



HAL
open science

Étude de l'apport des cyclodextrines pour la formulation d'un médicament anti-infectieux pédiatrique : la méfloquine

Amaury Durand

► **To cite this version:**

Amaury Durand. Étude de l'apport des cyclodextrines pour la formulation d'un médicament anti-infectieux pédiatrique : la méfloquine. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02875209

HAL Id: dumas-02875209

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02875209>

Submitted on 19 Jun 2020

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.

**MÉMOIRE POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE PHARMACIE
OPTION PHARMACIE HOSPITALIÈRE – PRATIQUE RECHERCHE**

Soutenu publiquement le 2 juillet 2019

Par M. DURAND Amaury

**Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur tient lieu de
THÈSE EN VUE DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**ÉTUDE DE L'APPORT DES CYCLODEXTRINES POUR LA FORMULATION
D'UN MÉDICAMENT ANTI-INFECTIEUX PÉDIATRIQUE, LA MÉFLOQUINE**

JURY

Président :

M. SONNET Pascal, Pharmacien, Professeur des Universités, Université de Picardie Jules Verne, EA 4294 AGIR

Membre et directeur de thèse :

M. MARÇON Frédéric, Pharmacien, Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier, CHU Amiens-Picardie, responsable de l'unité préparations et contrôles, pharmacie à usage intérieur, EA 4294 AGIR, Université de Picardie Jules Verne

Membres assesseurs :

M. LANNOY Damien, Pharmacien, Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier, CHRU Lille, responsable de l'unité préparations, pharmacie à usage intérieur, EA 7365 GRITA, Université de Lille

M. BELHOUT Mohamed, Pharmacien, CHU Amiens-Picardie, chef de service pharmacie à usage intérieur

M. MATHIRON David, Ingénieur en techniques d'analyse chimique, Université de Picardie Jules Verne

Thèse n° :

Remerciements

A Monsieur le Professeur Pascal Sonnet,
Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Vous m'avez permis d'effectuer ce travail dans votre laboratoire de recherche. Soyez certain de mon plus profond respect.

A Monsieur le Docteur Frédéric Marçon,
Vous m'avez fait l'honneur de m'accueillir dans votre équipe et de diriger ce travail de thèse. Vous m'avez appris depuis de nombreuses années la rigueur scientifique, l'organisation, la réflexion et la persévérance. Je vous remercie infiniment pour tous ces mois passés à vos côtés qui m'ont fait grandir. Veuillez accepter mon extrême reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Damien Lannoy,
Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Vos connaissances et votre sérénité m'ont beaucoup apportées. Soyez certain de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Docteur Mohamed Belhout,
Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Vous m'avez ouvert les portes de votre pharmacie et permis d'y accomplir ce travail de thèse. Veuillez accepter mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Docteur David Mathiron,
Vous me faites l'honneur de juger ce travail qui n'aurait pas été ce qu'il est sans vous. Votre disponibilité, votre prestance et votre gentillesse resteront toujours dans mon esprit. Veuillez accepter mon extrême reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Pascal Odou et son équipe du Master 2 Optimisation Thérapeutique,
Vous m'avez permis de participer à une formation enrichissante qui m'a ouvert les voies de la recherche. Soyez certain de mon plus profond respect.

A Benjamin qui m'a appris à utiliser l'HPLC et à Delphine qui m'a facilité son utilisation,
Ce travail n'aurait pas été possible sans vous.

A tous mes anciens collègues des pharmacies d'officine de Beautor, La Fère, Cayeux sur Mer et Le Touquet,
Vous m'avez fait découvrir l'univers de la pharmacie. Je vous en remercie sincèrement.

A tous mes anciens et actuels collègues des hôpitaux de Crèvecœur-le-Grand, Beauvais et Amiens,
Vous m'avez permis d'apprendre mon métier et de canaliser mes émotions. Veuillez accepter mes plus grands remerciements.

A mes parents,
Merci pour l'amour et l'éducation que vous m'apportez et votre soutien pendant ces longues années étudiantes. Rien n'aurait été possible sans vous. Je ne pourrai jamais vous rendre tout ce que vous avez fait pour moi alors recevez simplement un grand Merci.

A mes grands-parents,

Vous avez plus que grandement participé à mon éducation et m'avez offert un immense amour. Vous n'avez pas pu me suivre jusqu'à la fin de mes études. Soyez certain de ma fierté d'être votre petit-fils.

A tous les autres membres de ma famille,

Vous m'avez permis de devenir celui que je suis aujourd'hui, soyez certain de mes sentiments.

A mes beaux-parents, ma belle-sœur et toute ma famille par alliance,

Vous m'avez permis de devenir un homme meilleur et offert ce que tout Homme peut espérer, soyez certains de mes sentiments les plus sincères.

A tous mes amis,

Vous égayez chacun des moments partagés. Merci d'être présents à mes côtés et de me soutenir dans les bons et les mauvais moments.

A mes plus anciens amis et témoins, Alexandre et Benoît, le sport nous a rapprochés et même si on a arrêté ces bêtises, nos moments de rigolade sont les meilleurs moments. Ne changez rien et surtout pas vos douces, Morgane et Amélie.

A mes amis de lycée, Sophie et Raoul, on s'est beaucoup rapproché à la faculté même si vous avez choisi le côté obscur. Faire partie de votre cercle proche est un honneur.

A mes amis de 1^{ère} année de pharmacie, Isabelle, Véronique et Navaz, les cookies, footings, tennis, papillons de nuit, confidences, conseils en tous genres et vos thèses sont des souvenirs pour toujours.

A Cyndia, les potins des pauses et ton amour pour la Bretagne nous ont rapprochés. J'espère que tu m'apprendras à danser la gavotte avec ton cher Florian.

A mes co-internes de pharmacie et de médecine et notamment Amélie, Flora, Lucie, Sophie, Adrien, Anthony, Arnaud, Frédéric, Simon, Thomas R..., que de bons moments passés avec vous au travail et en dehors. Si nos parcours professionnels vont bientôt nous éloigner, j'espère qu'on continuera à s'entraider.

A tous mes amis de la Baie de Somme, Cécile, Gladys, Marion, Stéphanie, Augustin, Aurélien, Clément, Kevin, Matthieu, Sylvain, nous avons partagé tant de merveilleux moments depuis près de 10 ans. Nous étions des winners, certains sont devenus parents, que notre amitié perdure.

A Léa qui m'a ouvert les portes du cinéma, j'espère qu'on pourra retravailler ensemble.

A toi Sarah,

Tu as fait de moi l'homme que je suis et le pharmacien hospitalier que je deviens aujourd'hui. Merci de partager ma vie et de la rendre si fabuleuse.

Sommaire

1. Introduction	12
2. Matériels et Méthodes	16
2.1. Matériels	16
2.2. Validation de la méthode de dosage	16
2.3. Étude de la solubilité du chlorhydrate de méfloquine	17
2.3.1. Solubilité en fonction du pH.....	17
2.3.2. Solubilité en présence d'agents de solubilisation.....	17
2.3.3. Solubilité en présence de cyclodextrines.....	17
2.4. Étude de l'interaction méfloquine - cyclodextrine par HPLC-UV	18
2.5. Étude de l'interaction méfloquine - cyclodextrine par RMN.....	19
2.6. Stabilité des solutions de méfloquine en présence de cyclodextrines.....	21
2.6.1. Dégradation forcée.....	21
2.6.2. Dégradation en temps réel	21
3. Résultats	23
3.1. Validation de la méthode de dosage	23
3.2. Étude de la solubilité du chlorhydrate de méfloquine.....	27
3.2.1. Solubilité en fonction du pH.....	27
3.2.2. Solubilité en présence d'agents de solubilisation.....	28
3.2.3. Solubilité en présence de cyclodextrines.....	29
3.3. Étude de l'interaction méfloquine - cyclodextrine par HPLC-UV	30
3.4. Étude de l'interaction méfloquine - cyclodextrine par RMN.....	32
3.5. Stabilité des solutions de méfloquine en présence de cyclodextrines.....	46
3.5.1. Dégradation forcée.....	46
3.5.2. Dégradation en temps réel	48
4. Discussion.....	52
4.1. Méthode de dosage de la méfloquine.....	52
4.2. Solubilité et solubilisation de la méfloquine	52
4.3. Étude de l'interaction méfloquine-cyclodextrine.....	53
4.4. Mesure de la constante d'association.....	55
4.5. Stabilité des solutions de méfloquine en présence de cyclodextrines.....	56
5. Conclusions et perspectives	57
6. Bibliographie	58
7. Annexes	64

Liste des figures

Figure 1 : Formule chimique des diastéréoisomères de la méfloquine.....	13
Figure 2 : Formule chimique des énantiomères érythro de la méfloquine	13
Figure 3 : Formule développée générale des cyclodextrines naturelles et représentation schématique de leur structure tridimensionnelle.....	15
Figure 4 : Chromatogramme UHPLC-UV de la méfloquine à 1 mg/mL dans le méthanol	23
Figure 5 : Spectre UV de la méfloquine	23
Figure 6 : Droite de calibration obtenue en regroupant l'ensemble des standards de calibration passés à J1, J2 et J3. Valeurs individuelles (croix noires) ; droite de régression linéaire (ligne bleue).....	24
Figure 7 : Évolution des facteurs de réponse en fonction des niveaux de concentration. Valeurs individuelles (croix noires) ; moyennes (ronds rouges) et intervalles de confiance à 95 % ; droite de régression linéaire (ligne bleue).....	25
Figure 8 : Évolution des concentrations mesurées en fonction des concentrations introduites en choisissant une calibration en un point (1000 µg/mL). Valeurs individuelles (croix noires) ; droite de régression associée (ligne bleue) ; droite d'identité $y=x$ (ligne en pointillés).....	26
Figure 9 : Évolution des biais relatifs observés avec les concentrations mesurées par une calibration en un point (1000 µg/mL) en fonction des concentrations introduites. Valeurs individuelles (croix noires) ; moyennes (ronds rouges) ; droite de régression associée (ligne bleue) ; droite associée à un biais égal à 0 (ligne en pointillés).....	27
Figure 10 : Solubilité du chlorhydrate de méfloquine en fonction du pH (n=3, moyenne +/- écart-type).....	28
Figure 11 : Solubilité de la méfloquine en fonction des agents de solubilisation (n=1).....	29
Figure 12 : Solubilité du chlorhydrate de méfloquine en fonction des concentrations de HPBCD (à gauche) et de RAMEB (à droite)	30
Figure 13 : Évolution du temps de rétention de la méfloquine en fonction des concentrations en RAMEB dans le tampon phosphate 50 mM pH 2,7 de la phase mobile	31
Figure 14 : Evolution de l'inverse du facteur de rétention de la méfloquine en fonction des concentrations en cyclodextrine dans la phase mobile (n=1).....	32
Figure 15 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, 300 K) de la méfloquine (5 mM dans D_2O)	33
Figure 16 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, 300 K) de la RAMEB (5 mM dans D_2O) et de l'HPBCD (5 mM dans D_2O).....	34
Figure 17 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, 300 K) de la RAMEB (5 mM dans D_2O) en présence (en haut) et en absence (en bas) de méfloquine (5 mM dans D_2O)	35

