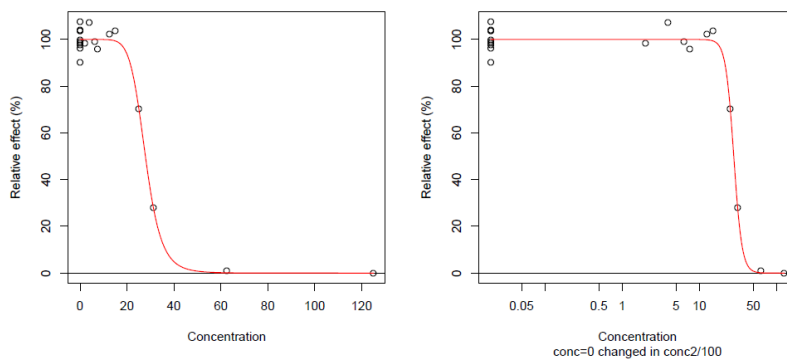
### Souche W2 : BM + Lumière



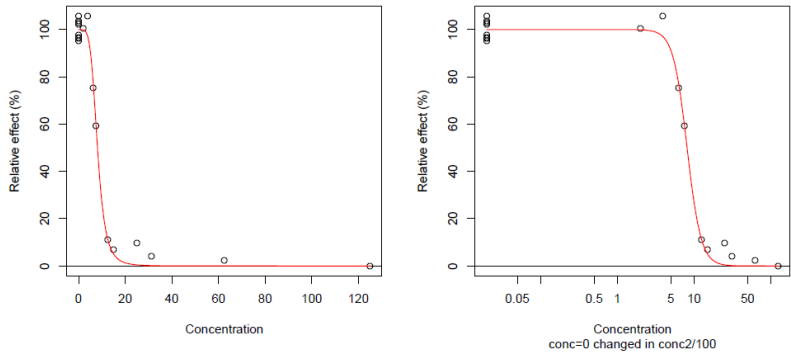
### Souche 3D7 : BM- NPs + Lumière



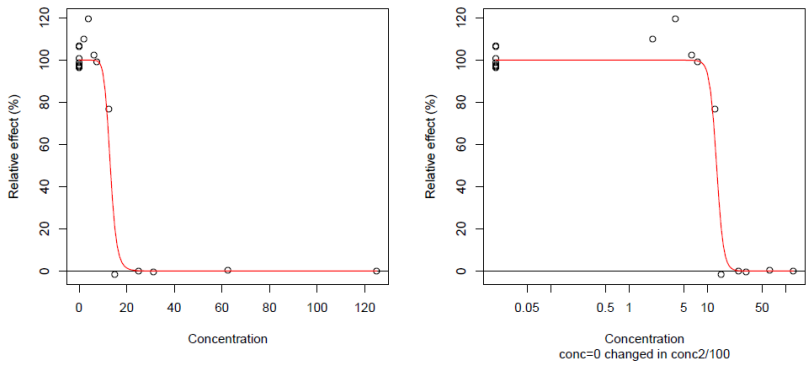
### Souche W2 : BM-NPs + Lumière



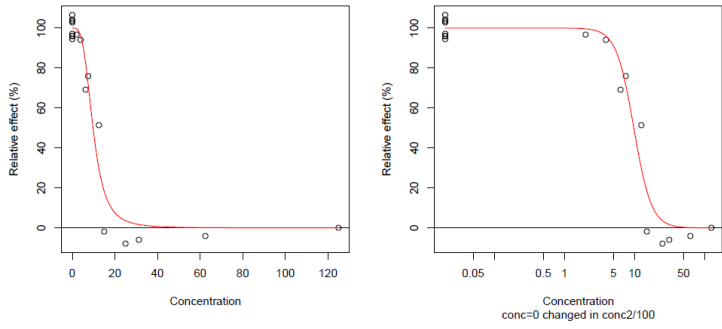
### Souche 3D7 : BM + Ac Ascorbique



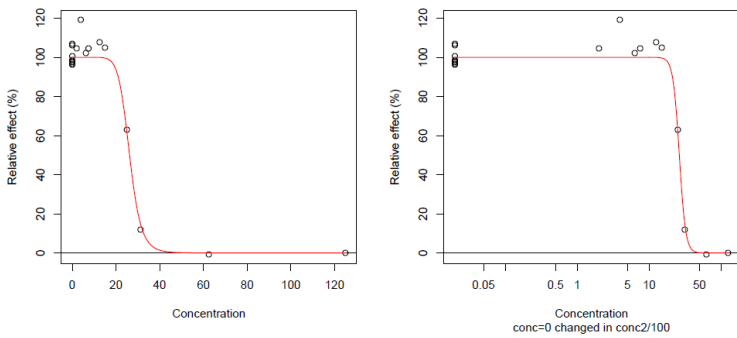
### Souche W2 : BM + Ac Ascorbique



### Souche 3D7 : BM-NPs + Ac Ascorbique



### Souche W2 : BM-NPs + Ac Ascorbique





Cite this: RSC Adv., 2019, 9, 18844

## Nucleoside-lipid-based nanocarriers for methylene blue delivery: potential application as anti-malarial drug†

Koffi Kowouvi,<sup>a</sup> Bruno Alies,<sup>b</sup> \*a Mathieu Gendrot,<sup>bcd</sup> Alexandra Gaubert,<sup>a</sup> Gaëlle Vacher,<sup>a</sup> Karen Gaudin,<sup>a</sup> Joel Mosnier,<sup>bcd</sup> Bruno Pradines,<sup>bcd</sup> Philippe Barthelemy,<sup>e</sup> \*a Luc Grislain<sup>e</sup> and Pascal Millet<sup>\*a</sup>

Nucleolipid supramolecular assemblies are promising Drug Delivery Systems (DDS), particularly for nucleic acids. Studies based on negatively and positively charged nucleolipids (diC16dT and DOTAU, respectively) demonstrated appropriate stability, safety, and purity profile to be used as DDS. Methylene Blue (MB) remains a good antimalarial drug candidate, and could be considered for the treatment of uncomplicated or severe malaria. However, the development of MB as an antimalarial drug has been hampered by a high dose regimen required to obtain a proper effect, and a short plasmatic half life. We demonstrated that nanoparticles formed by nucleolipid encapsulation of MB using diC16dT and DOTAU (MB-NPs) is an interesting approach to improve drug stability and delivery. MB-NPs displayed sizes, PDI, zeta values, and colloidal stability allowing a possible use in intravenous formulations. Nanoparticles partially protected MB from oxido-reduction reactions, thus preventing early degradation during storage, and allowing prolonged pharmacokinetic in plasma. MB-NPs' efficacy, tested *in vitro* on sensitive or multidrug resistant strains of *Plasmodium falciparum*, was statistically similar to MB alone, with a slightly lower IC<sub>50</sub>. This nucleolipid-based approach to protect drugs against degradation represents a new alternative tool to be considered for malaria treatment.

Received 5th April 2019  
Accepted 29th May 2019

DOI: 10.1039/c9ra02576f

rsc.li/rsc-advances

### 1. Introduction

Worldwide malaria eradication is hampered by *Plasmodium falciparum* resistance to new antimalarial drugs, including internationally recommended combination therapies based on artemisinin derivatives (ACT). The development of new antimalarial drugs is a mandatory step. However although many potential candidates have been identified, the high cost of drug development and the lack of R&D funding result in limited opportunities for new drugs to reach a clinical development status.<sup>1</sup> Therefore, drugs that are already registered for other diseases and affordable in the public domain, represent an intermediate solution for the development of new antimalarial drug combination therapies.

Methylene Blue (MB) is a positively charged tricyclic phenothiazine molecule (Fig. 1) which has been used for malaria treatment.<sup>2</sup>

Paul Ehrlich highlighted in 1891 that dyes targeting some microorganisms and keeping the surrounding tissue unharmed could be used as drugs. MB especially presented a high affinity for *Plasmodium* parasites and low toxicity for the patients.<sup>3</sup> However, in the early 1900's, quinine supplanted MB due to its efficacy at lower dose.<sup>4</sup> Since then, MB has been approved for the treatment of methaemoglobinaemia, prevention of urinary tract infections, treatment and prevention of ifosfamide-induced neurotoxicity and intraoperative visualization of nerve tissues, endocrine glands, and fistulae.<sup>5,6</sup>

Recently, a new MB product was developed and approved by the authorities in Europe (2011) and the USA (2016) as therapeutic agent against methaemoglobinaemia. Proveblue® (Provepharm Life Solutions) contains limited organic impurities and heavy toxic metals; a great improvement compared to the other products on the market. Moreover, Proveblue® was more efficient than dihydroartemisinin for the prevention of cerebral malaria in a murine model.<sup>7</sup>

Up to now, clinical studies in humans and *in vitro* assays have revealed promising MB antimalarial activity either alone or in combined therapeutic approaches, against both asexual and sexual stages of *P. falciparum*.<sup>8–12</sup> Additionally, MB exhibited

<sup>a</sup>Univ. Bordeaux, U1212 INSERM-UMR 5320 CNRS, ARNA, ChemBioPharm, 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux, France. E-mail: bruno.alies@u-bordeaux.fr; pascal.millet@u-bordeaux.fr

<sup>b</sup>Unité de Parasitologie et Entomologie, Département Microbiologie et Maladies Infectieuses, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France

<sup>c</sup>Aix-Marseille Univ., IRD, SSA, AP-HM, VITROME, Marseille, France

<sup>d</sup>IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

<sup>e</sup>Univ. Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux, France

<sup>f</sup>Centre National de Référence du Paludisme, Marseille, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9ra02576f



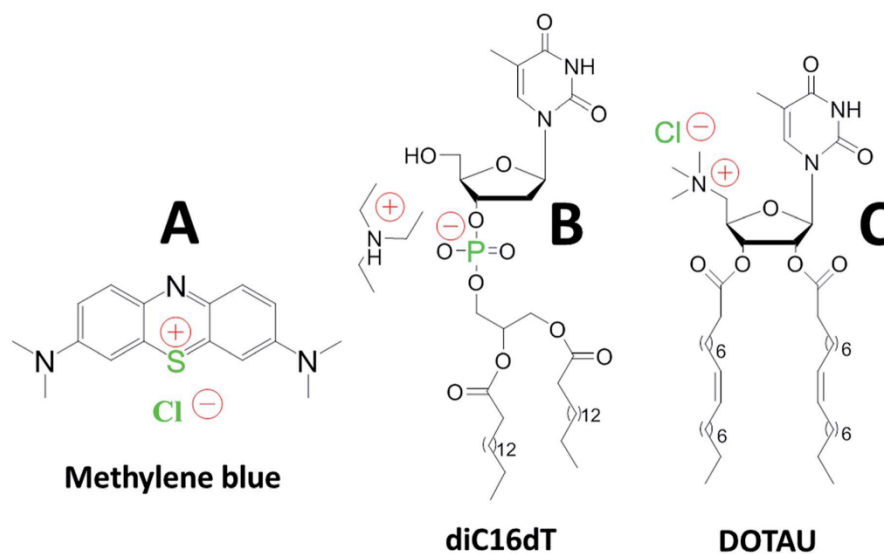


Fig. 1 Chemical structures of methylene blue (A), anionic nucleotide-lipid diC16dT a thymidine 3'-(1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate) (B), cationic-nucleoside-lipid DOTAU (2',3'-dioleoyl-5'-deoxy-5'-trimethyl-ammonium-uridine) (C). Green color highlight atoms identified with the EDX analysis (see Fig. 2c). Red color show molecules charges in solution.

high antimalarial activity against *P. falciparum* multiresistant strains and field isolates alone or in combination with dihydroartemisinin.<sup>13–15</sup>

However, the development of MB as an antimalarial drug has been hampered by a relatively high dose regimen required to be efficient. A dose around 15 mg kg<sup>-1</sup> used in many clinical studies (about 1 g of MB per day for 60 kg weight during 3 days),<sup>10,12,16,17</sup> led to a heavy oral administration in combination with other antimalarial drugs. Plasmatic bioavailability of MB rapidly reaches 85%, however the plasma half-life is less than 15 hours in adults,<sup>18</sup> resulting in elevated and repeated drug administration to keep an appropriate plasmatic level and to obtain complete parasite elimination. The action mechanism of MB oxidized form (blue) is based on a non-competitive inhibition of glutathione reductase in the parasite cytosol.<sup>5</sup> Still, its reduction by NADPH leads to the formation of leucomethylene blue (reduced form: colourless) decreasing MB efficiency. The protection of MB against reduction is a crucial point to enhance its plasma half-life and its action against the parasite.