- Figure 18 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, 300 K) de la méfloquine (5 mM dans D_2O) en présence (en haut) et en absence (en bas) de RAMEB (5 mM dans D_2O). Agrandissement sur la zone des protons aromatiques de la méfloquine36
- Figure 19 : Spectre RMN ^{19}F (564 MHz, 300 K) partiel de la méfloquine (5 mM dans D_2O) en présence (en haut) et en absence (en bas) de RAMEB (5 mM dans D_2O). F1 : signal du fluor le plus déblindé ; F2 : signal du fluor le plus blindé ; F1/2G et F1/2D : signaux de gauche (plus déblindé) et de droite (plus blindé) des fluors correspondants37
- Figure 20 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, 300 K) partiel de la DIMEB (5 mM dans D_2O) en présence (en haut) et en absence (en bas) de méfloquine (5 mM dans D_2O)38
- Figure 21 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, 300 K) partiel de la méfloquine (5 mM dans D_2O) en présence de DIMEB (5 mM dans D_2O)39
- Figure 22 : Carte T-ROESY partielle de la méfloquine (5 mM dans D_2O) en présence de DIMEB (5 mM dans D_2O)40
- Figure 23 : Agrandissement de la zone 1 de la carte T-ROESY partielle de la méfloquine (5 mM dans D_2O) en présence de DIMEB (5 mM dans D_2O)41
- Figure 24 : Carte T-ROESY partielle de la méfloquine dans la zone des protons aliphatiques (5 mM dans D_2O) en présence de DIMEB (5 mM dans D_2O)41
- Figure 25 : Spectres RMN ^{19}F (564 MHz, 300 K) partiels de la méfloquine en présence de RAMEB obtenus en faisant varier r (r = fraction molaire de RAMEB)42
- Figure 26 : Évolution de la variation de déplacement chimique pour les signaux du fluor en fonction du ratio molaire en présence de RAMEB (à gauche) et de HPBCD (à droite)($n=1$) .43
- Figure 27 : Détermination graphique de la constante d'association de la méfloquine pour HPBCD et RAMEB par la méthode de Benesi-Hildebrand. $\Delta\delta$: variation des déplacements chimiques ; F1 et F2 : signal du fluor le plus déblindé et le moins déblindé ; FG et FD : signaux de gauche et de droite des fluors ($n=1$)44
- Figure 28 : Spectres RMN ^{19}F partiels des énantiopurs 11S,12R (bleu) et 11R,12S (rouge), du mélange racémique - DIMEB (vert) et du mélange racémique - 11R,12S - DIMEB (violet) (5mM dans D_2O)45
- Figure 29 : Spectres RMN ^1H partiels des énantiopurs 11S,12R (bleu) et 11R,12S (rouge), du mélange racémique - DIMEB (vert) et du mélange racémique - 11R,12S - DIMEB (violet) (5mM dans D_2O)46
- Figure 30 : Chromatogramme UHPLC-UV de la méfloquine à 1 mg/mL dans l'acétonitrile diluée au demi dans HCl 0,5 N (à gauche) et NaOH 0,1 N (à droite)47
- Figure 31 : Spectres UV de la méfloquine (en noir) et de ses produits de dégradation (en rose) formés en présence de HCl 0,5 N (en haut à gauche), HCl 1 N (en haut à droite), NaOH 0,1 N (en bas à gauche) et NaOH 0,33 N (en bas à droite)48

Figure 32 : Évolution de la teneur initiale en méfloquine en solution en fonction du temps, en présence de HPBCD (en haut), RAMEB (au centre) ou sans cyclodextrine (en bas), sous exposition lumineuse (à droite) ou non (à gauche) dans le tampon citrate (ligne rouge) ou phosphate (ligne bleue). Fourchette cible (ligne pointillée rouge)(n=3, moyenne +/- écart-type)49

Figure 33 : Spectres UV de la méfloquine (en noir) et de ses produits de dégradation (en rose) formés dans les conditions suivantes : tampon citrate, 60 jours, noir, HPBCD (en haut à gauche), tampon citrate, 90 jours, noir, HPBCD (en haut au centre), tampon citrate, 90 jours, UV, HPBCD (en haut à droite et en bas à gauche), tampon citrate, 90 jours, noir, RAMEB (en bas au centre), tampon citrate, 90 jours, noir, méthanol (en bas à droite)50

Figure 34 : Représentation schématique de certains complexes d'inclusion entre la méfloquine et la DIMEB54

Liste des tableaux

Tableau I : Détermination de la justesse de la méthode	25
Tableau II : Détermination de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire relative de la méthode	25
Tableau III : Produits de dégradation formés lors de l'étude de stabilité	50
Tableau IV : Détermination de la constante d'association de la méfloquine pour les cyclodextrines	55

Liste des abréviations

ACT : artemisin-based combination therapy (= association à base d'artémisine)

ANOVA : analysis of variance (= analyse de la variance)

BCS : biopharmaceutical classification system (= système de classification biopharmaceutique)

CD : cyclodextrine

CE : complexation efficiency (= efficacité de la complexation)

COSY : correlation spectroscopy (= spectroscopie de corrélation)

DIMEB : dimethyl- β -cyclodextrine

D₂O : oxyde de deutérium

EMA : european medicines agency (= agence européenne du médicament)

(eau) PPI : (eau) pour préparations injectables

HPBCD : 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine

ICH : international conference on harmonisation (= conférence internationale d'harmonisation)

K_a : constante d'association

MQ : méfloquine

OMS : organisation mondiale de la santé

RAMEB : per-(2,6-di-O-méthyl)- β -cyclodextrine

RF : facteur de réponse

RMN : résonance magnétique nucléaire

T-ROESY : transverse rotating frame overhause effect spectroscopy

(U)HPLC : (ultra) high performance liquid chromatography (= chromatographie liquide à (ultra) haute performance)

UV : ultraviolet

1. Introduction

Le paludisme est une infection transmise par un parasite du genre *Plasmodium spp.* dont le vecteur est un moustique femelle du genre *Anophèle*. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a recensé 216 millions de cas de paludisme en 2016 dont 90 % en Afrique. Cette infection touche particulièrement les enfants puisque 285.000 des 445.000 individus décédés cette année-là avaient moins de 5 ans [1]. En Europe, 20 % des cas de paludisme d'importation concernent les enfants [2]. En 2015, l'assemblée mondiale de la santé a déclaré vouloir réduire de 90 % l'incidence et la mortalité du paludisme d'ici à 2030. Cela passe notamment par garantir l'accès universel aux moyens de prévention, de diagnostic et de traitement du paludisme [3].

La prise en charge prophylactique du paludisme pédiatrique repose sur l'association atovaquone-proguanil (dès 5 kg), la méfloquine (MQ) (dès 15 kg), la doxycycline (dès 40 kg), la chloroquine (uniquement en Amérique centrale et aux Caraïbes) ou l'association chloroquine-proguanil (en Afrique subsaharienne, dès 50 kg si contre-indication aux autres traitements). Mis à part la chloroquine, il n'existe aucune galénique adaptée à l'enfant de moins de 6 ans d'où la pratique de broyer les formes sèches [4].

La prise en charge curative du paludisme non compliqué en zone d'endémie repose en premier lieu sur une association à base d'artémisine (*artemisin-based combination therapy* ou ACT). Cinq ACT sont recommandées à partir de 5 kg : artéméther-luméfántrine, artésunate-amodiaquine, artésunate-méfloquine, artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine, dihydroartémisine-pipéraquline. La chloroquine peut être utilisée en cas de suspicion d'infection par une autre espèce que *Plasmodium falciparum* [5]. La méfloquine est utilisée en seconde intention dans la prise en charge du paludisme d'importation [4].

La prise en charge curative du paludisme grave en zone d'endémie repose initialement sur l'artésunate par voie intraveineuse. Le relai per os nécessite une association à base d'ACT : artésunate-amodiaquine, artéméther-luméfántrine ou dihydroartémisine-pipéraquline [5]. La méfloquine n'est pas indiquée dans la prise en charge du paludisme grave en zone d'endémie mais elle peut être utilisée en seconde intention en cas de paludisme grave d'importation [4].

La méfloquine (MQ) peut être utilisée en prophylaxie de l'infection chez l'enfant pesant plus de 15 kg à la posologie de 5 mg/kg/semaine sans dépasser 250 mg [4–6]. Elle est également indiquée dans le traitement des infections non compliquées chez l'enfant à la posologie de 25 mg/kg répartie sur 1 à 3 jours, à partir de 5 kg, sans dépasser 1500 mg [4–6]. La formulation galénique en comprimés quadrisécables dosés à 250 mg (Méfloquine, LARIAM®) ne permet pas d'adapter parfaitement la dose administrée au poids de l'enfant [4].

En raison de son intérêt thérapeutique et du manque de formulation adaptée, la méfloquine est inscrite sur la liste des "*paediatric needs*" de l'agence européenne du médicament (EMA) au même titre que les associations atovaquone-proguanil et chloroquine-proguanil [7]. La méfloquine fait également partie de la liste des médicaments essentiels de l'OMS pour la prise en charge prophylactique et curative du paludisme en pédiatrie [8]. Environ 20 % des "*paediatric needs*" sont également sur la liste de l'OMS [9].

D'un point de vue chimique, la méfloquine est une base faible de pKa égal à 8,6 [10] constituée d'un mélange de 4 diastéréoisomères [11] et commercialisée sous la forme d'un mélange racémique des énantiomères érythro 11S,12R et 11R,12S (**Figure 1**). L'énantiomère (+)- est le plus actif [12] et l'énantiomère (-)- induit le plus d'iatrogénie du fait d'une meilleure affinité avec les récepteurs de l'adénosine, d'une plus forte activité anticholinestérasique et d'un passage accru de la barrière hémato-encéphalique [13]. Cette configuration absolue correspond respectivement aux énantiomères 11S,12R et 11R,12S [14] (**Figure 2**).

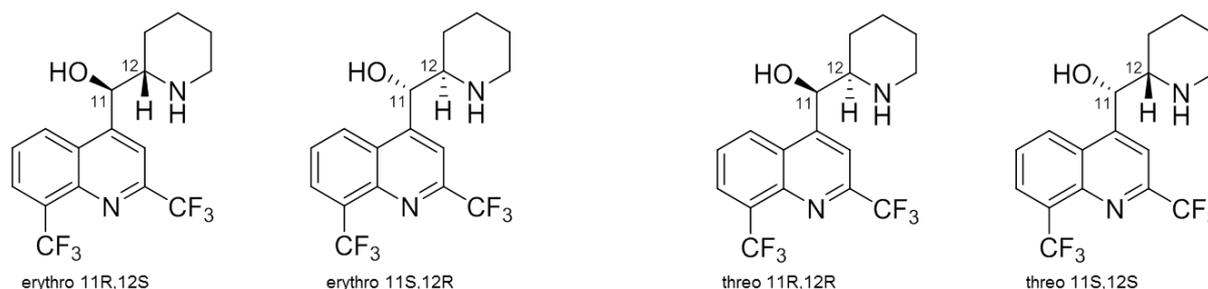


Figure 1 : Formule chimique des diastéréoisomères de la méfloquine

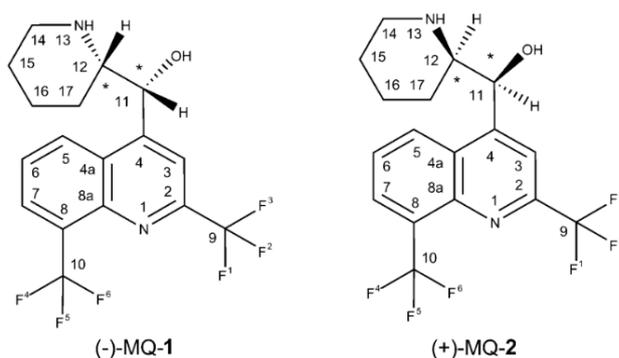


Figure 2 : Formule chimique des énantiomères érythro de la méfloquine

D'un point de vue biopharmaceutique, la méfloquine est un composé appartenant à la classe II du système de classification biopharmaceutique (BCS). La dose thérapeutique maximale par prise chez l'adulte (750 mg) n'est pas soluble dans 250 mL d'eau à pH compris entre 1,2 et 6,85 à 37 °C (solubilité inférieure à 1 mg/mL) mais la perméabilité intestinale est supérieure à 90 % [15–17]. Cette classification a été adaptée chez l'enfant en normalisant le volume d'eau nécessaire à la solubilisation du principe actif en fonction du poids de l'enfant [18]. La méfloquine reste un composé BCS II. D'après la classification BDDCS qui prend en compte la solubilité et le métabolisme du principe actif chez l'adulte, la méfloquine est classée II car son métabolisme est supérieur à 70 % [19].

Afin de faciliter l'observance des patients, un médicament doit présenter une bonne palatabilité. La palatabilité d'un médicament représente la sensation agréable en bouche qu'il procure en terme de goût, saveur, odeur et texture et est liée au volume unitaire administré [20]. Les comprimés permettent de masquer ou réduire la mauvaise palatabilité

des principes actifs, principalement causée par l'amertume comme c'est le cas pour la méfloquine [21]. L'utilisation de la méfloquine chez l'enfant nécessite actuellement de diviser le comprimé en doses inférieures ou d'écraser le comprimé. Le principe actif devient disponible pour les récepteurs du goût ce qui induit une mauvaise palatabilité et peut théoriquement entraîner le refus du traitement par l'enfant.

La forme galénique de prédilection dépend de l'âge du patient, du besoin d'une dose flexible, de la palatabilité et de la solubilité du principe actif et de la possibilité de masquage du goût du principe actif [22]. La capacité d'un enfant à avaler un médicament sous forme sèche dépend de différents facteurs comme l'âge, le volume, la texture ou l'habitude [23,24]. Les formes sèches pouvant induire une fausse-route, un refus du traitement ou une dose administrée inadaptée au poids ou à l'âge de l'enfant [25], les formes liquides sont à privilégier chez l'enfant de moins de 6 ans [26].

Le développement d'une forme liquide pédiatrique per os de méfloquine permettrait d'optimiser les modalités d'administration chez l'enfant en facilitant notamment l'adaptation de posologie [22,26,27]. Cela permettrait de répondre à la problématique d'adaptation de posologie et d'administration chez l'enfant soulevée par l'EMA et pourrait améliorer la biodisponibilité orale de la méfloquine [17]. Sachant que 97 % des enfants de 1 an et 8 ans pèsent respectivement moins de 12 kg et 27 kg [28,29] et que le volume d'administration doit idéalement être inférieur à 5 mL et 10 mL chez les enfants de respectivement moins et plus de 5 ans [20], une solution buvable à visée curative doit être dosée entre 20 mg/mL et 30 mg/mL.

Différentes approches ont été employées pour solubiliser la méfloquine : l'optimisation du pH associée à la co-cristallisation [30], l'émulsification [31], l'encapsulation par les liposomes [32] ou les cyclodextrines (CD) [33]. Parmi ces approches, l'utilisation des cyclodextrines semble intéressante pour la formulation d'un médicament pédiatrique. Il est communément admis que les cyclodextrines peuvent améliorer la solubilité, la perméabilité, la palatabilité et la stabilité des principes actifs qu'elles complexent tout en réduisant leur toxicité [32,35–38].

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composés de 6, 7 ou 8 unités glucose pour les plus communes qui se nomment respectivement α , β et γ -CD. Les cyclodextrines ont une structure tridimensionnelle en forme de cône tronqué dont la paroi est constituée par les unités glucose. Les hydroxyles secondaires (OH-2, OH-3) sont situés sur le plus grand côté du tronc conique alors que les hydroxyles primaires (OH-6) sont localisés sur le petit côté (**Figure 3**). La présence de ces groupements hydroxyles sur les deux bords de la couronne confère à la partie extérieure de la cyclodextrine un caractère hydrophile alors que l'intérieur de la cavité, tapissé d'atomes d'hydrogène (H-3, H-5) et de l'oxygène inter-glycosidique (O-4), est hydrophobe. Le caractère à la fois hydrophile et lipophile des cyclodextrines leur confère la propriété de former des complexes supramoléculaires en solution aqueuse en invitant une ou plusieurs molécules hydrophobes pour former des complexes d'inclusion. Les cyclodextrines sont également capables de former des complexes d'association résultant d'interactions entre l'extérieur de la cyclodextrine et la molécule complexée [39].

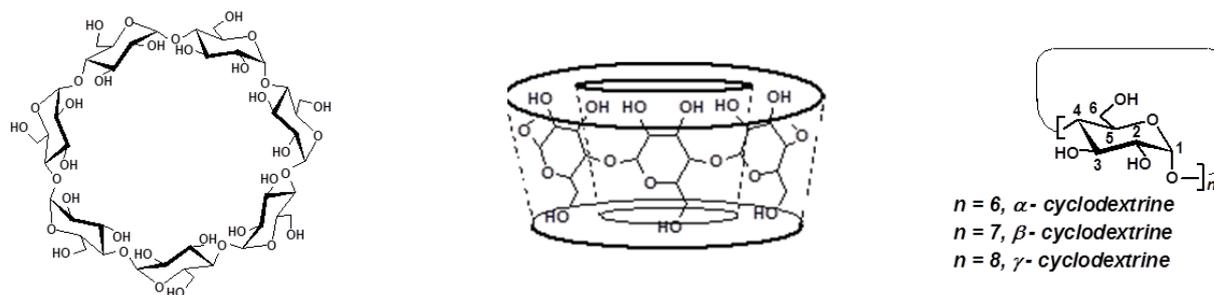


Figure 3 : Formule développée générale des cyclodextrines naturelles et représentation schématique de leur structure tridimensionnelle.

De nombreux dérivés des cyclodextrines ont été synthétisés en substituant certains atomes d'hydrogène par des groupements hydrophiles (p.ex. hydroxypropyle, sulfobutylether) afin d'améliorer la solubilité aqueuse des cyclodextrines naturelles et de leurs complexes. Parmi toutes les cyclodextrines modifiées, seules quelques-unes sont utilisées par l'industrie pharmaceutique, en particulier celles dérivées de la beta-cyclodextrine comme la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HPBCD) et la per-(2,6-di-O-méthyl)- β -cyclodextrine (RAMEB). Ces deux cyclodextrines sont respectivement hydroxypropylées et méthylées de manière non régiosélective mais contrôlée avec un degré de substitution moyen de 1,8 (Cavasol W7 HP Pharma, Wacker) et 0,65 (Cavasol W7 M Pharma, Wacker) (**Figure 3**).

Afin de développer une solution de méfloquine, nous évaluerons l'apport de différents agents de solubilisation et notamment la RAMEB et l'HPBCD pour solubiliser la méfloquine. Pour cela nous étudierons par chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection par ultraviolets (HPLC-UV) l'impact du pH sur la solubilité de la méfloquine, nous réaliserons des diagrammes de phase de la méfloquine avec ces cyclodextrines et nous évaluerons l'évolution du temps de rétention de la méfloquine par des phases mobiles contenant des cyclodextrines. Nous déterminerons ensuite les interactions entre la méfloquine et les cyclodextrines par résonance magnétique nucléaire (RMN). Les expériences RMN seront effectuées avec le mélange racémique de méfloquine ainsi qu'avec les deux énantiopurs. Nous évaluerons ensuite la stabilité d'une solution de méfloquine en présence de RAMEB et de HPBCD.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériels

Un standard pharmaceutique secondaire de chlorhydrate de méfloquine a été fourni par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis). L'HPBCD Cavasol W7 HP Pharma et la RAMEB Cavasol W7 M Pharma ont été achetées auprès de Ashland (Schaffhausen, Suisse). La diméthyl-β-cyclodextrine (DIMEB) a été acquise auprès de Cis Bio (Saclay, France). Les solvants utilisés pour la chromatographie liquide étaient tous de grade analytique (grade UHPLC). L'eau pour préparations injectables (PPI) provenait du laboratoire Chaix et du Marais (La chaussée Saint Victor, France). Le méthanol, l'acétonitrile, l'ammoniaque à 28 % et l'acide orthophosphorique à 85 % provenaient de VWR (Fontenay-sous-bois, France). L'acétate d'ammonium pour analyse, le potassium dihydrogène phosphate, le sodium dihydrogène phosphate dihydrate et l'hydroxyde de sodium 1 N provenaient de Merck (Darmstadt, Allemagne). Le disodium hydrogen orthophosphate anhydre provenait de Fisher Scientific (Loughborough, Royaume-Uni). L'acide citrique monohydraté provenait de Cooper (Melun, France). L'oxyde de deutérium (D₂O) a été acquis auprès d'Eurisotop (Saint-Aubin, France).

2.2. Validation de la méthode de dosage

Les solutions de méfloquine ont été analysées par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la détection par ultraviolets (UHPLC-UV) (Nexera®, Shimadzu, Kyoto, Japon) à 283 nm. Un µL de solution a été élué sur une phase stationnaire octadécylée (150 mm x 2,1 mm ; 1,7 µm) (Acquity UPLC CSH C18®, Waters, Milford, Connecticut, Etats-Unis) chauffée à 40 °C, en utilisant une phase mobile contenant 40 volumes de tampon ammoniacque 120 mM pH 10,0, 40 volumes d'acétonitrile et 20 volumes de méthanol, à un débit isocratique de 0,4 mL/min.

La méthode de dosage a été validée en suivant les recommandations de la conférence internationale d'harmonisation [40] et de la société française des sciences et techniques pharmaceutiques [41]. Pendant trois jours consécutifs, deux solutions mères de calibration et trois solutions mères de validation concentrées à 5 mg/mL ont été préparées dans le méthanol. Ces solutions ont ensuite été diluées de façon indépendante dans le méthanol pour obtenir des solutions filles concentrées à 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 et 3 mg/mL.

La spécificité a été évaluée par injection d'un blanc ne contenant que du méthanol. Le facteur de réponse ($RF = \frac{Signal}{Concentration}$) a été étudié sur la gamme de calibration testée. Plusieurs méthodes de calibration ont été testées et leur impact sur la justesse, la répétabilité, la fidélité intermédiaire et les profils d'incertitude des mesures a été évalué. La méthode de calibration produisant les meilleurs résultats a ensuite été retenue. Finalement, la linéarité de la méthode de dosage sur la plage des concentrations testées a été vérifiée par régression linéaire et par la réalisation d'une analyse de la variance ANOVA sur la relation : concentration mesurée = f (concentration introduite). La limite de quantification a été définie comme la concentration la plus basse pour lequel le résultat fourni était exact. La limite de détection a été calculée à partir de la limite de quantification ($Limite\ de\ détection = \frac{Limite\ de\ quantification}{3.3}$). Les définitions des paramètres validés sont présentées en **Annexe 1**.

Les tests statistiques et les graphiques ont été produits avec les logiciels R® (R Core Team) et E-noval® (Arlenda, Mont-Saint-Guibert, Belgique). Un risque de 10 % a été renseigné dans le logiciel E-Noval® pour la validation de la méthode. Le seuil $p < 0,05$ a été considéré comme significatif pour les tests statistiques. Les signaux mesurés et les concentrations introduites pour chaque solution de calibration et de validation sont présentés en **Annexes 2 et 3**.

2.3. Étude de la solubilité du chlorhydrate de méfloquine

2.3.1. Solubilité en fonction du pH

La solubilité du chlorhydrate de méfloquine a été déterminée dans l'eau PPI non tamponnée et en présence d'un tampon citrate 50 mM pH 3,0 (AH_3/AH_2^-), d'un tampon phosphate 80 mM pH 2,7 (AH_3/AH_2^-), d'un tampon phosphate 50 mM pH 4,6 (AH_2^-/AH^{2-}) et d'un tampon phosphate 50 mM pH 6,6 (AH^{2-}/A^{3-}). Pour cela des triplicatas de chaque suspension ont été agités pendant 25 h à l'abri de la lumière et à 22 °C puis filtrés sur une membrane hydrophile versapor de 0,45 μ m (Acrodisc®, Pall Life Sciences, Cortland, New York, Etats-Unis) afin d'obtenir une solution limpide. Ces solutions ont ensuite été diluées au 1/10^e dans la phase mobile avant d'être analysées par UHPLC-UV selon la méthode décrite précédemment. Le pH des suspensions a été contrôlé avant filtration.