An innovative approach to reach this goal is the development of nucleolipid based formulations.<sup>19</sup> The use of negatively or positively charged nucleolipids (diC16dT and DOTAU respectively) previously demonstrated several advantages such as good stability and safety confirming their potentiality as Drug Delivery System (DDS).<sup>20,21</sup> Formulation obtained by nanoprecipitation of these molecules allowed the formation of solid lipid nanoparticles (SLNs) with positive (SLN+) or negative (SLN-) charges depending on the nucleolipid used (Fig. 1).<sup>22,23</sup> Based on this approach, we hypothesized that MB could (i) be

protected against reduction and photodegradation, and (ii) present a higher affinity for infected red blood cells.

We report here the first example of MB-based SLNs stabilised by nucleolipids and their *in vitro* anti-malarial activity against *P. falciparum* parasite strains.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

MB (Proveblue®) was a gift from Provepharm Life Solutions (Marseilles, France). diC16dT (CAS number: 1160002-70-9) and DOTAU (CAS number: 868226-06-6) were synthesized in house according to previous publication.<sup>20,21,24</sup> Chloroquine (CQ), quinine (QN), dihydroartemisinin (DHA) and doxycycline (DOX) were purchased from Sigma (Saint Louis, MO, USA). Amodiaquine (DQ) was provided by the WHO (Geneva, Switzerland) and mefloquine (MQ) was a gift from Roche (Paris, France). Lume-fantrine (LMF) from Novartis Pharma (Basel, Switzerland), artesunate (AS), piperazine (PPQ) and pyronaridine (PND) were purchased from Shin Poong Pharm Co. (Seoul, Korea). Absolute ethanol (EtOH) was purchased from VWR Chemicals (France). Water used in all experiments except *in vitro* experiment was produced in-house by ultrapure water system (ELGA Millipore system, minimum resistivity: 18.2 MΩ) and subsequently distilled to prevent any possible trace of resin from the ultrapure water system. MilliQ was purchased from Merck Millipore (MA, USA). RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium was purchased from Sigma Aldrich (France). Ascorbic acid and NaCl were purchased from COOPER (France).



*P. falciparum* chloroquine-susceptible strains 3D7 (African) was obtained from MR4 (VA, USA) and multi-drug resistant W2 strain (Indochina) was obtained from MR4 (VA, USA).

## 2.2. Preparation of MB nanoparticles

**MB/diC16dT nanoparticles (MB/diC16dT NPs).** A stock solution of diC16dT at 4 mg mL<sup>-1</sup> prepared in EtOH was diluted in water (at 23 °C ± 1 °C) to get a resulting concentration of 0.48 mg mL<sup>-1</sup>. A stock solution of MB stock solution at 1 mg mL<sup>-1</sup> prepared in EtOH was diluted in water (at 23 °C ± 1 °C) to get a resulting concentration of 0.17 mg mL<sup>-1</sup>. Similar volume of diluted solution of diC16dT (2838 µL) and MB (3000 µL) were mixed and vortexed (for 10 seconds at 1500 rpm) then stored in the dark at room temperature for 72 h.

**MB/diC16dT/DOTAU nanoparticles (MB-NPs).** A lipidic film of DOTAU (0.24 mg) obtained from ethanol evaporation was rehydrated using MB/diC16dT NPs solution for 1 h at 37 °C under stirring (at 150 rpm). Final concentrations are 0.086, 0.23 and 0.041 mg mL<sup>-1</sup> for MB, diC16dT and DOTAU, respectively.

## 2.3. Particle size and zeta potential measurements

Particle size and zeta potential analysis were performed at 25 °C using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Orsay, France). Samples were diluted by 20 fold in distilled water, and measurements were performed at 25 °C. Mean diameter and polydispersity index (PDI) were measured in low volume disposable cuvettes whereas zeta potential were obtained using a folded capillary zeta cells. All analysis were performed in triplicate.

## 2.4. HPLC composition analysis

MB-NPs were analysed by HPLC on C<sub>18</sub> column (YMC ODS-AQ 3 µM 4.0 × 50 mm) with mobile phase 60/40, methanol/H<sub>2</sub>O, v/v (both containing 20 mM ammonium acetate) during 3 min, then 95/5, methanol/H<sub>2</sub>O. Retention times were 1.3, 10 and 11.8 min for MB, diC16dT and DOTAU, respectively. Composition analysis was based on three calibration curve for each molecule.

## 2.5. Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency (EE) was determined using a direct method. 1 mL of samples was ultra-centrifuged at 14 100g for 20 minutes. Precipitate was diluted by 10 fold in EtOH and sonicated in an ultrasound bath at 50 °C for 20 minutes. The solutions were then analysed in triplicate using a UV-Visible spectrophotometer (Jasco V630). The acquisition parameters were: spectral range from 800 to 200 nm with a scan rate of 400 nm min<sup>-1</sup>, absorbance measurement at 665 nm for quantification and quartz cuvettes.

$$EE(\%) = \frac{\text{MB in precipitate}}{\text{Total added MB}} \times 100$$

## 2.6. Transmission electronic microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy (TEM and EDX)

6 µL of NPs were loaded on a carbon-coated copper grid for 8 min before drying. The samples were observed using a Hitachi H-7650 electron microscope (Tokyo, Japan). Energy-dispersive X-ray spectroscopy was performed using a TECNAI transmission electron microscope (Thermo Fisher Scientific, USA) coupled with Quantax-X-Flash SVE 6.

## 2.7. FT-IR spectroscopic study

Spectra of MB, diC16dT, DOTAU and MB-NPs were acquired with a Fourier Transform Infrared spectrometer (FT-IR) (UATR spectrum two, PerkinElmer, France) controlled by Spectrum software. Samples were placed on the ATR module and crushed to ensure a homogeneous distribution on the crystal. All spectra were recorded by averaging 8 accumulations with 8 cm<sup>-1</sup> resolution between 4000 and 450 cm<sup>-1</sup>. All spectra were obtained in the transmittance mode.

## 2.8. Stability studies

**Colloidal stability in NaCl and RPMI.** To assess MB/diC16dT NPs and MB-NPs stability in *in vitro* culture medium, a colloidal stability in NaCl and RPMI was performed. MB/diC16dT NPs and MB-NPs were diluted in a NaCl solution (62 mM of NaCl) and in RPMI media. The colloidal stability was assessed based on the size and PDI.

**Colloidal stability at 37 °C.** MB-NPs were stored at 37 °C in the dark for 28 days. Particle size and PDI modifications were monitored as previously described in triplicate.

**Bio-reduction assessment.** MB-NPs and MB solution (formulated in the same conditions as MB-NPs without nucleolipids) were diluted by 10 fold in distilled water. Ascorbic acid solution (5 mg mL<sup>-1</sup> final concentration) was added to 1.9 mL of diluted MB-NPs and MB solution. At this addition of ascorbic acid, bio-reduction kinetics were monitored in visible at 665 nm for 15 minutes by a UV-Vis spectrophotometer (Jasco V630). The percentage of remaining MB is based on absorbance at 665 nm and normalized on initial absorbance. All measurements were done in triplicate.

**Photosensitivity assessment.** MB-NPs and MB solution were diluted by 10 fold in distilled water. Each solution was exposed to visible light (18 watts) for 42 h. The absorption intensity was monitored at 0, 1, 3, 5, 8, 12, 17, 21, 37 and 42 h of exposure. At each time point, the absorbance value was compared at the initial absorption. Analyses were done in triplicate.

## 2.9. In vitro experiments

Parasites susceptibility to the different MB formulations compared to other anti-malarial drugs was assessed on referenced strains of *Plasmodium falciparum*: 3D7 and W2. The Indochina clone W2 is representative of the resistant strains of *P. falciparum*. Clone W2 is multi-drug resistant, including pyrimethamine, CQ and QN. Clone 3D7 is susceptible to CQ and QN but resistant to MQ. The resistance traits of both clones



were acquired naturally in the field and remain stable under culture conditions in the laboratory.<sup>25</sup>

A total of 100  $\mu\text{L}$  of parasitized erythrocytes (final parasitaemia at 0.5% and a final haematocrit at 1.5%) was aliquoted into pre-dosed 96-well plates used for standard antimalarial drugs: CQ, QN, MQ, DQ, LMF, DHA, AS, PPQ, PND and DOX as previously described and in extemporaneous aliquoted plates for the different MB formulations.<sup>26</sup> The plates were incubated for 72 h under controlled atmosphere at 85%  $\text{N}_2$ , 10%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  and 37 °C. The drug susceptibility assay was performed using the *P. falciparum* drug sensitivity assay SYBR green I procedure from WWARN, adapted to our experiment.<sup>27</sup>

All antimalarial drugs were first dissolved in methanol and then diluted in MilliQ water to reach final concentrations that ranged from 6 to 3149 nM for QN; from 1.9 to 1988 nM for DQ; from 1.5 to 392 nM for MQ; from 0.1 to 107 nM for DHA and AS; from 1.9 to 998 nM for PPQ and from 0.5 to 497  $\mu\text{M}$  for DOX. CQ and PND were diluted in MilliQ water for final concentrations ranging from 6 to 3231 nM and from 0.4 to 199 nM, respectively. LMF was diluted in EtOH to obtain final concentrations ranging from 0.6 to 310 nM.

MB was dissolved in distilled water to obtain MB solution. MB and MB-NPs solutions were then diluted in distilled water to final concentrations of MB ranging from 2 nM to 125 nM. For

the photosensitivity assessment, MB and MB-NPs solutions were exposed to visible light for 16 h then were diluted under the same conditions used for the MB solution without light exposure ranging from 2 nM to 125 nM. For the bio-reduction assessment, distilled water was replaced by ascorbic acid solution ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) to obtain the final concentrations of MB and MB-NPs.

Each batch of pre-dosed plates was validated using the CQ-resistant W2 strain in four independent experiments using conditions described below. The mean 50% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) values for the CQ-resistant W2 strain and the different batches used over 3 years were  $484 \pm 40$  nM for CQ,  $388 \pm 29$  nM for QN,  $97 \pm 18$  nM for DQ,  $1.0 \pm 0.4$  nM for LMF,  $26.3 \pm 3.1$  nM for MQ,  $54.1 \pm 5.4$  nM for PPQ,  $20.4 \pm 3.4$  nM for PND,  $2.5 \pm 0.4$  nM for DHA,  $1.5 \pm 0.3$  nM for AS, and  $11.5 \pm 1.9$   $\mu\text{M}$  for DOX. The polymorphic genetic markers *msp1* and *msp2* and microsatellite markers specific to *P. falciparum* were genotyped at least once a month to assess W2 clonality.<sup>28,29</sup>

All experiments were done in triplicate.