2.3.2. Solubilité en présence d'agents de solubilisation

La solubilité du chlorhydrate de méfloquine a été évaluée en présence de divers agents de solubilisation afin de savoir lesquels pouvaient améliorer la solubilité intrinsèque. La méfloquine a été dissoute dans un cosolvant (polyéthylène glycol), des surfactants (polysorbate 80, 15-hydroxystéarate, macrogolglycérol ricinoléate) et des cyclodextrines (HPBCD, RAMEB) en solution aqueuse. Chaque excipient a été ajouté aux concentrations de 1 % et 10 % m/v dans des fioles de 5 mL contenant un excès de méfloquine et complétées par du tampon phosphate 50 mM pH 7,0. Ces solutions ont été préparées en singulet. Trois solutions ont été réalisées dans le tampon phosphate afin d'évaluer la solubilité intrinsèque du chlorhydrate de méfloquine et 2 solutions ont été préparées dans le méthanol afin de calibrer la réponse signal = f(concentration). La fusion préalable du 15-hydroxystéarate a été effectuée à 35 °C. La méfloquine a initialement été agitée dans l'agent de solubilisation en quantité minimale suffisante de tampon permettant l'agitation de la solution. Le tampon a été rajouté en quantité plus importante au bout de 2 h puis en quantité suffisante pour 5 mL au bout de 6 h. L'agitation a été arrêtée au bout de 24 h. Les solutions ont été filtrées et analysées en UHPLC-UV sans dilution préalable afin de mesurer la solubilité. Le pH et le goût des solutions ont également été évalués par une seule personne.

2.3.3. Solubilité en présence de cyclodextrines

Afin d'étudier le pouvoir solubilisant des cyclodextrines, trois diagrammes de phases ont été réalisés selon la méthode de Higuchi et Connors [42]. La méfloquine a été ajoutée en large excès dans des fioles jaugées de 5 mL contenant une quantité exactement connue de cyclodextrines (i.e. 26, 132 et 264 mM) préalablement dissoutes dans l'eau PPI, un tampon citrate 50 mM pH 3,0 et un tampon phosphate 80 mM pH 2,7. Ces suspensions ont été préparées en singulet dans le tampon phosphate et l'eau PPI et en duplicata dans le tampon

citrate. Les échantillons ont été agités pendant 18 h à l'abri de la lumière et à 22 °C avant d'être filtrés par l'intermédiaire d'un filtre 0,45 µm afin d'obtenir des solutions limpides. Ces solutions ont ensuite été diluées au 1/10^e dans la phase mobile avant d'être analysées par UHPLC-UV. Le pH des suspensions de méfloquine a été contrôlé avant l'étape de filtration clarifiante.

Si un complexe d'inclusion se forme entre les cyclodextrines et la méfloquine avec une stœchiométrie 1:1, il est possible de déterminer sa constante d'association (Ka) et l'efficacité de la complexation (CE) à partir des diagrammes de phases [42,43] en traçant la courbe $[MQ]_{solubilisée} = f([CD]_{ajoutée})$ et en utilisant l'équation suivante (**Annexe 4**) :

$$St = So + \frac{Ka * So}{1 + Ka * So} * [CD]_{totale} \quad (1)$$

Avec :

- St : solubilité totale du chlorhydrate de méfloquine
- So : solubilité intrinsèque du chlorhydrate de méfloquine soit l'ordonnée à l'origine de la courbe

Ka est obtenu à partir de la pente de l'équation (1):

$$Ka = \frac{pente}{So(1 - pente)} \quad (2)$$

CE permet de comparer les complexes d'inclusion formés en s'affranchissant de la donnée de solubilité S₀ et est défini, à partir de l'équation (1) comme étant égal à :

$$CE = \frac{pente}{1 - pente} \quad (3)$$

Le ratio molaire est calculé à partir de CE selon l'équation :

$$ratio\ molaire = 1 : \left(1 + \frac{1}{CE}\right) \quad (4)$$

2.4. Étude de l'interaction méfloquine - cyclodextrine par HPLC-UV

Il est possible de détecter les interactions et la formation de complexes entre les cyclodextrines et la méfloquine avec la chromatographie liquide en éluant la méfloquine à l'aide d'une phase mobile contenant des concentrations connues de cyclodextrine [44]. Pour cela, 1 µL d'une solution de méfloquine préparée à 2 mg/mL dans l'eau PPI a été élué sur une colonne octadécylée (150 mm x 4,6 mm ; 3,5 µm) (Symmetry C18®, Waters) maintenue à 40 °C en utilisant une phase mobile composée d'une solution tamponnée de cyclodextrine (tampon phosphate 50 mM, pH 2,7) et de méthanol (40:60 v/v) à un débit de 1 mL/min.

Le tampon phosphate 50 mM, pH 2,7 contenait 0, 25, 50, 100 et 200 mM de RAMEB ou d'HPBCD.

Si un complexe se forme entre la méfloquine et une cyclodextrine, l'évolution du temps de rétention de la méfloquine (t_R) en fonction des différentes concentrations de cyclodextrine permet de calculer K_a grâce à la formule établie par Buha *et al.* [44] :

$$\frac{1}{k'c} = \frac{K_a}{k'm} * [CD]^n + \frac{1}{k'm} \quad (5)$$

Avec :

- $k'c$: facteur de capacité de la méfloquine : t_R

$$k'c = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad (6)$$

- $k'm$: facteur de capacité de la méfloquine en absence de cyclodextrine

- t_m : temps mort

En traçant le graphique $\frac{1}{k'c} = f([CD])$, il est alors possible de déterminer K_a à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine :

$$K_a = \frac{\text{pente}}{\text{ordonnée à l'origine}} \quad (7)$$

La stœchiométrie est généralement déterminée par l'aspect des droites.

2.5. Étude de l'interaction méfloquine - cyclodextrine par RMN

Les expériences de RMN ont été réalisées à la plateforme analytique de l'Université de Picardie Jules Verne et encadrées dans leur réalisation et leur interprétation par le docteur David Mathiron (ingénieur en techniques d'analyse chimique).

Les expériences de RMN du proton et du fluor ont été enregistrées aux fréquences respectives de 600,17 MHz et 564,72 MHz sur un appareil Avance III 600® (Bruker, Wissembourg, France) muni d'une sonde directe BBO 5 mm et équipée de gradient z. Les spectres ont été enregistrés à 300 K avec un contrôle rigoureux de la température (+/- 0,1 K). La calibration interne des spectres RMN 1H a été effectuée à l'aide du signal résiduel de solvant HOD à 4,71 ppm. Les valeurs de pulses 90° ont été d'environ 7,5 μs pour le proton. Les spectres monodimensionnels ont été acquis en RMN 1H avec un nombre de scans (NS) de 128 et un time domain (TD) de 64 K points et en RMN ^{19}F avec un NS de 16 et un TD de 32 K points. Une correction de la ligne de base a été effectuée sur chacun des spectres. Tous les spectres ont été traités à l'aide du logiciel Topspin 3.2® (Bruker).

La DIMEB a été employée en tant que modèle RMN de la RAMEB pour obtenir d'avantage d'informations sur la nature des interactions méfloquine-RAMEB.

Une expérience 2D T-ROESY (Transverse Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy) a été réalisée pour mettre en évidence la proximité spatiale des noyaux de DIMEB et de méfloquine et ainsi comprendre la structure du complexe. Cette expérience a été enregistrée avec 224 scans et une fenêtre spectrale de 10 ppm dans chacune des dimensions (1024 points réels dans la dimension F2 et 256 points dans la dimension F1). Le temps de mélange a été fixé à 380 ms.

En RMN, une variation des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) peut être observée lors de la formation d'un complexe. Si un complexe se forme, il est possible de déterminer sa stœchiométrie (n) par la méthode décrite par Job [45]. En travaillant à concentration molaire totale constante ($[m\acute{e}floquine] + [CD] = K$) et en faisant varier le ratio molaire de 0 à 1, il est possible de relier la variation des déplacements chimiques à la stœchiométrie du complexe grâce à l'équation $\Delta\delta * [m\acute{e}floquine] = f(r)$ (**Annexe 5**). Cette courbe passe par un maximum pour :

$$r = \frac{[CD]}{[MQ] + [CD]} = \frac{1}{1+n} \quad (8)$$

Des solutions mères de m\acute{e}floquine, HPBCD et RAMEB de concentrations \u00e9gales \u00e0 5 mM ont \u00e9t\u00e9 pr\u00e9par\u00e9es dans 3,5 mL de D₂O. La solution de m\acute{e}floquine a \u00e9t\u00e9 mise sous ultrasons et chauff\u00e9e \u00e0 45 \u00b0C afin de faciliter sa solubilisation. Pour chacune des cyclodextrines, 11 solutions filles ont \u00e9t\u00e9 pr\u00e9par\u00e9es en m\u00e9langeant diff\u00e9rentes proportions de solutions deut\u00e9r\u00e9es tout en gardant une concentration molaire totale \u00e9gale \u00e0 5 mM et un volume total de 500 \u00b5L. Les spectres RMN ¹⁹F correspondants ont \u00e9t\u00e9 enregistr\u00e9s.

Il est \u00e9galement possible en RMN de d\u00e9terminer K_a en observant les variations des d\u00e9placements chimiques gr\u00e2ce \u00e0 la m\u00e9thode d\u00e9crite par Benesi et Hildebrand [46] (**Annexe 6**). Lors de l'ajout de quantit\u00e9s croissantes de cyclodextrines mais avec une concentration molaire de m\acute{e}floquine constante, les variations des d\u00e9placements chimiques observ\u00e9s peuvent \u00eatre reli\u00e9es \u00e0 K_a par l'\u00e9quation :

$$\frac{1}{\Delta\delta} = \frac{1}{K_a * \Delta\delta_c} * \frac{1}{[CD]} + \frac{1}{\Delta\delta_c} \quad (9)$$

En tra\u00e7ant le graphique $\frac{1}{\Delta\delta} = f\left(\frac{1}{[CD]}\right)$, il est possible de d\u00e9terminer K_a :

$$K_a = \frac{\text{ordonn\u00e9e \u00e0 l'origine}}{\text{pente}} \quad (10)$$

Des solutions m\u00e8res de m\acute{e}floquine \u00e0 2 mM et d'HPBCD et de RAMEB \u00e0 100 mM ont \u00e9t\u00e9 pr\u00e9par\u00e9es. \u00c0 partir de ces solutions m\u00e8res, 500 \u00b5L de solutions filles contenant 0,5 mM de m\acute{e}floquine et 0, 5, 10, 20, 30, 40 et 50 mM de chaque cyclodextrine ont \u00e9t\u00e9 pr\u00e9par\u00e9es. Les spectres RMN ¹⁹F correspondants ont \u00e9t\u00e9 enregistr\u00e9s.