## 2.10. Statistical analysis of data

Data were statistically compared using the Student *t*-test (XLSTAT 2018, Addinsoft, France).  $\text{IC}_{50}$  were calculated using the following formula:

Open Access Article. Published on 17 June 2019. Downloaded on 7/15/2019 10:39:52 AM.  
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

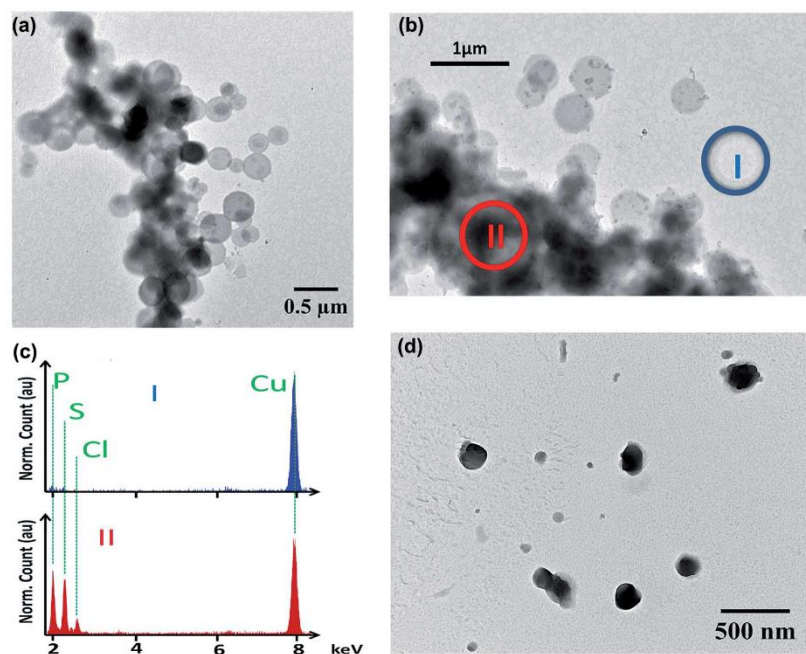


Fig. 2 (a) TEM image of MB/diC16dT NPs. (b) TEM image of MB/diC16dT NPs with EDX acquisition analysis outside (I, blue) or on nanoparticles (II, red). (c) EDX spectra at positions I & II. Green dashed lines emphasized the emission of phosphorus (corresponding to diC16dT), sulfur and chlorine (corresponding to MB). Both spectra were normalized with copper atom emission at 8 keV (due to TEM copper grid). (d) TEM image of MB-NPs.

$$RE(\%) = 100 - \frac{100C^\gamma}{C^2 + IC_{50}^\gamma}$$

where: "RE" is the relative effect of the parasite in %; "C" is the concentration of the tested drug; "IC<sub>50</sub>" is the drug concentration inhibiting 50% of parasite's activity; "γ" is sigmoidicity factor which expresses the steepness of the curve.<sup>30,31</sup> A difference between two groups or samples was considered significant with  $p < 0.05$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. NPs formulation and characterisation

MB is a tricyclic positively charged molecule. To formulate this active pharmaceutical ingredient as a SLN, the first step was to nanoprecipitate MB with diC16dT, a negatively charged nucleolipid.<sup>20,22,23</sup> The association of these two compounds formed spherical nano-objects (Fig. 2a) with a diameter of  $196.5 \pm 4.2$  nm measured by dynamic light scattering. This mean diameter was corroborated by TEM where particles size was around 200 nm (Fig. 2a). To check integrity of the nanoparticles observed in TEM, we performed EDX analysis (Fig. 2b). Phosphor (from diC16dT), sulfur and chlorine atoms (from MB) were present and co-localised confirming the composition of the nanoparticles (Fig. 2c). Nanoparticle population was monodispersed with a PDI of  $0.078 \pm 0.0078$  and negatively charged with a zeta potential of  $-39.2 \pm 2.7$  mV. The electrostatic forces enabled NPs repulsion for at least 2 weeks, acting as indicators of formulation's stability. However, in media containing ionic species such as NaCl (62 mM) or RPMI media, MB/diC16dT NPs were destabilized (size  $< 9$  nm and PDI  $> 0.4$ ) due to a competition between MB, nucleolipid and charged species in the medium (Fig. S1 and S2†).

To overcome this drawback, a stabilization of the NPs by the addition of DOTAU (molar ratio 4 : 1, diC16dT/DOTAU), a positively charged nucleolipid, was tested.<sup>20,22</sup> As for MB/diC16dT NPs, monodispersed nanoparticles were observed in distilled water (PDI:  $0.08 \pm 0.0086$ ) by dynamic light scattering. The size was decreased by 26.6 nm ( $169.9 \pm 6$  nm) ensuring the potential use of this DDS by parenteral route.<sup>32,33</sup> This mean diameter was consistent with TEM observations where particles size was around 180 nm (Fig. 2d). The addition of DOTAU did not impact the zeta potential ( $-34.87 \pm 1.38$  mV) indicating a reorganisation of the nucleolipids at the SLN external surface. In ionic media, the dilution of MB-NPs did not affect their size even if the dispersity was slightly increased (PDI of  $0.227 \pm 0.037$  and  $0.357 \pm 0.021$  in NaCl (62 mM) and RPMI media respectively). The combination of diC16dT and DOTAU improved colloidal stability in ionic media, indicating a stabilization of the structure (Fig. S1 and S2†).

Colloidal stability (size and PDI) of MB-NPs was evaluated at 37 °C using DLS (Fig. 3). NPs size and PDI remained stable, respectively under 200 nm and 0.2 at 37 °C allowing a potential use for *in vitro* and *in vivo* assays.

To further explore the organisation of the three compounds (MB, diC16dT and DOTAU) in the DDS, spectroscopic analyses were performed. Based on the UV-visible spectra (Fig. 4a), MB

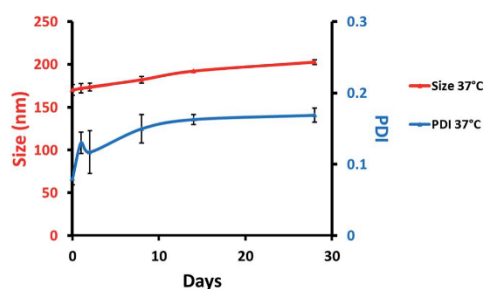


Fig. 3 Colloidal stability of MB-NPs over time with particles size (red, left scale) and PDI (blue, right scale) at 37 °C. The errors represent standard deviation of three independent experiments.

solution and MB nanoformulation were discriminated by the presence of an absorbance shoulder between 500 and 600 nm, a lower molar attenuation coefficient for MB-NPs. This change highlights the interaction between the three compounds stabilising the nano-object. Interactions involved are likely  $\pi$ -stacking, H-bonds, ionic as such change in UV-Vis spectra have been previously observed in presence of supramolecular assembly with MB,<sup>34</sup> and nucleolipids.<sup>35,36</sup> However, these interactions were disrupted by the addition of EtOH and sonication (50 °C for 20 min) (Fig. 4b) since no shoulder or lower absorbance were observed on the spectrum. In this condition, MB solution and MB-NPs are nearly identical in 500–700 nm visible region (blue vs. red trace, Fig. 4b). Loose interactions

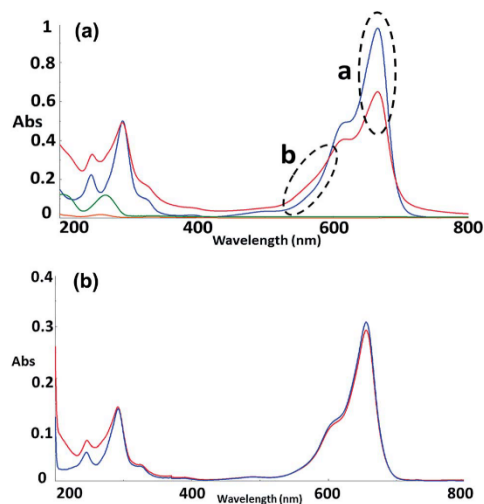


Fig. 4 (a) UV-Visible spectra in water of MB (blue), diC16dT (green), DOTAU (orange) and MB-NPs (red). "a" and "b" spectra variations.  $\lambda_{max} = 665$  nm. (b) UV-Visible spectra of MB solution (blue) and MB-NPs (red) solution after sonication in EtOH.  $\lambda_{max} = 655$  nm.





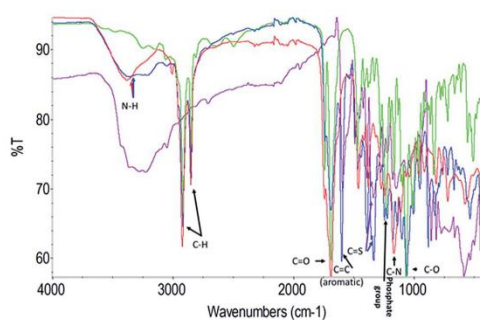


Fig. 5 Fourier-transform spectra infrared spectra of MB (violet), diC16dT (green), DOTAU (red) and MB-NPs (blue). A zoom of the region 2000–1000 wavenumbers is shown in Fig S3.†

Table 1 Chemical bond wavenumbers of MB, diC16dT, DOTAU and MB-NPs

Chemical bond (cm <sup>-1</sup> )	MB	diC16dT	DOTAU	MB-NPs
N-H	N/A	N/A	3380	3370
C-H	N/A	2916	2919	2920
		2850	2854	2850
C=O	N/A	1688	1692	1693
(Aromatic) C=C	1593	N/A	N/A	1601
C=S	1337	N/A	N/A	1334
Phosphate group	N/A	1231	N/A	1246
C-N	N/A	N/A	1166	1175
C-O	N/A	1066	1111	1061

were confirmed by IR study (Fig. 5 and Table 1). MB, diC16dT and DOTAU characteristic bands were identified confirming MB-NPs composition, consistent with ionic interactions in the SLN.

MB-NPs composition was analysed by HPLC. MB-NPs is made of MB, diC16dT and DOTAU with molar proportion of 5, 4 and 1, respectively. The different amounts found suggest that

the core of the MB-NPs is made of MB and diC16dT whereas DOTAU is likely involved in the coating of the MB-NPs.

The encapsulation efficiency was estimated at  $86.7 \pm 1.33\%$  and  $79.3 \pm 0.97\%$  for MB/diC16dT NPs and MB-NPs respectively. This difference was due to the competition between DOTAU and MB, both positively charged, leading to a partial release of MB in the medium.

### 3.2. Nucleolipid approach for MB protection

MB is known for its sensitivity to oxido-reduction leading to the formation of leucomethylene. To evaluate the impact of encapsulation on this aspect, a bio-reduction assessment was performed. Ascorbic acid was added to MB and MB-NPs solutions. The reduction kinetics and solutions colour were monitored (Fig. 6). The absorption kinetics of MB solution was 1.4 fold faster than the one of MB-NP solution with a reduction up to 13% after only 15 min (colourless solution). For MB-NPs solution, 22% of MB was preserved after 15 min of exposition to ascorbic acid (blue solution). Therefore formulations of MB

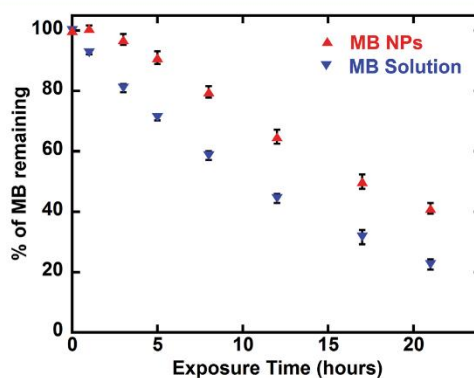


Fig. 7 Photosensitivity of MB solution (blue down-pointing triangle) and MB-NPs (red up-pointing triangle) over time based on visible absorption at 665 nm. Error bars represent standard deviation of three independent experiments.

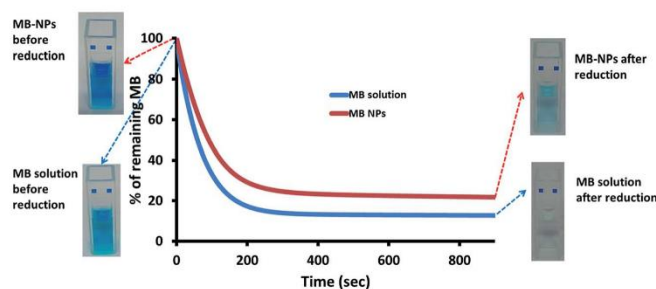


Fig. 6 Reduction kinetics of MB solution (blue) and MB-NPs (red) in presence of ascorbic acid based on visible absorption at 665 nm. The widths of the curve represent standard deviation of three independent experiments.



Table 2 Chemosusceptibility of the strains to MB solution MB-NPs with or without exposure to light or ascorbic acid expressed with mean half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>), standard deviation (SD) and confidence interval at 95% (CI)

			Drug (nM)					
			MB	MB-NPs	MB + light	MB-NPs + light	MB + Asc	MB-NP + Asc
Strain	3D7 <i>n</i> = 17	Mean IC <sub>50</sub>	5.23	3.67	15.9 <sup>a</sup>	24.2 <sup>a</sup>	5.12	7.93
		SD	2.18	1.93	9.16	5.43	3.19	1.87
		CI	[4.09–6.38]	[2.69–4.65]	[11.09–20.69]	[21.33–27.02]	[3.55–6.7]	[6.82–9.04]
	W2 <i>n</i> = 15	Mean IC <sub>50</sub>	12.56	9.38	26.50 <sup>a</sup>	21.49 <sup>a</sup>	6.61 <sup>a</sup>	6.88 <sup>a</sup>
		SD	2.39	5.11	9.13	6.3	1.38	1.8
		CI	[11.38–13.73]	[6.87–11.89]	[22.02–31]	[18.40–24.58]	[5.93–7.29]	[5.86–7.90]

<sup>a</sup> *p* value < 0.0001 versus MB.

with nucleolipids (diC16dT and DOTAU) provide protection against reduction.

Another advantage of drug encapsulation is the photoprotection of sensitive molecules.<sup>37</sup> A photosensitivity assessment was performed exposing MB and MB-NPs solutions to light for 42 h. As shown in Fig. 7, MB content decreased 1.6 fold faster for MB solutions compared to MB-NP samples (Student test, *p* < 0.05). The exposure time required to photobleach half of MB is faster (1.6 fold) in case of MB solution compared to MB-NP (10.5 h vs. 16.6 h, respectively). The association of nucleolipids with MB proved its partial protection against photosensitivity.

This approach represents a potentially new tool to improve MB stability (light and reduction), extend its half-life and thus increase its anti-malarial effect. This last point was explored by *in vitro* assays.

### 3.3. *In vitro* activity assessment

*In vitro* activity of MB-NPs were tested against the 3D7 *P. falciparum* (MQ resistant) or the W2 (CQ resistant and with QN reduced susceptibility) strains and compared to MB solution and standard antimalarial drugs. No significant differences were observed (*p* value > 0.05) and IC<sub>50</sub> for all drugs were in the expected range against each strain (Table 2). IC<sub>50</sub> of MB solution was 2 times higher against W2, compared to IC<sub>50</sub> of 3D7 strain. These IC<sub>50</sub> complied with usual IC<sub>50</sub> obtained from isolates collected from imported malaria to France (mean IC<sub>50</sub> of 15 nM for more than 600 isolates, personal data). In the case of MB-NPs, IC<sub>50</sub> values were not statistically different from MB solution even if they were systematically lower. The nanoformulation concept did not alter the drug activity and even suggested a potential improvement of MB efficiency. To further investigate the interest of NP *in vitro*, light exposition impact on MB efficiency would be studied. Indeed, as previously highlighted, the nanoformulation of MB as SLN enabled a slower degradation. However, on a biological level, MB (solution or NPs) efficiency was characterized by higher IC<sub>50</sub> values. MB in its oxidized form is taken up by the infected erythrocyte.<sup>38</sup> Ascorbic acid was used to change MB upon reduction to leucomethylene blue and to prevent entry of MB into the red blood cell. The antiplasmodial activity of MB in combination with ascorbic acid should be lower. However, our present data

showed that MB in combination with low concentrations of ascorbic acid was as active as MB used alone against the CQ-susceptible 3D7 strain (5.12 nM versus 5.23 nM) and more active against the CQ-resistant parasites W2 (6.61 nM versus 12.56 nM, *p* < 0.0001), suggesting a potentiation of the anti-malarial effect of the BM. The nanoformulation maintained this ability of potentiation. When used alone at the same low concentration, ascorbic acid had no effect on *P. falciparum* parasites but at high concentrations (above 100 μM), ascorbic acid improved the *in vitro* growth of *P. falciparum* parasites and antagonized the effects of some antimalarial drugs like artesunate and doxycycline, due to its properties as antioxidant and free radical scavenger.<sup>39</sup> New potential applications may be considered for the treatment of resistant strains by this approach.

## 4. Conclusion

This study is based on the hypothesis that a nanoformulation of Methylene Blue (MB) may have several advantages (such as IC<sub>50</sub> and stability improvement) compared to MB alone. To test this hypothesis, we develop a novel nanoformulation based on the association of MB with 2 nucleolipids, diC16dT and DOTAU. This assembly led to the formation of colloidal stable nanoparticles (MB-NPs) even in complex media; a promising result for MB-NPs stability in plasma. MB-NPs based on multimodal interaction (ionic,  $\pi$ -stacking, H-bonding) proved its efficiency to protect MB from redox phenomena due to chemical compounds or light. Higher storage stability and extending half-life could be expected by the use of this approach. Besides the fact that the nanoformulation did not alter MB activity, lower IC<sub>50</sub> values were observed for drug sensitive and resistant *P. falciparum* strains *in vitro*. Further *in vivo* investigations could be of great interest using the nucleolipid-based nanoparticles approach for drug protection, plasmatic half-life extension and potential synergistic effect, especially to overcome parasite resistance.

## Contribution

KK overall study design and experiments, manuscript writing; BA nanoparticles study design and experiments, manuscript



writing; MG *in vitro* study design and experiments; AG nanoparticles study experiments and manuscript writing; GV study design and manuscript writing; KG study design; JM *in vitro* study design and experiment; BP *in vitro* study design; PB study design; LG study design; PM overall study design and manuscript writing.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Provepharm Life Solutions (Marseille, France) for the donation of Proveblue®. KK is supported by a scholarship from the Fondation Pierre Fabre. The authors thank the Bordeaux Imaging Center (BIC) for the technical assistance during TEM observations and David Merino for analysis of NPs by chromatography.

## References

- 1 E. Y. Klein, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2013, **41**, 311–317.
- 2 G. Lu, M. Nagbanshi, N. Goldau, M. Mendes Jorge, P. Meissner, A. Jahn, F. P. Mockenhaupt and O. Müller, *BMC Med.*, 2018, **16**, 59.
- 3 G. F. Gensini, A. A. Conti and D. Lippi, *J. Infect.*, 2007, **54**, 221–224.
- 4 K. Krafts, E. Hempelmann and A. Skórska-Stania, *Parasitol. Res.*, 2012, **111**, 1–6.
- 5 R. H. Schirmer, B. Coulibaly, A. Stich, M. Scheiwein, H. Merkle, J. Eubel, K. Becker, H. Becher, O. Müller, T. Zich, W. Schiek and B. Kouyaté, *Redox Rep.*, 2003, **8**, 272–275.
- 6 R. H. Schirmer, H. Adler, M. Pickhardt and E. Mandelkow, *Neurobiol. Aging*, 2011, **32**, 2325.e7–2325.e16.
- 7 J. Dormoi, S. Briolant, C. Desgrouas and B. Pradines, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, **57**, 3412–3414.
- 8 M. Akoachere, K. Buchholz, E. Fischer, J. Burhenne, W. E. Haefeli, R. H. Schirmer and K. Becker, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, **49**, 4592–4597.
- 9 M. Bountogo, A. Zoungrana, B. Coulibaly, C. Klose, U. Mansmann, F. P. Mockenhaupt, J. Burhenne, G. Mikus, I. Walter-Sack, R. H. Schirmer, A. Sié, P. Meissner and O. Müller, *Trop. Med. Int. Health*, 2010, **15**, 713–717.
- 10 B. Coulibaly, M. Pritsch, M. Bountogo, P. E. Meissner, E. Nebie, C. Klose, M. Kieser, N. Berens-Riha, A. Wieser, S. B. Sirima, J. Breikreutz, R. H. Schirmer, A. Sie, F. P. Mockenhaupt, C. Drakeley, T. Bousema and O. Muller, *J. Infect. Dis.*, 2015, **211**, 689–697.
- 11 G. Garavito, S. Bertani, M. Quiliano, A. Valentin, I. Aldana and E. Deharo, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2012, **107**, 820–823.
- 12 A. Zoungrana, B. Coulibaly, A. Sié, I. Walter-Sack, F. P. Mockenhaupt, B. Kouyaté, R. H. Schirmer, C. Klose, U. Mansmann, P. Meissner and O. Müller, *PLoS One*, 2008, **3**, e1630.
- 13 A. Pascual, M. Henry, S. Briolant, S. Charras, E. Baret, R. Amalvict, E. Huyghues des Etages, M. Feraud, C. Rogier and B. Pradines, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, **55**, 2472–2474.
- 14 B. Fall, M. Madamet, S. Diawara, S. Briolant, K. A. Wade, G. Lo, A. Nakoulima, M. Fall, R. Bercion, M. B. Kounta, R. Amalvict, N. Benoit, M. W. Gueye, B. Diatta, B. Wade and B. Pradines, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2017, **50**, 155–158.
- 15 J. Dormoi, A. Pascual, S. Briolant, R. Amalvict, S. Charras, E. Baret, E. Huyghues des Etages, M. Feraud and B. Pradines, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, **56**, 3467–3469.
- 16 B. Coulibaly, A. Zoungrana, F. P. Mockenhaupt, R. H. Schirmer, C. Klose, U. Mansmann, P. E. Meissner and O. Müller, *PLoS One*, 2009, **4**, e5318.
- 17 P. E. Meissner, G. Mandi, B. Coulibaly, S. Witte, T. Tapsoba, U. Mansmann, J. Rengelshausen, W. Schiek, A. Jahn, I. Walter-Sack, G. Mikus, J. Burhenne, K.-D. Riedel, R. H. Schirmer, B. Kouyaté and O. Müller, *Malar. J.*, 2006, **5**, 84.
- 18 I. Walter-Sack, J. Rengelshausen, H. Oberwittler, J. Burhenne, O. Mueller, P. Meissner and G. Mikus, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2009, **65**, 179–189.
- 19 P. Barthélémy, *C. R. Chim.*, 2009, **12**, 171–179.
- 20 S. Khiati, D. Luvino, K. Oumzil, B. Chauffert, M. Camplo and P. Barthélémy, *ACS Nano*, 2011, **5**, 8649–8655.
- 21 P. Chabaud, M. Camplo, D. Payet, G. Serin, L. Moreau, P. Barthélémy and M. W. Grinstaff, *Bioconjugate Chem.*, 2006, **17**, 466–472.
- 22 K. Oumzil, M. A. Ramin, C. Lorenzato, A. Hémadou, J. Laroche, M. J. Jacobin-Valat, S. Mornet, C.-E. Roy, T. Kauss, K. Gaudin, G. Clofent-Sanchez and P. Barthélémy, *Bioconjugate Chem.*, 2016, **27**, 569–575.
- 23 S. Benizri, L. Ferey, B. Alies, N. Mebarek, G. Vacher, A. Appavoo, C. Staedel, K. Gaudin and P. Barthélémy, *Nanoscale Res. Lett.*, 2018, **13**, 17.
- 24 S. Khiati, N. Pierre, S. Andriamanarivo, M. W. Grinstaff, N. Arazam, F. Nallet, L. Navailles and P. Barthélémy, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 1765–1772.
- 25 P. K. Rathod, T. McErlean and P.-C. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**, 9389–9393.
- 26 M. Gendrot, F. T. Foguim, M. G. Robert, R. Amalvict, J. Mosnier, N. Benoit, M. Madamet and B. Pradines, *Malar. J.*, DOI: 10.1186/s12936-018-2252-2.
- 27 *In vitro* Module, WWARN 2011, *P. falciparum* drug sensitivity assay using SYBR Green I Assay Technique WWARN Procedure.
- 28 H. Bogreau, F. Renaud, H. Bouchiba, P. Durand, S.-B. Assi, M.-C. Henry, E. Garnotel, B. Pradines, T. Fusai, B. Wade, E. Adehossi, P. Parola, M. A. Kamil, O. Puijalon and C. Rogier, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, **74**, 953–959.
- 29 M. Henry, I. Diallo, J. Bordes, S. Ka, B. Pradines, B. Diatta, P. S. M'Baye, M. Sane, M. Thiam, P. M. Gueye, B. Wade, J. E. Touze, J.-M. Debonne, C. Rogier and T. Fusai, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, **75**, 146–151.
- 30 H. Kaddouri, S. Nakache, S. Houzé, F. Mentré and J. L. Bras, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, **50**, 3343–3349.