Afin de d\u00e9pister d'\u00e9ventuelles interactions diff\u00e9rentes entre les deux \u00e9nantiom\u00e8res de la m\acute{e}floquine et les cyclodextrines, des exp\u00e9riences RMN ¹H et ¹⁹F ont \u00e9t\u00e9 effectu\u00e9es en pr\u00e9sence de l'\u00e9nantio pur actif 11S,12R et de l'\u00e9nantio pur toxique 11R,12S. Ceux-ci ont \u00e9t\u00e9 synth\u00e9tis\u00e9s chimiquement et fournis gracieusement par le laboratoire Agir de l'Universit\u00e9 de Picardie Jules Verne et son directeur, le professeur Pascal Sonnet. Des solutions contenant chaque \u00e9nantio pur, la m\acute{e}floquine en pr\u00e9sence de DIMEB et un m\u00e9lange m\acute{e}floquine \u2013 \u00e9nantio pur 11R,12S (1/3-2/3) \u2013 DIMEB ont \u00e9t\u00e9 pr\u00e9par\u00e9es dans le D₂O aux concentrations initiales de 5 mM. Cela avait pour objectif d'identifier les pics correspondant \u00e0 chaque \u00e9nantio pur en vue d'attribuer les constantes d'association calcul\u00e9es pr\u00e9c\u00e9demment \u00e0 chaque \u00e9nantio pur. Une exp\u00e9rience T-ROESY a ensuite \u00e9t\u00e9 effectu\u00e9e en m\u00e9langeant la

DIMEB et l'énantiopur 11R,12S aux concentrations de 5 mM dans le D₂O. La comparaison des tâches de corrélation entre ces composés aux tâches de corrélation obtenues lors de l'expérience précédemment effectuée avec le mélange racémique permet théoriquement d'identifier les interactions de chaque énantiopur avec les cyclodextrines.

2.6. Stabilité des solutions de méfloquine en présence de cyclodextrines

2.6.1. Dégradation forcée

La méfloquine est sensible à la photodégradation [47]. Or il est bien décrit que les cyclodextrines peuvent protéger de la photodégradation certains principes actifs [48].

Une expérience de dégradation forcée a été effectuée afin d'observer l'éventuelle formation de produits de dégradation et affiner la résolution de la méthode chromatographique. La méfloquine a été solubilisée à environ 1 mg/mL dans l'acétonitrile avant d'être exposée pendant 24 h aux conditions de dégradation suivantes : dégradation acide (HCl 0,1 N, HCl 0,33 N, HCl 0,5N, HCl 1 N), dégradation basique (NaOH 0,1 N, NaOH 0,33 N, NaOH 0,5 N, NaOH 1 N), oxydation (H₂O₂ 3 %, H₂O₂ 10 %, H₂O₂ 15 %, H₂O₂ 30 %), photodégradation (UV), thermodégradation (60 °C, 70 °C). La concentration de méfloquine non dégradée a été évaluée par rapport à une solution conservée pendant 24 h à 25 °C et à l'obscurité.

2.6.2. Dégradation en temps réel

La stabilité des solutions de méfloquine, en conditions réelles de conservation, en présence de HPBCD et de RAMEB, a été évaluée dans le tampon citrate 50 mM pH 3,0 et dans le tampon phosphate 80 mM pH 2,7. Les quantités de cyclodextrines ont été choisies afin de pouvoir solubiliser la méfloquine à 10 mg/mL. Ces quantités ont été déterminées à partir des diagrammes de phases. Les cyclodextrines ont initialement été solubilisées dans les tampons avant d'être ajoutées dans des fioles jaugées contenant la méfloquine. Des solutions témoins ont été préparées sans cyclodextrines dans ces mêmes tampons et en utilisant du méthanol comme cosolvant. Les suspensions ont été agitées à l'obscurité et à température ambiante pendant 24 h (obtention d'une solution limpide). Les solutions ont ensuite été filtrées via un filtre stérilisant 0,22 µm (Vygon, Ecoen, France) puis réparties aseptiquement sous poste de sécurité microbiologique de type II Herasafe KSP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) dans des flacons stériles en verre de type I. Ces flacons ont été stockés en enceinte ICH 25 ± 2 °C, 60 ± 5 % HR, la moitié sous exposition lumineuse ultraviolet (UV) - visible (modèle KBF P240, Binder, Tuttlingen, Allemagne) et l'autre moitié à l'obscurité (modèle KBF 240, Binder) conformément à la norme ICH Q1B [49]. Trois échantillons de chaque solution ont été analysés tous les 30 jours par UHPLC-UV selon la méthode précédemment décrite mais en utilisant un temps d'analyse de 14 min pour distinguer d'éventuels pics tardifs (2,2 fois le temps de rétention). L'étude a duré 90 jours dans le tampon citrate à l'obscurité, 120 jours dans le tampon citrate sous exposition lumineuse et 60 jours dans le tampon phosphate. Le pourcentage de méfloquine résiduelle par rapport à la concentration initiale a été calculé chaque mois à partir d'un triplicat de calibration dans le méthanol. La formation éventuelle de produits de dégradation a été évaluée.

3. Résultats

3.1. Validation de la méthode de dosage

Aucun pic n'a été coélué avec la méfloquine et aucun pic n'est apparu lors de l'injection du blanc au temps de rétention théorique de la méfloquine (**Figure 4**). La méthode est spécifique. Le spectre UV de la méfloquine possède plusieurs longueurs d'ondes maximales et notamment autour de 220 nm et 283 nm (**Figure 5**).

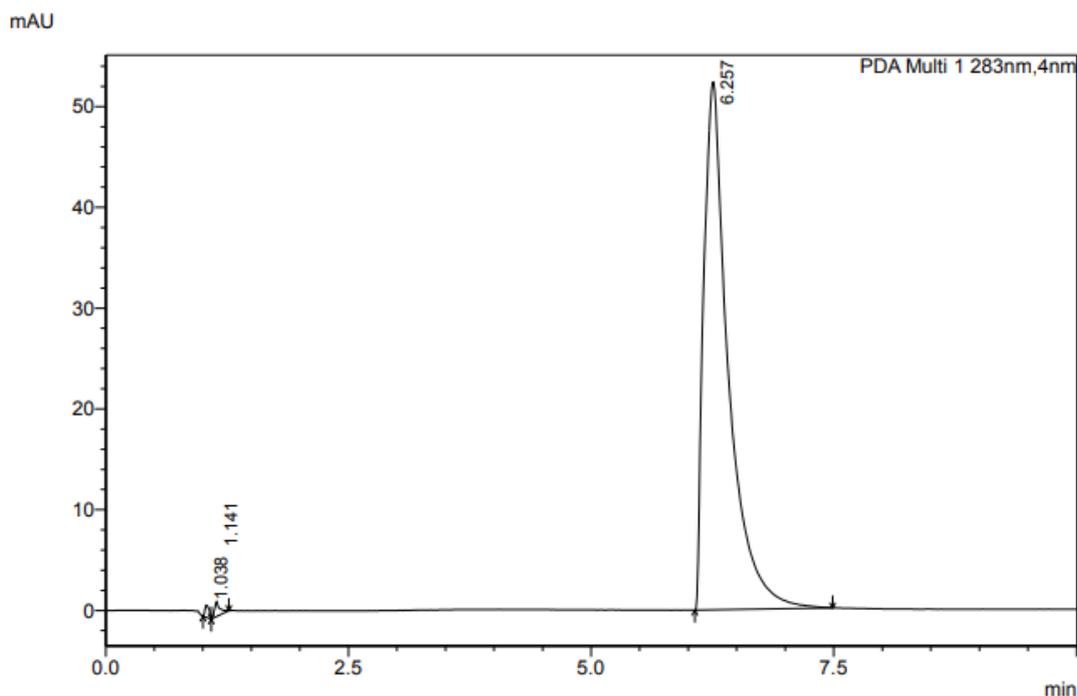


Figure 4 : Chromatogramme UHPLC-UV à 283 nm de la méfloquine à 1 mg/mL dans le méthanol

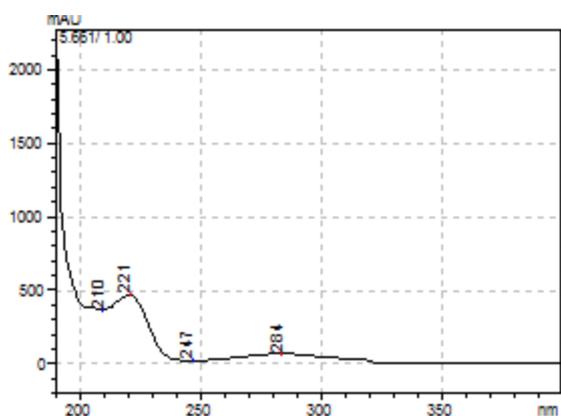


Figure 5 : Spectre UV de la méfloquine

La régression linéaire obtenue avec les différents standards de calibration passés à J1, J2 et J3 a permis d'établir la bonne linéarité de la fonction réponse (signal = f (concentration introduite)) (**Figure 6**).

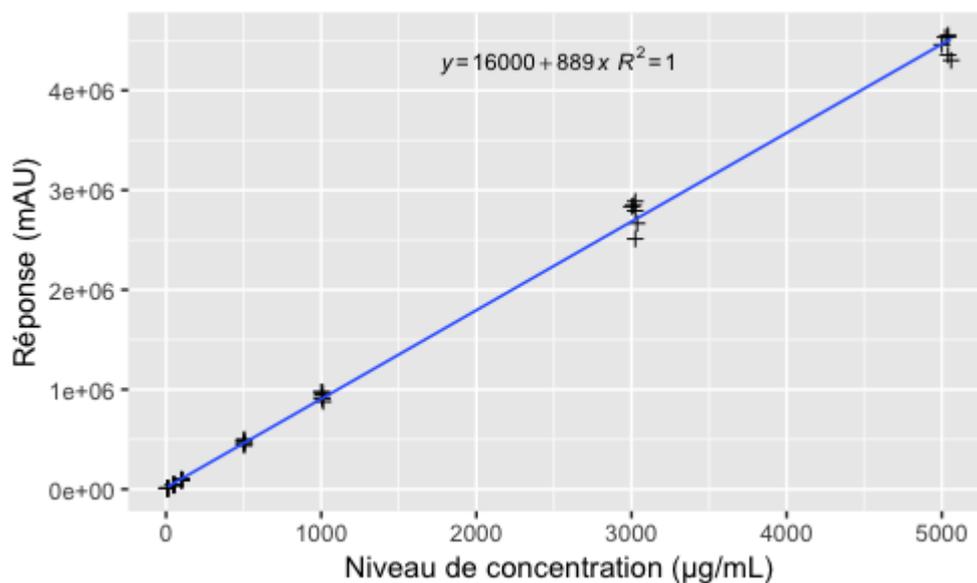


Figure 6 : Droite de calibration obtenue en regroupant l'ensemble des standards de calibration passés à J1, J2 et J3. Valeurs individuelles (croix noires) ; droite de régression linéaire (ligne bleue).

La nature de la relation *facteur de réponse = f (concentration introduite)* est de nature linéaire ($p = 0,903$) ce qui témoigne de l'absence de biais systématique (**Figure 7**). Plusieurs modèles de calibration (linéaire, linéaire forcée par l'origine, en un point) ont été testés par la suite.

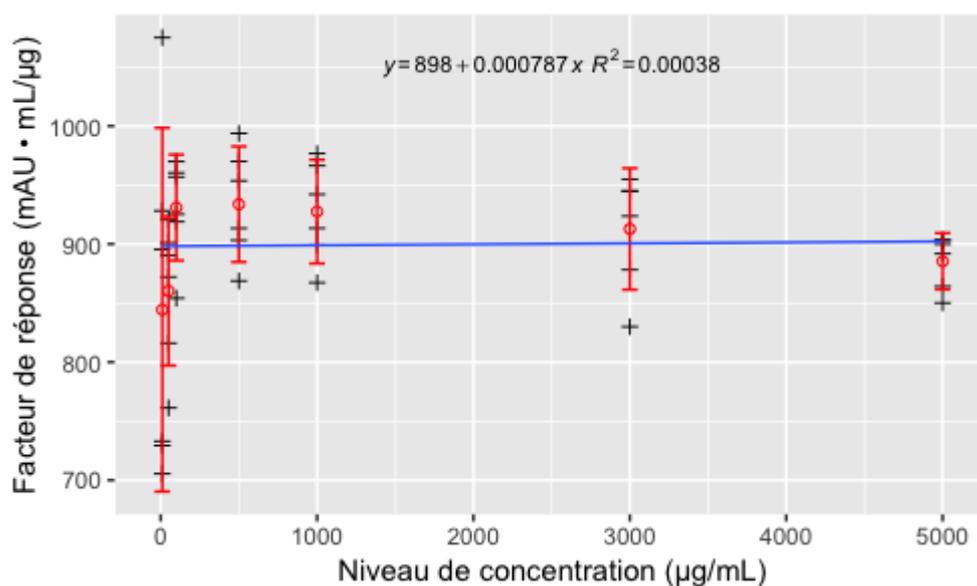


Figure 7 : Évolution des facteurs de réponse en fonction des niveaux de concentration. Valeurs individuelles (croix noires) ; moyennes (ronds rouges) et intervalles de confiance à 95 % ; droite de régression linéaire (ligne bleue).

Lors de l'analyse des taux de recouvrement et de la linéarité de la méthode de dosage, le modèle de calibration en un point (1000 µg/mL) a donné les meilleurs résultats. Les biais relatifs ont tous été inférieurs à 5 % en dehors du niveau le plus faible (10 µg/mL) (**Tableau I**). La méthode est juste sur l'intervalle [50 – 5000] µg/mL.

Tableau I : Détermination de la justesse de la méthode

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Moyenne des concentrations calculées (µg/mL)	Biais absolu (µg/mL)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)
10,0	10,04	9,260	-0,7755	-7,727	92,27
50,0	50,18	48,44	-1,739	-3,465	96,53
100,0	100,4	100,4	0,09026	0,08994	100,1
500,0	501,8	515,2	13,45	2,680	102,7
1000,0	1004	1013	9,529	0,9495	100,9
3000,0	3010	2945	-65,06	-2,161	97,84
5000,0	5018	4919	-99,17	-1,976	98,02

La répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenues avec une calibration en un point (1000 µg/mL) ont également été bonnes avec un coefficient de variation (CV) < 5 % à l'exception du premier niveau (10 µg/mL) (**Tableau II**). La méthode est fidèle sur l'intervalle [50 – 5000] µg/mL.

Tableau II : Détermination de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire relative de la méthode

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Répétabilité (cv%)	Fidélité intermédiaire (cv%)
10,0	10,04	5,961	17,30
50,0	50,18	2,172	2,172
100,0	100,4	2,159	2,884
500,0	501,8	2,129	2,129

1000,0	1004	2,672	2,672
3000,0	3010	2,678	3,447
5000,0	5018	2,061	2,910

Une ANOVA réalisée sur la droite $concentration\ mesurée = f(concentration\ introduite)$ a permis de mettre en évidence une corrélation forte entre les concentrations introduites et les concentrations mesurées ($p < 0,05$), comme en témoigne le coefficient de détermination ($R^2 > 0,99$), ainsi que le bon ajustement du modèle linéaire ($p_{lack\ of\ fit} = 0,818$) (**Figure 8**). La méthode est linéaire sur toute la gamme.

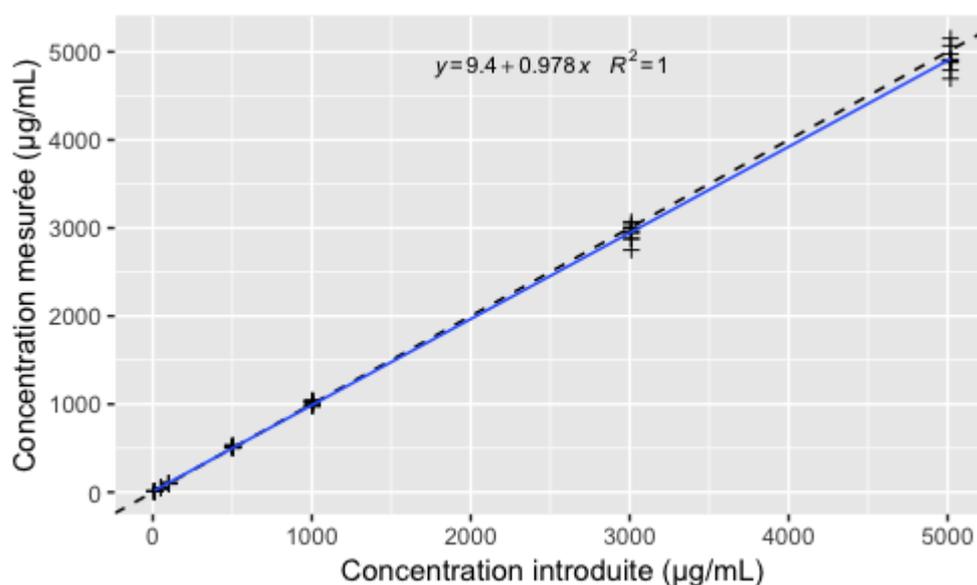


Figure 8 : Évolution des concentrations mesurées en fonction des concentrations introduites en choisissant une calibration en un point (1000 µg/mL). Valeurs individuelles (croix noires) ; droite de régression associée (ligne bleue) ; droite d'identité $y=x$ (ligne en pointillés).

L'analyse des biais relatifs n'a pas montré d'écart significatif pour les niveaux compris entre 50 et 5000 µg/mL. Ceux-ci n'ont pas présenté de tendance à la croissance ou à la décroissance en fonction du niveau de concentration ($R^2 < 0,01$) (**Figure 9**). La méthode est exacte sur l'intervalle [50 – 5000] µg/mL.

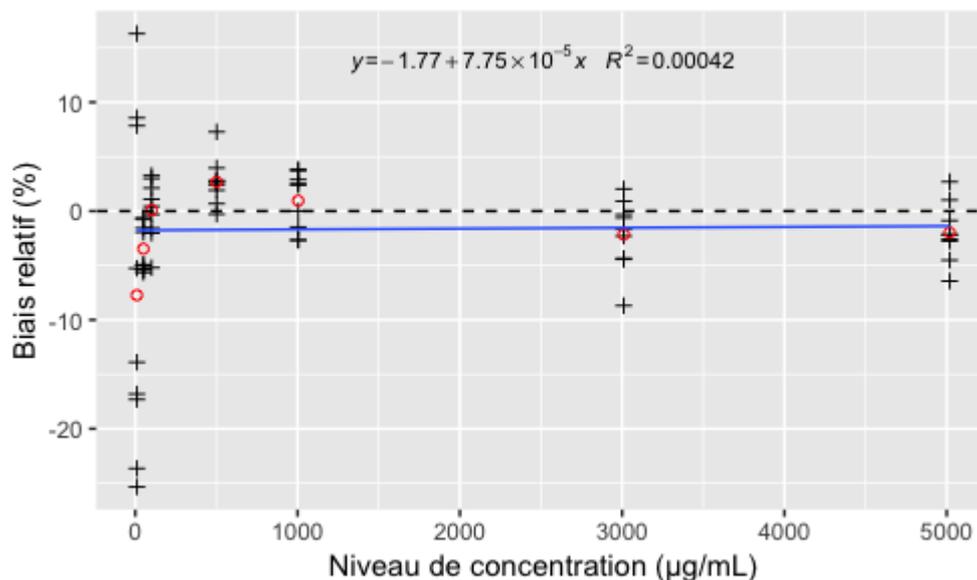


Figure 9 : Évolution des biais relatifs observés avec les concentrations mesurées par une calibration en un point (1000 µg/mL) en fonction des concentrations introduites. Valeurs individuelles (croix noires) ; moyennes (ronds rouges) ; droite de régression associée (ligne bleue) ; droite associée à un biais égal à 0 (ligne en pointillés).

La méthode analytique a été validée sur l'intervalle [50 – 5000] µg/mL correspondant aux limites de quantification inférieure et supérieure. La limite de détection a été calculée à 15 µg/mL.

3.2. Étude de la solubilité du chlorhydrate de méfloquine

3.2.1. Solubilité en fonction du pH

L'ajout de chlorhydrate de méfloquine a diminué le pH de l'eau PPI (pH final 4,6) et du tampon phosphate 50 mM pH initial 4,6 (pH final 3,9). Le pH des autres solutions n'a pas fluctué. La solubilité du chlorhydrate de méfloquine a notamment été mesurée à 0,64 mg/mL dans le tampon citrate, 4,12 mg/mL dans l'eau PPI et 4,81 mg/mL dans le tampon phosphate pH 2,6 (Figure 10).

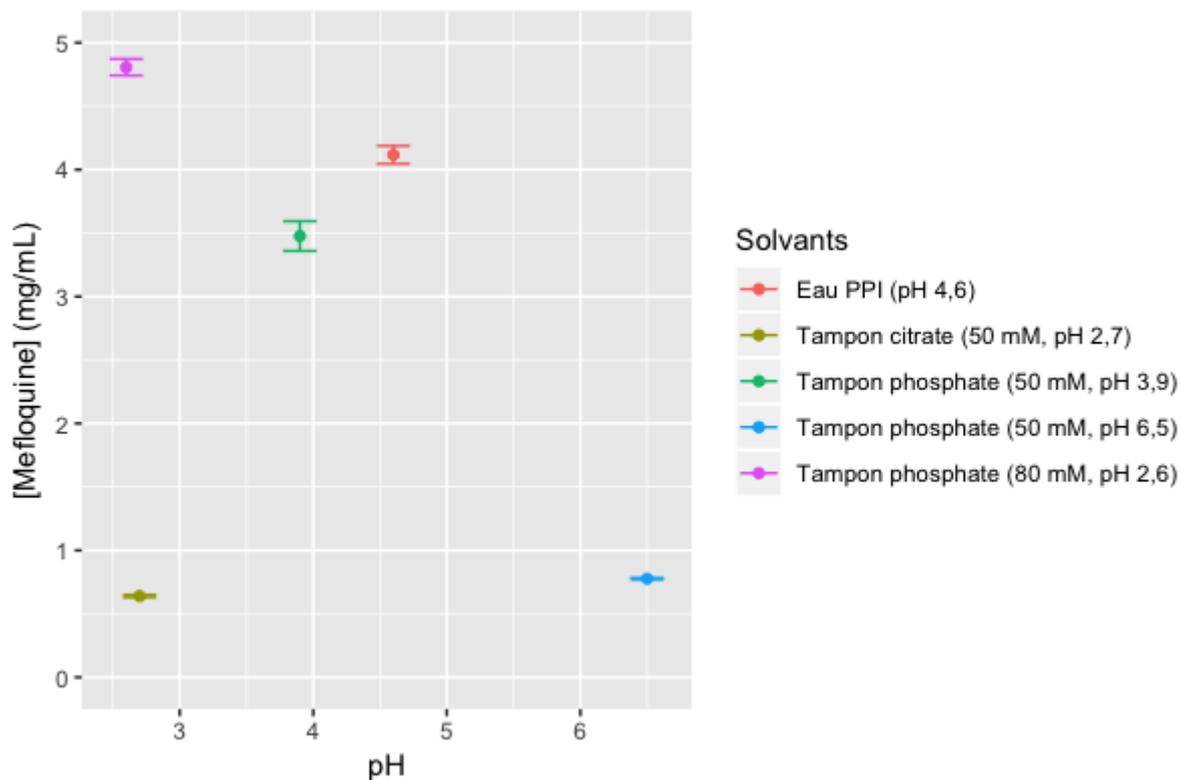


Figure 10 : Solubilité du chlorhydrate de méfloquine en fonction du pH (n=3, moyenne +/- écart-type)

3.2.2. Solubilité en présence d'agents de solubilisation

Les pH mesurés après dissolution de la méfloquine dans le tampon phosphate 50 mM pH 7,0 étaient tous compris entre 6,8 et 7,0 sauf pour les solutions contenant 10 % de 15-hydroxystéarate, de macrogolglycérol ricinoléate et de polysorbate 80 dont le pH a été respectivement mesuré à 6,6, 6,4 et 6,2.