- 31 H. Le Nagard, C. Vincent, F. Mentré and J. Le Bras, *Comput. Methods Programs Biomed.*, 2011, **104**, 10–18.
- 32 A. P. Nayak, W. Tiyaboonchai, S. Patankar, B. Madhusudhan and E. B. Souto, *Colloids Surf., B*, 2010, **81**, 263–273.
- 33 N. P. Aditya, G. Chimote, K. Gunalan, R. Banerjee, S. Patankar and B. Madhusudhan, *Exp. Parasitol.*, 2012, **131**, 292–299.
- 34 A. Ghanadzadeh, A. Zeini, A. Kashef and M. Moghadam, *J. Mol. Liq.*, 2008, **138**, 100–106.
- 35 B. Alies, M. A. Ouelhazi, A. Patwa, J. Verget, L. Navailles, V. Desvergnès and P. Barthélémy, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 4888–4894.
- 36 B. Alies, M. A. Ouelhazi, A. Noireau, K. Gaudin and P. Barthélémy, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 1692–1695.
- 37 G. Ioele, M. D. Luca, A. Garofalo and G. Ragno, *Drug Delivery*, 2017, **24**, 33–44.
- 38 O. Blank, E. Davioud-Charvet and M. Elhabiri, *Antioxid. Redox Signaling*, 2012, **17**, 544–554.
- 39 B. Pradines, J. M. Rolain, F. Ramiandrasoa, T. Fusai, J. Mosnier, C. Rogier, W. Daries, E. Baret, G. Kunesch, J. Le Bras and D. Parzy, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, **50**, 177–187.

Open Access Article. Published on 17 June 2019. Downloaded on 7/15/2019 10:39:52 AM.  
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.



## Références

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H., 2006. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006 Supplementary Non-Thematic Collection 58, 1688–1713. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>
- Aditya, N.P., Chimote, G., Gunalan, K., Banerjee, R., Patankar, S., Madhusudhan, B., 2012. Curcuminoids-loaded liposomes in combination with arteether protects against *Plasmodium berghei* infection in mice. *Experimental Parasitology* 131, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.04.010>
- Akoachere, M., Buchholz, K., Fischer, E., Burhenne, J., Haefeli, W.E., Schirmer, R.H., Becker, K., 2005. In Vitro Assessment of Methylene Blue on Chloroquine-Sensitive and -Resistant *Plasmodium falciparum* Strains Reveals Synergistic Action with Artemisinin. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 4592–4597. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4592-4597.2005>
- Balasubramaniam, J., Bindu, K., Rao, V.U., Ray, D., Haldar, R., Brzeczko, A.W., 2008. Effect of Superdisintegrants on Dissolution of Cationic Drugs. *Dissolution Technol.* 15, 18–25. <https://doi.org/10.14227/DT150208P18>
- Basu, M., Sinha, A.K., Pradhan, M., Sarkar, S., Pal, A., Mondal, C., Pal, T., 2012. Methylene Blue–Cu<sub>2</sub>O Reaction Made Easy in Acidic Medium. *The Journal of Physical Chemistry C* 116, 25741–25747. <https://doi.org/10.1021/jp308095h>
- Benizri, S., 2018. Synthèses et études d'oligonucléotides amphiphiles à visée thérapeutique.
- Benizri, S., Ferey, L., Alies, B., Mebarek, N., Vacher, G., Appavoo, A., Staedel, C., Gaudin, K., Barthélémy, P., 2018. Nucleoside-Lipid-Based Nanocarriers for Sorafenib Delivery. *Nanoscale Research Letters* 13, 17. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2420-2>
- Berneth, H., 2008. Azine Dyes, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. American Cancer Society. [https://doi.org/10.1002/14356007.a03\\_213.pub3](https://doi.org/10.1002/14356007.a03_213.pub3)
- Bizmark, N., Ioannidis, M.A., 2015. Effects of Ionic Strength on the Colloidal Stability and Interfacial Assembly of Hydrophobic Ethyl Cellulose Nanoparticles. *Langmuir* 31, 9282–9289. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01857>
- Blank, O., Davioud-Charvet, E., Elhabiri, M., 2012. Interactions of the Antimalarial Drug Methylene Blue with Methemoglobin and Heme Targets in *Plasmodium falciparum*: A Physico-Biochemical Study. *Antioxidants & redox signaling* 17, 544–54. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4239>
- Bogdani, E., 2011. Étude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique.
- Borrmann, S., Sasi, P., Mwai, L., Bashraheil, M., Abdallah, A., Muriithi, S., Frühauf, H., Schaub, B., Pfeil, J., Peshu, J., Hanpithakpong, W., Rippert, A., Juma, E., Tsofa, B., Mosobo, M., Lowe, B., Osier, F., Fegan, G., Lindegårdh, N., Nzila, A., Peshu, N., Mackinnon, M., Marsh, K., 2011. Declining Responsiveness of *Plasmodium falciparum* Infections to Artemisinin-Based Combination Treatments on the Kenyan Coast. *PLOS ONE* 6, e26005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026005>
- Bountogo, M., Zoungrana, A., Coulibaly, B., Klose, C., Mansmann, U., Mockenhaupt, F.P., Burhenne, J., Mikus, G., Walter-Sack, I., Schirmer, R.H., Sié, A., Meissner, P., Müller, O., 2010. Efficacy of methylene blue monotherapy in semi-immune adults with uncomplicated *falciparum* malaria: a controlled trial in Burkina Faso. *Trop. Med. Int. Health* 15, 713–717. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02526.x>
- Briolant, S., Pradines, B., Basco, L.K., 2017. Place de la primaquine dans la lutte contre le paludisme en Afrique francophone. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 110, 198–206. <https://doi.org/10.1007/s13149-017-0556-z>

- Carpenter, J.F., Pikal, M.J., Chang, B.S., Randolph, T.W., 1997. Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advice. *Pharm Res* 14, 969–975. <https://doi.org/10.1023/A:1012180707283>
- Castañeda-Gill, J., Ranjan, A., Vishwanatha, J., 2017. Development and Characterization of Methylene Blue Oleate Salt-Loaded Polymeric Nanoparticles and their Potential Application as a Treatment for Glioblastoma. *J Nanomed Nanotechnol* 8. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000449>
- Cavatur, R.K., Vemuri, N.M., Pyne, A., Chrzan, Z., Toledo-Velasquez, D., Suryanarayanan, R., 2002. Crystallization Behavior of Mannitol in Frozen Aqueous Solutions. *Pharm Res* 19, 894–900. <https://doi.org/10.1023/A:1016177404647>
- Cawein, M., Behlen, C.H., Lappat, E.J., Cohn, J.E., 1964. Hereditary Diaphorase Deficiency and Methemoglobinemia. *Arch Intern Med* 113, 578–585. <https://doi.org/10.1001/archinte.1964.00280100086014>
- Chabaud, P., Camplo, M., Payet, D., Serin, G., Moreau, L., Barthélémy, P., Grinstaff, M.W., 2006. Cationic nucleoside lipids for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 17, 466–472. <https://doi.org/10.1021/bc050162q>
- Chadha, R., Gupta, S., Pathak, N., 2012. Artesunate-loaded chitosan/lecithin nanoparticles: Preparation, characterization, and in vivo studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 38, 1538–1546. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.658812>
- Cole, G., Aulton, M.E., Hogan, J.E., 1995. *Pharmaceutical coating technology*. London Taylor & Francis.
- Coleman, M.D., Coleman, N.A., 1996. Drug-Induced Methaemoglobinaemia. *Drug-Safety* 14, 394–405. <https://doi.org/10.2165/00002018-199614060-00005>
- Collectif, Levacher, E., 2016. *PHI 41 Pharmacotechnie industrielle, 3e édition*. ed. Institut des Métiers et des Technologies, Tours (38-40 Avenue Marcel Dassault).
- Coulibaly, B., Pritsch, M., Bountogo, M., Meissner, P.E., Nebie, E., Klose, C., Kieser, M., Berens-Riha, N., Wieser, A., Sirima, S.B., Breitkreutz, J., Schirmer, R.H., Sie, A., Mockenhaupt, F.P., Drakeley, C., Bousema, T., Muller, O., 2015. Efficacy and Safety of Triple Combination Therapy With Artesunate-Amodiaquine-Methylene Blue for Falciparum Malaria in Children: A Randomized Controlled Trial in Burkina Faso. *Journal of Infectious Diseases* 211, 689–697. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu540>
- Coulibaly, B., Zoungrana, A., Mockenhaupt, F.P., Schirmer, R.H., Klose, C., Mansmann, U., Meissner, P.E., Müller, O., 2009. Strong Gametocytocidal Effect of Methylene Blue-Based Combination Therapy against Falciparum Malaria: A Randomised Controlled Trial. *PLoS ONE* 4, e5318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005318>
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Chapman, D., 1984. Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science* 223, 701–703. <https://doi.org/10.1126/science.223.4637.701>
- Cuq, B., Fatah, N., Saleh, K., Falk, V., Marchal, P., Sadtler, V., Gaiani, C., 2013. Mise en forme des poudres par compression : Influence du procédé et de la formulation sur la maîtrise des propriétés d'usage 142.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., Mozafari, M.R., 2018. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 10. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- de Barros, A.B., Tsourkas, A., Saboury, B., Cardoso, V.N., Alavi, A., 2012. Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. *EJNMMI Res* 2, 39. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-2-39>
- Dewan, I., Jahan, S.A., Gazi, M., Nath, J., Hasan, M.A., 2015. DESIGN, PREPARATION, EVALUATION, COMPATIBILITY AND IN- VITRO STUDIES OF NAPROXEN

AND ESOMEPRAZOLE MULTILAYER TABLETS: LAYER BY LAYER TABLET TECHNOLOGY. *World Journal of Pharmaceutical Research* 4, 21.

- Dicko, A., Roh, M.E., Diawara, H., Mahamar, A., Soumare, H.M., Lanke, K., Bradley, J., Sanogo, K., Kone, D.T., Diarra, K., Keita, S., Issiaka, D., Traore, S.F., McCulloch, C., Stone, W.J.R., Hwang, J., Müller, O., Brown, J.M., Srinivasan, V., Drakeley, C., Gosling, R., Chen, I., Bousema, T., 2018. Efficacy and safety of primaquine and methylene blue for prevention of *Plasmodium falciparum* transmission in Mali: a phase 2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases* 0. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30044-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30044-6)
- Dormoi, J., Briolant, S., Desgrouas, C., Pradines, B., 2013a. Impact of methylene blue and atorvastatin combination therapy on the apparition of cerebral malaria in a murine model. *Malar J* 12, 127. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-127>
- Dormoi, J., Briolant, S., Desgrouas, C., Pradines, B., 2013b. Efficacy of Proveblue (Methylene Blue) in an Experimental Cerebral Malaria Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 3412–3414. <https://doi.org/10.1128/AAC.02381-12>
- Dormoi, J., Pascual, A., Briolant, S., Amalvict, R., Charras, S., Baret, E., Huyghues des Etages, E., Feraud, M., Pradines, B., 2012. Proveblue (Methylene Blue) as an Antimalarial Agent: In Vitro Synergy with Dihydroartemisinin and Atorvastatin. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 3467–3469. <https://doi.org/10.1128/AAC.06073-11>
- Dormoi, J., Pradines, B., 2013. Dose Responses of Proveblue Methylene Blue in an Experimental Murine Cerebral Malaria Model. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 4080–4081. <https://doi.org/10.1128/AAC.00634-13>
- Duclaux, J., 1940. Le mouvement brownien et la formule d'Einstein. *J. Phys. Radium* 1, 81–84. <https://doi.org/10.1051/jphysrad:019400010308100>
- EDQM, 2018. Pharmacopée européenne : 3 volumes, Suppléments 9.6, 9.7, 9.8, Edition 2019. ed. Conseil de l'Europe, Place of publication not identified.
- Ehrlich, P., 1881. Ueber das Methylenblau und seine klinisch-bakterioskopische Verwerthung. *Z klin Med* 2, 710–713.
- Eyjolfsson, R., 2015. Chapter One - Introduction, in: Eyjolfsson, R. (Ed.), *Design and Manufacture of Pharmaceutical Tablets*. Academic Press, Boston, pp. 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802182-8.00001-5>
- Fairhurst, R.M., Dondorp, A.M., 2016. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Microbiol Spectr* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0013-2016>
- Faraji, A.H., Wipf, P., 2009. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 2950–2962. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.043>
- Floyd, R.A., Schneider, J.E., Dittmer, D.P., 2004. Methylene blue photoinactivation of RNA viruses. *Antiviral Res.* 61, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.11.004>
- Francis, S.E., Banerjee, R., Goldberg, D.E., 1997. Biosynthesis and Maturation of the Malaria Aspartic Hemoglobins Plasmepsins I and II. *J. Biol. Chem.* 272, 14961–14968. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14961>
- Francis, S.E., Gluzman, I.Y., Oksman, A., Banerjee, D., Goldberg, D.E., 1996. Characterization of native falcipain, an enzyme involved in *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 83, 189–200. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02772-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02772-7)
- Ganiyu, K., Akinleye, M., Tayo, F., 2012. A study of the effect of ascorbic acid on the antiplasmodial activity of artemether in *Plasmodium Berghei* infected mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2, 96–100. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2614>
- Garavito, G., 2007. Etude pharmacologique expérimentale de l'activité antipaludique d'un composé de synthèse : le chlorure de methylthionium (thesis). Toulouse 3.

- Ghebre-Sellassie, I., 1994. Multiparticulate oral drug delivery. Informa healthcare ; CRC Press, New York; Boca Raton, Fla.
- Gissot, A., Camplo, M., Grinstaff, M.W., Barthélémy, P., 2008. Nucleoside, nucleotide and oligonucleotide based amphiphiles. *Org Biomol Chem* 6, 1324. <https://doi.org/10.1039/b719280k>
- Green, J.L., Angell, C.A., 1989. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *J. Phys. Chem.* 93, 2880–2882. <https://doi.org/10.1021/j100345a006>
- Grimmond, T.R., Donovan, K.O., Riley, I.D., 1976. Chloroquine resistant malaria in Papua New Guinea. *P N G Med J* 19, 184–185.
- Gutiérrez-Valenzuela, C.A., Rodríguez-Córdova, R., Hernández-Giottonini, Y., Guerrero-Germán, P., Lucero-Acuña, A., 2017. Methylene Blue Loaded PLGA Nanoparticles: Combined Emulsion, Drug Release Analysis and Photodynamic Activity. *Microscopy and Microanalysis* 23, 1212–1213. <https://doi.org/10.1017/S1431927617006729>
- Guttman, P., Ehrlich, P., 1891. Ueber die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berliner klinische Wochenschrift* 28, 953–956.
- Hamoud, A., 2018. Conception et synthèse bioinspirées de nucléolipides pour l'élaboration de biomatériaux (thesis). Bordeaux.
- Harinasuta, T., Suntharasamai, P., Viravan, C., 1965. CHLOROQUINE-RESISTANT FALCIPARUM MALARIA IN THAILAND. *The Lancet* 286, 657–660. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(65\)90395-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(65)90395-8)
- Hedoux, A., 2013. Lyophilisation de produits pharmaceutiques et biopharmaceutiques 19.
- Hu, L., Tang, X., Cui, F., 2004. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56, 1527–1535. <https://doi.org/10.1211/0022357044959>
- Institute of Medicine, Arrow, K.J., Panosian, C., Gelband, H., 2004. A Brief History of Malaria. National Academies Press (US).
- Ioele, G., Luca, M.D., Garofalo, A., Ragno, G., 2017. Photosensitive drugs: a review on their photoprotection by liposomes and cyclodextrins. *Drug Delivery* 24, 33–44. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1386733>
- Isono, K., Uramoto, M., Kusakabe, H., Kimura, K.-I., Izaki, K., Nelson, C.C., McCloskey, J.A., 1985. LIPOSIDOMYCINS: NOVEL NUCLEOSIDE ANTIBIOTICS WHICH INHIBIT BACTERIAL PEPTIDOGLYCAN SYNTHESIS. *J. Antibiot.* 38, 1617–1621. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.38.1617>
- Jannat, E., Arif, A.A., Hasan, M.M., Zarziz, A.B., Rashid, H.A., 2016. Granulation techniques & its updated modules. *The Pharma Innovation Journal* 5, 134–141.
- Jiang, S., Nail, S.L., 1998. Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45, 249–257. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00007-1)
- Jin, Y., Xin, R., Ai, P., Chen, D., 2008. Self-assembled drug delivery systems: 2. Cholesteryl derivatives of antiviral nucleoside analogues: Synthesis, properties and the vesicle formation. *International Journal of Pharmaceutics* 350, 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.037>
- Jinwal, U.K., Groshev, A., Zhang, J., Sutariya, A.G. and V.B., 2014. Preparation and Characterization of Methylene blue Nanoparticles for Alzheimer's Disease and Other Tauopathies [WWW Document]. *Current Drug Delivery*. URL <http://www.eurekaselect.com/117929/article> (accessed 7.8.19).
- Joseph, E., Singhvi, G., 2019. Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier, in: Grumezescu, A.M. (Ed.), *Nanomaterials for Drug Delivery and*



- Therapy. William Andrew Publishing, pp. 91–116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00007-2>
- Juffermans, N.P., Vervloet, M.G., Daemen-Gubbels, C.R.G., Binnekade, J.M., de Jong, M., Groeneveld, A.B.J., 2010. A dose-finding study of methylene blue to inhibit nitric oxide actions in the hemodynamics of human septic shock. *Nitric Oxide* 22, 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.01.006>
- Kadian, S.S., Harikumar, S.L., 2009. Eudragit and its Pharmaceutical Significance 16.
- Kasperek, R., Zimmer, L., Zun, M., Dwornicka, D., Wojciechowska, K., Poleszak, E., 2016. The application of povidone in the preparation of modified release tablets. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* 29, 71–78. <https://doi.org/10.1515/cipms-2016-0015>
- Khiati, S., Luvino, D., Oumzil, K., Chauffert, B., Camplo, M., Barthélémy, P., 2011. Nucleoside–Lipid-Based Nanoparticles for Cisplatin Delivery. *ACS Nano* 5, 8649–8655. <https://doi.org/10.1021/nn202291k>
- Khiati, S., Pierre, N., Andriamanarivo, S., Grinstaff, M.W., Arazam, N., Nallet, F., Navailles, L., Barthélémy, P., 2009. Anionic Nucleotide–Lipids for In Vitro DNA Transfection. *Bioconjugate Chem.* 20, 1765–1772. <https://doi.org/10.1021/bc900163s>
- Kindhauser, M.K., Organization, W.H., 2003. Communicable diseases 2002 : global defence against the infectious disease threat. World Health Organization.
- Kulkarni, S.A., Feng, S.-S., 2013. Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Pharm Res* 30, 2512–2522. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0958-3>
- Kumar, V., 2014. In vitro stability studies on gold nanoparticles with different stabilizing agents. *International Journal of Current Science* 11, E 84-93.
- Küpfer, A., Aeschlimann, C., Wermuth, B., Cerny, T., 1994. Prophylaxis and reversal of ifosfamide encephalopathy with methylene-blue. *The Lancet* 343, 763–764. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)91839-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)91839-2)
- Larsen, B.S., Skytte, J., Svagan, A.J., Meng-Lund, H., Grohgan, H., Löbmann, K., 2019. Using dextran of different molecular weights to achieve faster freeze-drying and improved storage stability of lactate dehydrogenase. *Pharmaceutical Development and Technology* 24, 323–328. <https://doi.org/10.1080/10837450.2018.1479866>
- Le Hir, A., Chaumeil, J.-C., Brossard, D., Charrueau, C., Crauste-Manciet, S., 2016. *Pharmacie galénique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments*, 10e édition. ed. Elsevier Masson.
- Levina, M., C.R., C., 2005. The Effect of Core Design and Formulation on the Quality of Film Coated Tablets. *Pharmaceutical Technology Europe* 4, 29–37.
- Levis, S.R., Deasy, P.B., 2001. Pharmaceutical applications of size reduced grades of surfactant co-processed microcrystalline cellulose. *International Journal of Pharmaceutics* 230, 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00843-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00843-2)
- Liu, J., Gong, T., Wang, C., Zhong, Z., Zhang, Z., 2007. Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: Preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 340, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.03.009>
- Lobel, H.O., Campbell, C.C., Schwartz, I.K., Roberts, J.M., 1985. Recent Trends in the Importation of Malaria Caused by *Plasmodium falciparum* into the United States from Africa. *J Infect Dis* 152, 613–617. <https://doi.org/10.1093/infdis/152.3.613>
- Lu, G., Nagbanshi, M., Goldau, N., Mendes Jorge, M., Meissner, P., Jahn, A., Mockenhaupt, F.P., Müller, O., 2018. Efficacy and safety of methylene blue in the treatment of malaria: a systematic review. *BMC Med* 16. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1045-3>
- Malvern Instruments (Ed.), 2011. Dynamic light scattering common terms defined 6.