La solubilité du chlorhydrate de méfloquine dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7,0 a été calculée à 0,29 mg/mL. A la concentration de 1 %, tous les agents solubilisants ont augmenté cette solubilité qui n'a cependant pas dépassé 1 mg/mL. A la concentration de 10 % en agent de solubilisation, les tensioactifs présentaient le plus fort pouvoir solubilisant et notamment le polysorbate 80 qui a permis de solubiliser le chlorhydrate de méfloquine à hauteur de 7,83 mg/mL. La RAMEB et l'HPBCD ont permis de solubiliser le chlorhydrate de méfloquine à hauteur de 4,4 et 1,7 mg/mL. Pour chaque agent, la solubilité a nettement augmenté avec la concentration sauf pour le polyéthylène glycol 400 dont la solubilité est restée proche de 0,4 mg/mL (**Figure 11**).

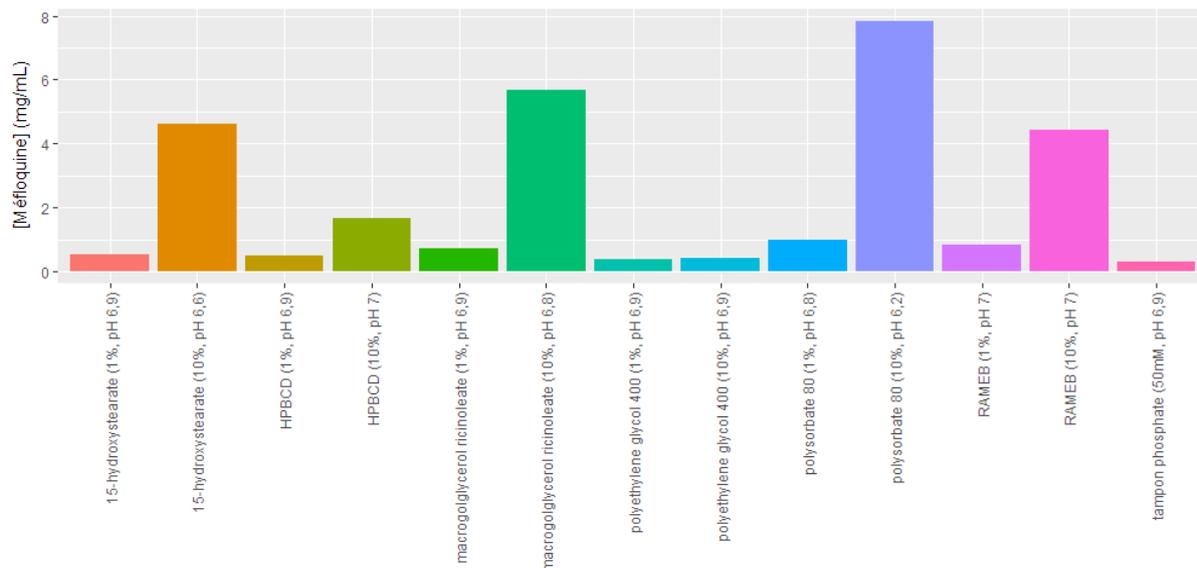


Figure 11 : Solubilité de la méfloquine en fonction des concentrations en agent de solubilisation (Tensio-actifs, Cyclodextrines, Cosolvants) dans le tampon phosphate 50 mM pH-7 (n=1)

Les solutions contenant du polysorbate 80, du 15-hydroxystéarate et du macroglycérol ricinoléate ont présenté une amertume bien prononcée dès 1 % de concentration et qui s'est accentuée à 10 % ; la méfloquine et ces surfactants étant amers [50]. Les solutions contenant des cyclodextrines et du polyéthylène glycol 400 ont présenté une légère amertume à 10%. Les solutions de cyclodextrines présentaient également un goût légèrement sucré.

Au vu de ces résultats, il est envisageable d'utiliser les cyclodextrines pour formuler une solution de méfloquine.

3.2.3. Solubilité en présence de cyclodextrines

Lors des diagrammes de phases, la solubilité (S_0) du chlorhydrate de méfloquine dans les solutions ne contenant pas de cyclodextrine a été mesurée à 0,44 mg/mL (1,16 mM) dans le tampon citrate 50 mM pH 2,9, à 4,24 mg/mL (11,21 mM) dans le tampon phosphate 80 mM pH 2,9 et à 4,80 mg/mL (12,69 mM) dans l'eau PPI pH 4,3 ce qui est en concordance avec les résultats précédents. L'ajout de cyclodextrine n'a pas fait varier le pH des solutions tamponnées. Parallèlement à l'augmentation des concentrations en cyclodextrine, la solubilité du chlorhydrate de méfloquine a augmenté de manière croissante et linéaire (pente < 0.1) dans le domaine étudié, indiquant une stœchiométrie 1:1 et un profil de type A_L [35] (Figure 12).

Dans les solutions contenant la plus grande quantité de HPBCD et de RAMEB (264 mM), le chlorhydrate de méfloquine a respectivement été solubilisé à hauteur de 12 mg/mL et 26 mg/mL dans le tampon citrate et l'eau PPI, 16 mg/mL et 27 mg/mL dans le tampon

phosphate (**Figure 12**) soit des concentrations molaires de RAMEB et HPBCD respectivement 4 et 6 à 9 fois supérieures aux concentrations de chlorhydrate de méfloquine solubilisée.

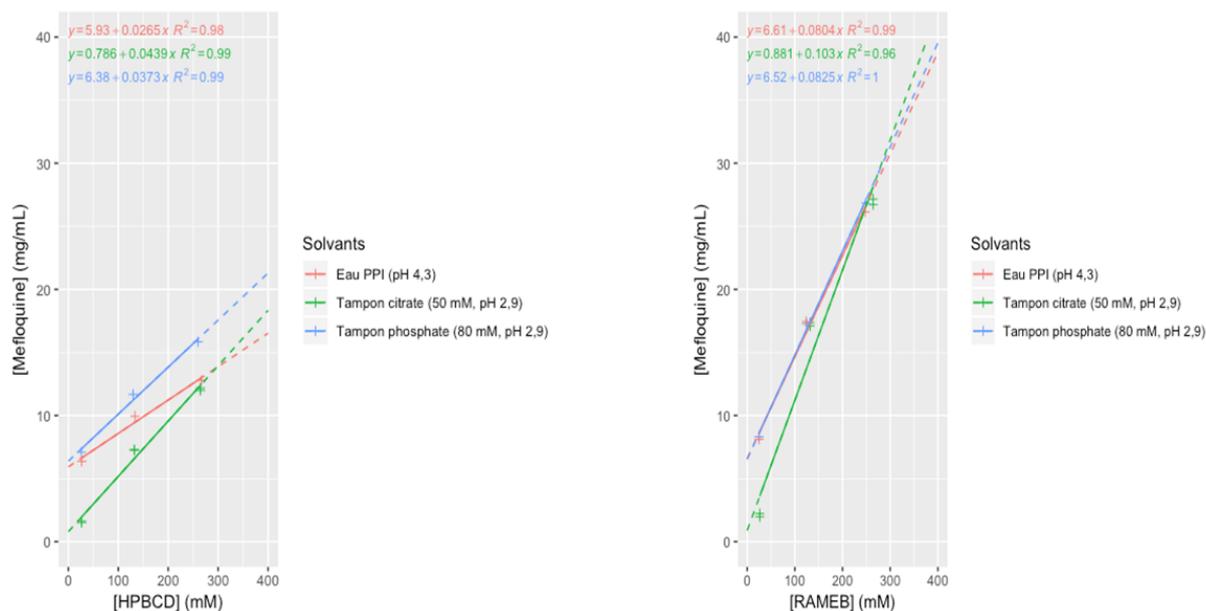


Figure 12 : Solubilité du chlorhydrate de méfloquine en fonction des concentrations de HPBCD (à gauche) et de RAMEB (à droite)

Les constantes d'association de la méfloquine pour HPBCD et RAMEB ont respectivement été mesurées à 63 M^{-1} et 161 M^{-1} dans le tampon citrate, 7 M^{-1} et 16 M^{-1} dans le tampon phosphate, 5 M^{-1} et 16 M^{-1} dans l'eau PPI.

L'efficacité de la complexation de la méfloquine pour ces cyclodextrines a été calculée à 0,131 et 0,375 dans le tampon citrate, 0,109 et 0,280 dans le tampon phosphate, 0,075 et 0,270 dans l'eau PPI.

Les ratios molaires découlant des valeurs de CE ont été calculés pour RAMEB et HPBCD à 1:4 et 1:9 dans le tampon citrate, 1:5 et 1:10 dans le tampon phosphate, 1:5 et 1:14 dans l'eau PPI.

3.3. Étude de l'interaction méfloquine - cyclodextrine par HPLC-UV

Le temps mort a été mesuré à 1,5 min pour chaque solution. L'augmentation de la concentration de RAMEB et de HPBCD dans la phase mobile s'est suivie d'une diminution du temps de rétention de la méfloquine de 7,0 min en l'absence de cyclodextrine jusqu'à 3,3 min et 5,0 min avec 200 mM de RAMEB et d'HPBCD dans le tampon phosphate soit 80 mM dans la phase mobile (**Figure 14**).

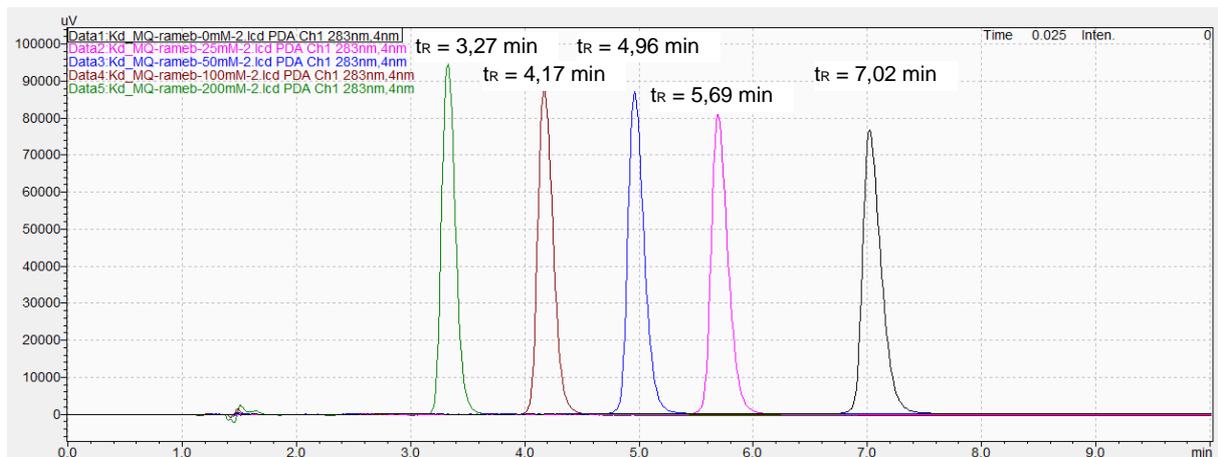
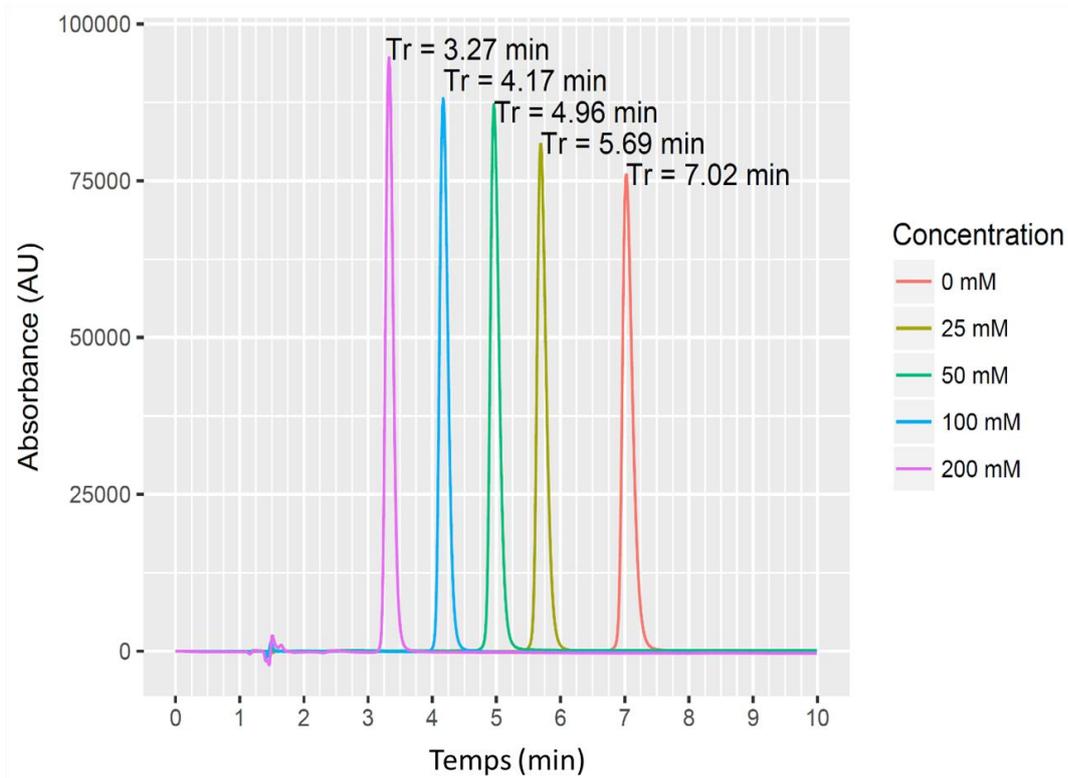