- Mandi, G., Witte, S., Meissner, P., Coulibaly, B., Mansmann, U., Rengelshausen, J., Schiek, W., Jahn, A., Sanon, M., Wüst, K., Walter-Sack, I., Mikus, G., Burhenne, J., Riedel, K.-D., Schirmer, H., Kouyaté, B., Müller, O., 2005. Safety of the combination of chloroquine and methylene blue in healthy adult men with G6PD deficiency from rural Burkina Faso. *Trop. Med. Int. Health* 10, 32–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01356.x>
- Mansouri, A., Lurie, A.A., 1993. Concise review: methemoglobinemia. *Am. J. Hematol.* 42, 7–12.
- Marshall, D.G., 1920. THE " TOXICITY " OF METHYLENE-BLUE. *The Lancet* 195, 1334. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)92632-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)92632-1)
- Marwaha, N., 2016. Ascorbic acid co-administration with artemisinin based combination therapies in falciparum malaria. *Indian J Med Res* 143, 539–541. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.187100>
- Meissner, P.E., Mandi, G., Coulibaly, B., Witte, S., Tapsoba, T., Mansmann, U., Rengelshausen, J., Schiek, W., Jahn, A., Walter-Sack, I., Mikus, G., Burhenne, J., Riedel, K.-D., Schirmer, R.H., Kouyaté, B., Müller, O., 2006. Methylene blue for malaria in Africa: results from a dose-finding study in combination with chloroquine. *Malar. J.* 5, 84. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-84>
- Meissner, P.E., Mandi, G., Witte, S., Coulibaly, B., Mansmann, U., Rengelshausen, J., Schiek, W., Jahn, A., Sanon, M., Tapsoba, T., Walter-Sack, I., Mikus, G., Burhenne, J., Riedel, K.-D., Schirmer, H., Kouyaté, B., Müller, O., 2005. Safety of the methylene blue plus chloroquine combination in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in young children of Burkina Faso [ISRCTN27290841]. *Malar. J.* 4, 45. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-4-45>
- Mendes Jorge, M., Ouermi, L., Meissner, P., Compaoré, G., Coulibaly, B., Nebie, E., Krisam, J., Klose, C., Kieser, M., Jahn, A., Lu, G., D'Alessandro, U., Sié, A., Mockenhaupt, F.P., Müller, O., 2019. Safety and efficacy of artesunate-amodiaquine combined with either methylene blue or primaquine in children with falciparum malaria in Burkina Faso: A randomized controlled trial. *PLoS ONE* 14, e0222993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222993>
- Miyachi, M., Onishi, H., Yumoto, T., Machida, Y., 2009. Preparation of medicinal carbon tablets by modified wet compression method. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 35, 1333–1338. <https://doi.org/10.3109/03639040902902419>
- Moore, D.V., Lanier, J.E., 1961. Observations on two Plasmodium falciparum infections with an abnormal response to chloroquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10, 5–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1961.10.5>
- Moreau, L., Barthélémy, P., El Maataoui, M., Grinstaff, M.W., 2004. Supramolecular Assemblies of Nucleoside Phosphocholine Amphiphiles. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 7533–7539. <https://doi.org/10.1021/ja039597j>
- Morel, S., Ugazio, E., Cavalli, R., Gasco, M.R., 1996. Thymopentin in solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 132, 259–261. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04388-8](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04388-8)
- Müller, O., Lu, G., Jahn, A., Mockenhaupt, F.-P., 2019. How worthwhile is methylene blue as a treatment of malaria? *Expert Review of Anti-infective Therapy* 17, 471–473. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1634545>
- Nayak, A.P., Tiyaboonchai, W., Patankar, S., Madhusudhan, B., Souto, E.B., 2010. Curcuminoids-loaded lipid nanoparticles: Novel approach towards malaria treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81, 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.020>

- Noedl, H., Se, Y., Schaecher, K., Smith, B.L., Socheat, D., Fukuda, M.M., 2008. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *New England Journal of Medicine* 359, 2619–2620. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0805011>
- Ohr, C., Li, Q., Obaldia, N., Im-erbsin, R., Xie, L., Berman, J., 2014. Efficacy of intravenous methylene blue, intravenous artesunate, and their combination in preclinical models of malaria. *Malar J* 13. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-415>
- O’Leary, J.L., Petty, J., Harris, A.B., Inukai, J., 1968. Supravital staining of mammalian brain with intra-arterial methylene blue followed by pressurized oxygen. *Stain Technol* 43, 197–201.
- Olliaro, P.L., Goldberg, D.E., 1995. The Plasmodium digestive Vacuole: Metabolic Headquarters and Choice Drug Target. *Parasitology Today* 11, 294–297. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(95\)80042-5](https://doi.org/10.1016/0169-4758(95)80042-5)
- Omwoyo, W.N., Melariri, P., Gathirwa, J.W., Oloo, F., Mahanga, G.M., Kalombo, L., Ogutu, B., Swai, H., 2016. Development, characterization and antimalarial efficacy of dihydroartemisinin loaded solid lipid nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12, 801–809. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.017>
- Omwoyo, W.N., Ogutu, B., Oloo, F., Swai, H., Kalombo, L., Melariri, P., Mahanga, G.M., Gathirwa, J.W., 2014. Preparation, characterization, and optimization of primaquine-loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 9, 3865–3874. <https://doi.org/10.2147/IJN.S62630>
- Organisation mondiale de la santé, 2018. World malaria report 2018.
- Organisation mondiale de la santé, 2015. Guidelines for the treatment of malaria.
- Oumzil, K., Khiati, S., Camplo, M., Koquely, M., Chuttani, K., Chaturvedi, S., Mishra, A.K., Barthélémy, P., 2014. Nucleolipids as building blocks for the synthesis of 99mTc-labeled nanoparticles functionalized with folic acid. *New J. Chem.* 38, 5240–5246. <https://doi.org/10.1039/C4NJ00559G>
- Oumzil, K., Ramin, M.A., Lorenzato, C., Hémadou, A., Laroche, J., Jacobin-Valat, M.J., Mornet, S., Roy, C.-E., Kauss, T., Gaudin, K., Clofent-Sanchez, G., Barthélémy, P., 2016. Solid Lipid Nanoparticles for Image-Guided Therapy of Atherosclerosis. *Bioconjugate Chem.* 27, 569–575. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00590>
- Oz, M., Lorke, D.E., Hasan, M., Petroianu, G.A., 2011. Cellular and Molecular Actions of Methylene Blue in the Nervous System. *Med Res Rev* 31, 93–117. <https://doi.org/10.1002/med.20177>
- Oz, M., Lorke, D.E., Petroianu, G.A., 2009. Methylene blue and Alzheimer’s disease. *Biochem. Pharmacol.* 78, 927–932. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.034>
- Pandithage, R., 2013. Brief Introduction to Contrasting for EM Sample Preparation.
- Parashar, D., P, A.N., R, M.R.S., 2016. Development of artemether and lumefantrine co-loaded nanostructured lipid carriers: physicochemical characterization and in vivo antimalarial activity. *Drug Delivery* 23, 123–129. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.905883>
- Pascual, A., Henry, M., Briolant, S., Charras, S., Baret, E., Amalvict, R., Huyghues des Etages, E., Feraud, M., Rogier, C., Pradines, B., 2011. In Vitro Activity of Proveblue (Methylene Blue) on Plasmodium falciparum Strains Resistant to Standard Antimalarial Drugs ▽. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 2472–2474. <https://doi.org/10.1128/AAC.01466-10>
- Pathak, Y., Thassu, D., 2009. Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization.
- Paul, P., Mati, S.S., Bhattacharya, S.C., Kumar, G.S., 2017. Exploring the interaction of phenothiazinium dyes methylene blue, new methylene blue, azure A and azure B with tRNAPhe: spectroscopic, thermodynamic, voltammetric and molecular modeling approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 6636–6653. <https://doi.org/10.1039/C6CP07888E>

- Peter, C., Hongwan, D., Küpfer, A., Lauterburg, B.H., 2000. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56, 247–250.
- Pikal, M.J., Shah, S., Roy, M.L., Putman, R., 1990. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *International Journal of Pharmaceutics* 60, 203–207. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90074-E](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90074-E)
- Plouffe, D.M., Wree, M., Du, A.Y., Meister, S., Li, F., Patra, K., Lubar, A., Okitsu, S.L., Flannery, E.L., Kato, N., Tanaseichuk, O., Comer, E., Zhou, B., Kuhen, K., Zhou, Y., Leroy, D., Schreiber, S.L., Scherer, C.A., Vinetz, J., Winzeler, E.A., 2016. High-Throughput Assay and Discovery of Small Molecules that Interrupt Malaria Transmission. *Cell Host Microbe* 19, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.001>
- Prabhu, P., Suryavanshi, S., Pathak, S., Patra, A., Sharma, S., Patravale, V., 2016. Nanostructured lipid carriers of artemether–lumefantrine combination for intravenous therapy of cerebral malaria. *International Journal of Pharmaceutics* 513, 504–517. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.008>
- Pradines, B., Rolain, J.M., Ramiandrasoa, F., Fusai, T., Mosnier, J., Rogier, C., Daries, W., Baret, E., Kunesch, G., Le Bras, J., Parzy, D., 2002. Iron chelators as antimalarial agents: in vitro activity of dicaticholate against *Plasmodium falciparum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 177–187.
- Rajendran, V., Hasan, G., Kumar, N., Dutt, S., Garg, N., Tiwari, P., C. Ghosh, P., 2016. THERAPEUTIC EFFICACY OF CHLOROQUINE IN LONG CIRCULATING LIPOSOME FORMULATIONS AGAINST CHLOROQUINE-RESISTANT PLASMODIUM BERGHEI INFECTION IN MICE. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3, 258–264.
- Rathod, P.K., McErlean, T., Lee, P.-C., 1997. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9389–9393.
- Reithmeier, H., Herrmann, J., Göpferich, A., 2001. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *Journal of Controlled Release* 73, 339–350. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00354-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00354-6)
- Rengelshausen, J., Burhenne, J., Fröhlich, M., Tayrouz, Y., Singh, S.K., Riedel, K.-D., Müller, O., Hoppe-Tichy, T., Haefeli, W.E., Mikus, G., Walter-Sack, I., 2004. Pharmacokinetic interaction of chloroquine and methylene blue combination against malaria. *Eur J Clin Pharmacol* 60, 709–715. <https://doi.org/10.1007/s00228-004-0818-0>
- Rieckmann, K.H., Trenholme, G.M., Williams, R.L., Carson, P.E., Frischer, H., Desjardins, R.E., 1974. Prophylactic activity of mefloquine hydrochloride (WR 142 490) in drug-resistant malaria. *Bull World Health Organ* 51, 375–377.
- Rosemeyer, H., 2005. Nucleolipids: Natural Occurrence, Synthesis, Molecular Recognition, and Supramolecular Assemblies as Potential Precursors of Life and Bioorganic Materials. *Chemistry & Biodiversity* 2, 977–1063. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200590082>
- Rosenthal, P.J., 1998. Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy. *Emerg Infect Dis* 4, 49–57.
- Sadeghi, F., Ford, J.L., Rajabi-Siahboomi, A., 2003. The influence of drug type on the release profiles from Surelease-coated pellets. *International Journal of Pharmaceutics* 254, 123–135. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00003-6)
- Sáenz-Trevizo, A., Pizá-Ruiz, P., Chávez-Flores, D., Ogaz-Parada, J., Amézaga-Madrid, P., Vega-Ríos, A., Miki-Yoshida, M., 2019. On the Discoloration of Methylene Blue by Visible Light. *J Fluoresc* 29, 15–25. <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2304-6>

- Schirmer, R.H., Adler, H., Pickhardt, M., Mandelkow, E., 2011. “Lest we forget you — methylene blue ....” *Neurobiology of Aging* 32, 2325.e7-2325.e16. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012>
- Servant, L., Le Bourdon, G., Buffeteau, T., 2011. Comprendre la spectroscopie infrarouge : principes et mise en oeuvre. *Photoniques* 68–73. <https://doi.org/10.1051/photon/20115368>
- Sheskey, P.J., Cook, W.G., Cable, C.G., 2017. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 8th Revised edition. ed. Pharmaceutical Press, London.
- Singh, S., Dobhal, A.K., Jain, A., Pandit, J.K., Chakraborty, S., 2010. Formulation and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of a Water Soluble Drug: Zidovudine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 58, 650–655. <https://doi.org/10.1248/cpb.58.650>
- Spence, J.K., Bhattachar, S.N., Wesley, J.A., Martin, P.J., Babu, S.R., 2005. Increased Dissolution Rate and Bioavailability Through Comiconization with Microcrystalline Cellulose. *Pharmaceutical Development and Technology* 10, 451–460. <https://doi.org/10.1080/10837450500299636>
- Stern, P.W., 1976. Effects of Film Coatings on Tablet Hardness. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 65, 1291–1295. <https://doi.org/10.1002/jps.2600650908>
- Tabbara, M.A., El Jamal, M., 2012. A kinetic study of the discoloration of methylene blue by Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, comparison with NaOH. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 47, 275–282.
- Takatsuki, A., Arima, K., Tamura, G., 1971. TUNICAMYCIN, A NEW ANTIBIOTIC. I. *J. Antibiot.* 24, 215–223. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.215>
- Talisuna, A.O., Bloland, P., D’Alessandro, U., 2004. History, Dynamics, and Public Health Importance of Malaria Parasite Resistance. *Clin Microbiol Rev* 17, 235–254. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.235-254.2004>
- Tang, W., Xu, H., Kopelman, R., Philbert, M.A., 2005. Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms. *Photochem. Photobiol.* 81, 242–249. <https://doi.org/10.1562/2004-05-24-RA-176.1>
- Tang, X. (Charlie), Pikal, M.J., 2004. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharm Res* 21, 191–200. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016234.73023.75>
- Tea, J., 2015. Evaluation de la coulabilité des poudres – comparaison de méthodes de mesure 120.
- Teng, Z., Li, Y., Luo, Y., Zhang, B., Wang, Q., 2013. Cationic  $\beta$ -Lactoglobulin Nanoparticles as a Bioavailability Enhancer: Protein Characterization and Particle Formation. *Biomacromolecules* 14, 2848–2856. <https://doi.org/10.1021/bm4006886>
- Tonelli, G., 2013. Systèmes organisés à base de molécules hybrides lipide-nucléotides pour la délivrance des acides nucléiques (thesis). Bordeaux 2.
- Trape, J.F., 2001. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64, 12–17.
- Trenholme, C.M., Williams, R.L., Desjardins, R.E., Frischer, H., Carson, P.E., Rieckmann, K.H., Canfield, C.J., 1975. Mefloquine (WR 142,490) in the treatment of human malaria. *Science* 190, 792–794. <https://doi.org/10.1126/science.1105787>
- Tse, E.G., Korsik, M., Todd, M.H., 2019. The past, present and future of anti-malarial medicines. *Malaria Journal* 18, 93. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2724-z>
- Tseng, K.-H., Hsieh, C.-L., Huang, J.-C., Tien, D.-C., 2015. The Effect of NaCl/pH on Colloidal Nanogold Produced by Pulsed Spark Discharge [WWW Document]. *Journal of Nanomaterials*. <https://doi.org/10.1155/2015/612324>

- Uzunović, A., Vranić, E., 2007. EFFECT OF MAGNESIUM STEARATE CONCENTRATION ON DISSOLUTION PROPERTIES OF RANITIDINE HYDROCHLORIDE COATED TABLETS. *Bosn J Basic Med Sci* 7, 279–283.
- Van der Horst, C., Stuebinger, H., Seif, C., Melchior, D., Martínez-Portillo, F.J., Juenemann, K.P., 2003. Priapism - etiology, pathophysiology and management. *Int Braz J Urol* 29, 391–400.
- Wainwright, M., Amaral, L., 2005. Review: The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. *Tropical Medicine & International Health* 10, 501–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01417.x>
- Walpole, S.C., Prieto-Merino, D., Edwards, P., Cleland, J., Stevens, G., Roberts, I., 2012. The weight of nations: an estimation of adult human biomass. *BMC Public Health* 12, 439. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-439>
- Walter-Sack, I., Rengelshausen, J., Oberwittler, H., Burhenne, J., Mueller, O., Meissner, P., Mikus, G., 2009. High absolute bioavailability of methylene blue given as an aqueous oral formulation. *Eur J Clin Pharmacol* 65, 179–189. <https://doi.org/10.1007/s00228-008-0563-x>
- Wang, Y., Li, P., Tran, T., Zhang, J., Kong, L., 2016. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials* 6, 26. <https://doi.org/10.3390/nano6020026>
- Warth, A., Goeppert, B., Bopp, C., Schirmacher, P., Flechtenmacher, C., Burhenne, J., 2009. Turquoise to dark green organs at autopsy. *Virchows Arch* 454, 341–344. <https://doi.org/10.1007/s00428-009-0734-x>
- Wehrlé, P., Collectif, 2012. *Pharmacie galénique : formulation et technologie pharmaceutique*, 2e édition. ed. Maloine, Paris.
- Wernsdorfer, W.H., Payne, D., 1991. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther.* 50, 95–121.
- White, N.J., 2014. SECTION 9 Protozoan Infections 1. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-66223-7>
- Williams, N.A., Polli, G.P., 1984. The lyophilization of pharmaceuticals: a literature review. *J Parenter Sci Technol* 38, 48–59.
- Williamson, L.M., Cardigan, R., Prowse, C.V., 2003. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion* 43, 1322–1329. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2003.00483.x>
- Wirjanata, G., Sebayang, B.F., Chalfein, F., Prayoga, Handayuni, I., Trianty, L., Kenangalem, E., Noviyanti, R., Campo, B., Poespoprodjo, J.R., Möhrle, J.J., Price, R.N., Marfurt, J., 2015. Potent Ex Vivo Activity of Naphthoquine and Methylene Blue against Drug-Resistant Clinical Isolates of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 6117–6124. <https://doi.org/10.1128/AAC.00874-15>
- Yang, Q., 2009. SYSTEMES POLYMERIQUES A BASE DE DISPERSION AQUEUSE ADMINISTRES PAR VOIE ORALE POUR LA LIBERATION CONTROLEE DU PRINCIPE ACTIF 234.
- Yassin, S., Goodwin, D.J., Anderson, A., Sibik, J., Ian Wilson, D., Gladden, L.F., Axel Zeitler, J., 2015. The Disintegration Process in Microcrystalline Cellulose Based Tablets, Part 1: Influence of Temperature, Porosity and Superdisintegrants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104, 3440–3450. <https://doi.org/10.1002/jps.24544>
- York, P., 1975. Application of Powder Failure Testing Equipment in Assessing Effect of Glidants on Flowability of Cohesive Pharmaceutical Powders. *JPharmSci* 64, 1216–1221. <https://doi.org/10.1002/jps.2600640721>

- Yu, J., Hsu, C.-H., Huang, C.-C., Chang, P.-Y., 2015. Development of Therapeutic Au–Methylene Blue Nanoparticles for Targeted Photodynamic Therapy of Cervical Cancer Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 432–441. <https://doi.org/10.1021/am5064298>
- Zhang, H., 2017. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation, in: D'Souza, G.G.M. (Ed.), *Liposomes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 17–22. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2)
- Zhang, L.Z., Tang, G.-Q., 2004. The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 74, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.03.005>
- Zhang, Y., Law, Y., Chakrabarti, S., 2003. Physical properties and compact analysis of commonly used direct compression binders. *AAPS PharmSciTech* 4, 489–499. <https://doi.org/10.1208/pt040462>
- Zoungrana, A., Coulibaly, B., Sié, A., Walter-Sack, I., Mockenhaupt, F.P., Kouyaté, B., Schirmer, R.H., Klose, C., Mansmann, U., Meissner, P., Müller, O., 2008. Safety and Efficacy of Methylene Blue Combined with Artesunate or Amodiaquine for Uncomplicated Falciparum Malaria: A Randomized Controlled Trial from Burkina Faso. *PLoS ONE* 3, e1630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001630>
- Zulian, G.B., Tullen, E., Maton, B., 1995. Methylene Blue for Ifosfamide-Associated Encephalopathy. *New England Journal of Medicine* 332, 1239–1240. <https://doi.org/10.1056/NEJM199505043321817>

## **Titre : Mises en forme pharmaceutiques du Bleu de méthylène pour le traitement du paludisme : nanoformulations nucléolipidiques et formes orales adaptées**

### **Résumé :**

Afin d'apporter une réponse efficace à l'émergence des résistances de *Plasmodium falciparum* aux dérivés d'artémisinine, plusieurs stratégies ont été proposées, parmi lesquelles l'ajout d'un troisième antipaludique aux bi-thérapies existantes. Le bleu de méthylène (BM) est un bon candidat dans cette nouvelle stratégie car il présente plusieurs avantages : l'accès à une matière active d'une pureté de grade pharmacopée, associé à un coût de production faible, une efficacité démontrée sur les souches plasmodiales multirésistantes, et une activité contre les gamétocytes responsables de la transmission du paludisme. Plusieurs études cliniques ont démontré l'efficacité du BM pour le traitement du paludisme, mais cette substance active n'a jamais fait l'objet de recherches approfondies en pharmacie galénique pour améliorer sa biodisponibilité et son activité antipaludique, réduire ses effets indésirables et améliorer son observance chez les patients. Nos travaux de recherche se sont concentrés sur deux orientations complémentaires :

Dans le but d'améliorer la biodisponibilité du BM en solution, nous l'avons encapsulé à l'aide de nucléolipides (diC16dT et DOTAU), et avons réalisés des tests d'efficacité in vitro. Cette nanoformulation a protégé partiellement le BM contre la réduction et la photo-dégradation sans altérer son activité antipaludique sur deux souches (chloroquinosensibles et multirésistantes) de *Plasmodium falciparum*.

Afin de proposer une forme orale optimisée, des comprimés gastro-résistants ont été développés. L'utilisation d'un procédé de granulation humide a permis d'obtenir un grain fortement dosé en BM, plus facilement manipulable, présentant de meilleures caractéristiques physico-chimiques, et permettant d'obtenir des comprimés homogènes avec une possibilité de variation de doses. L'enrobage par un pelliculage gastro-résistant proposé devrait permettre d'éviter l'effet émétisant du BM.

Les formulations (nanoformulation et comprimés gastro-résistants) proposées devront faire l'objet d'études complémentaires afin de confirmer leurs intérêts et d'évaluer les possibilités de transposition d'échelle dans un cadre de bonnes pratiques de fabrication, pour des études cliniques envisagées dans le cadre d'un consortium international nouvellement créé autour du BM et du paludisme.

**Mots clés :** Paludisme, Bleu de méthylène, Nucléolipides, Nanoparticules, formes orales



## **Title: Pharmaceutical shaping of methylene blue for malaria treatment: nucleolipid nanoformulations and adapted oral forms**

### **Abstract:**

To respond to the emerging resistance of *Plasmodium falciparum* to artemisinin derivatives, many strategies are currently under discussion. Among them, adding another antimalarial drug to the existing bi-therapies has been proposed. Among the possible third drugs, Methylene Blue (MB) is a good candidate as it presents many advantages: early access to a pure active ingredient responding to pharmacopeia grade, a low manufacturing cost, and a proven efficacy against asexual stages of multiresistant malaria strains associated with a strong anti-gametocidal activity responsible for transmission. Many clinical trials demonstrated MB efficacy in malaria treatment, however no galenic research was done to improve its bioavailability and antimalarial activity, reduce side effects and improve patient adherence to treatment. Our research concentrated on two complementary directions:

In order to improve MB bioavailability in solution, we encapsulated it with nucleolipids (diC16dT and DOTAU), and tested its antimalarial efficacy *in vitro*. This nanoformulation partially protected MB against reduction and light degradation, without alteration of its antimalarial efficacy against two *P. falciparum* strains (chloroquinosensitive and multiresistant).

To propose access to an optimized oral form, gastro-resistant tablets were developed. Use of a humid granulation process allowed to obtain a granule highly dosed in MB, easier to handle, with better physico-chemical characteristics. We obtained homogeneous tablets with variable options in drug dosage. A gastro-resistant coating was added, with the aim to eliminate the vomiting side effect and improve compliance.

Complementary evaluation of the proposed formulations (nanonucleolipids and gastro-resistant tablets) will be conducted to confirm their interest and evaluate their industrial feasibility under Good Manufacturing Practices. A clinical evaluation of the tablets is currently considered by an international MB – malaria consortium newly created.

**Keywords:** Malaria, Methylene blue, Nucleolipids, Nanoparticles, Oral forms