Figure 13 : Évolution du temps de rétention de la méfloquine en fonction des concentrations en RAMEB dans le tampon phosphate 50 mM pH 2,7 de la phase mobile

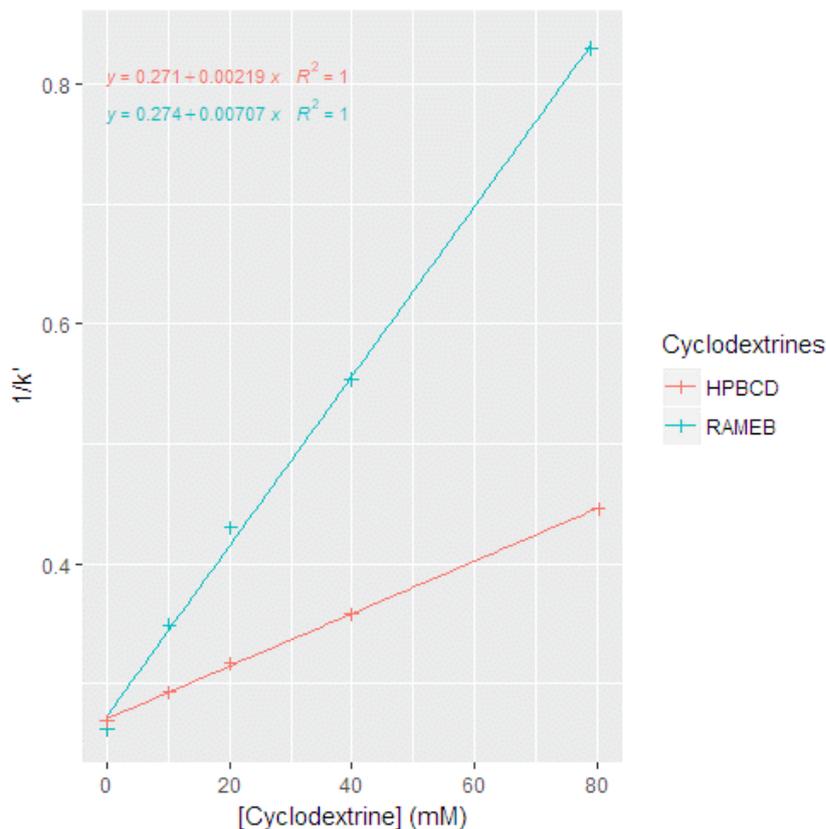


Figure 14 : Evolution de l'inverse du facteur de rétention de la méfloquine en fonction des concentrations en cyclodextrine dans la phase mobile ($n=1$)

Les constantes d'association de la méfloquine pour HPBCD et RAMEB ont respectivement été calculées à 8 M^{-1} et 25 M^{-1} (Figure 14).

3.4. Étude de l'interaction méfloquine - cyclodextrine par RMN

L'augmentation de la solubilité du chlorhydrate de méfloquine en présence de cyclodextrine a suggéré une interaction entre ces molécules qui a été explorée en RMN.

La RMN est une technique de choix pour étudier les interactions non covalentes et en particulier les complexes d'inclusion formés entre une cyclodextrine et une molécule invitée. Lors de l'inclusion d'une molécule invitée dans la cavité d'une cyclodextrine, l'environnement des noyaux impliqués dans le processus d'inclusion est modifié et se traduit en RMN par une variation de leur déplacement chimique. Les variations les plus importantes sont observées pour les protons H-3 et H-5 situés à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine tandis que les variations relatives aux protons H-1, H-2 et H-4 situés à l'extérieur de la cavité sont plus faibles [51]. Par ailleurs, la RMN est une des rares techniques qui permet d'observer à la fois l'hôte et l'invité et de déterminer la stœchiométrie, la constante d'association et la structure tridimensionnelle du complexe [52].

Dans un premier temps, les spectres RMN ^1H de référence de la méfloquine (Figure 15), de la RAMEB et de l'HPBCD (Figure 16) ont été établis.

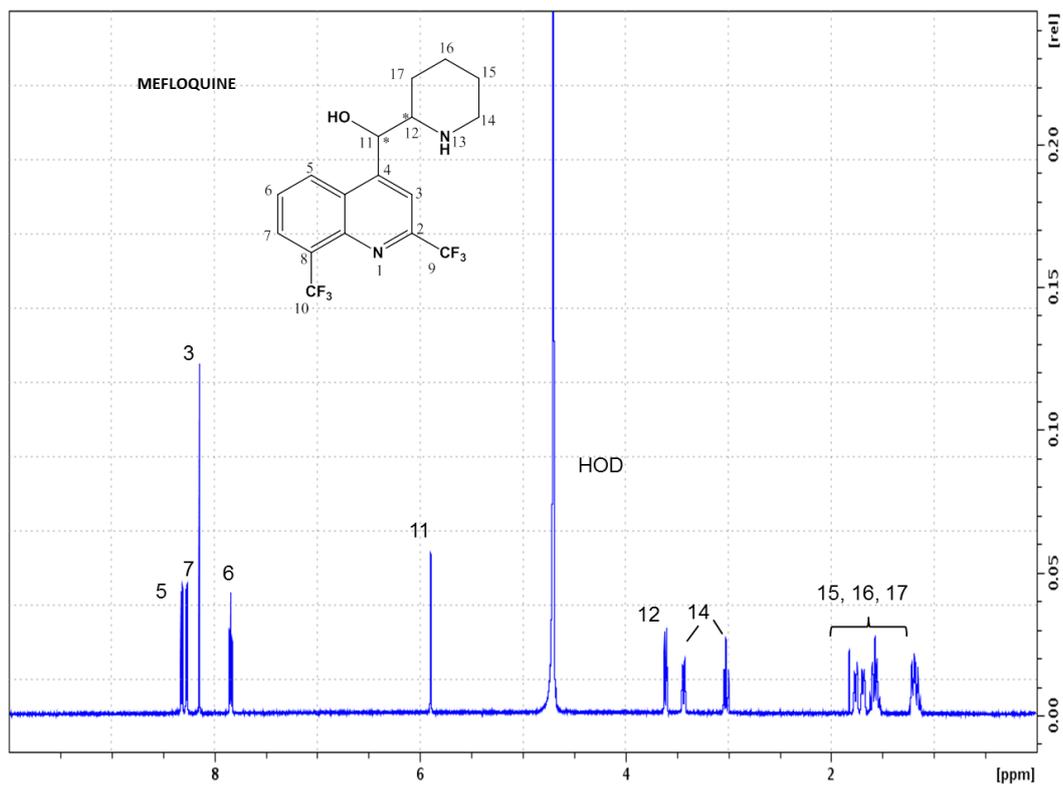


Figure 15 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, 300 K) de la méfloquine (5 mM dans D_2O)

Une expérience COSY a permis de confirmer l'attribution des signaux aromatiques de la méfloquine et d'identifier la plupart des signaux aliphatiques (**Figure 15**).

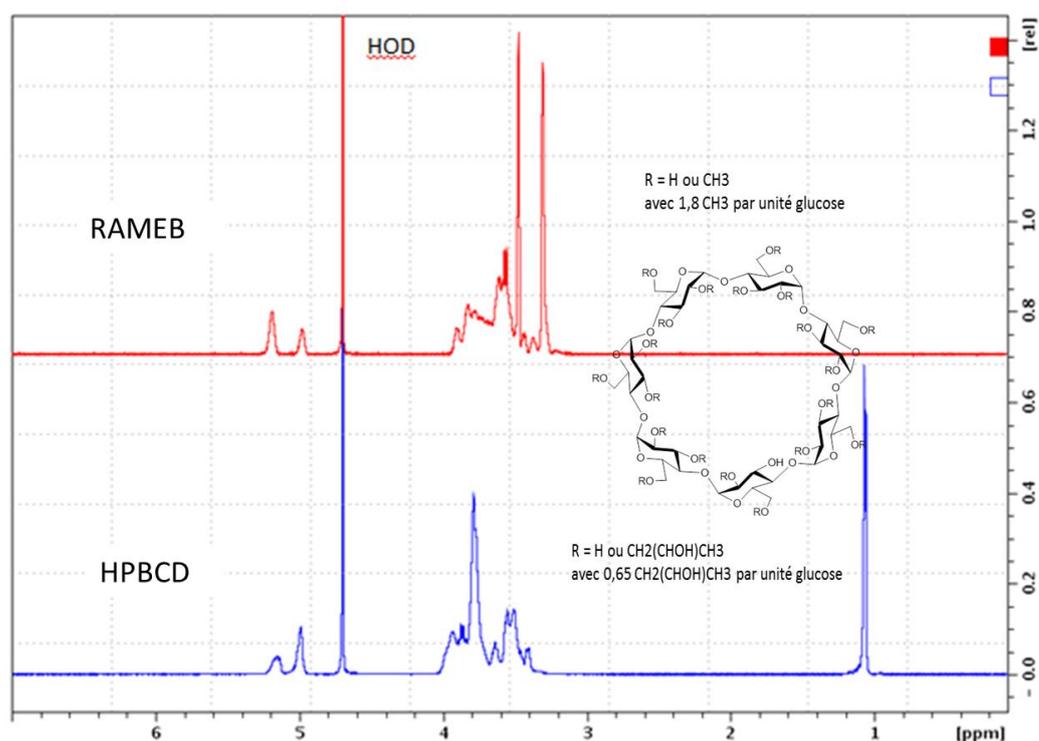


Figure 16 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, 300 K) de la RAMEB (5 mM dans D_2O) et de l'HPBCD (5 mM dans D_2O)

Les spectres RMN ^1H de la RAMEB et de l'HPBCD ont révélé des signaux larges en raison de leur caractère multi-composant (**Figure 16**). Par conséquent, il s'avère difficile de mettre en évidence les variations de déplacements chimiques des protons H-3, H-5 pour ces cyclodextrines en cas d'inclusion d'une molécule invitée. Par la suite, seuls les spectres impliquant la RAMEB, cyclodextrine qui a montré le meilleur effet solubilisant vis-à-vis de la méfloquine, sont présentés.

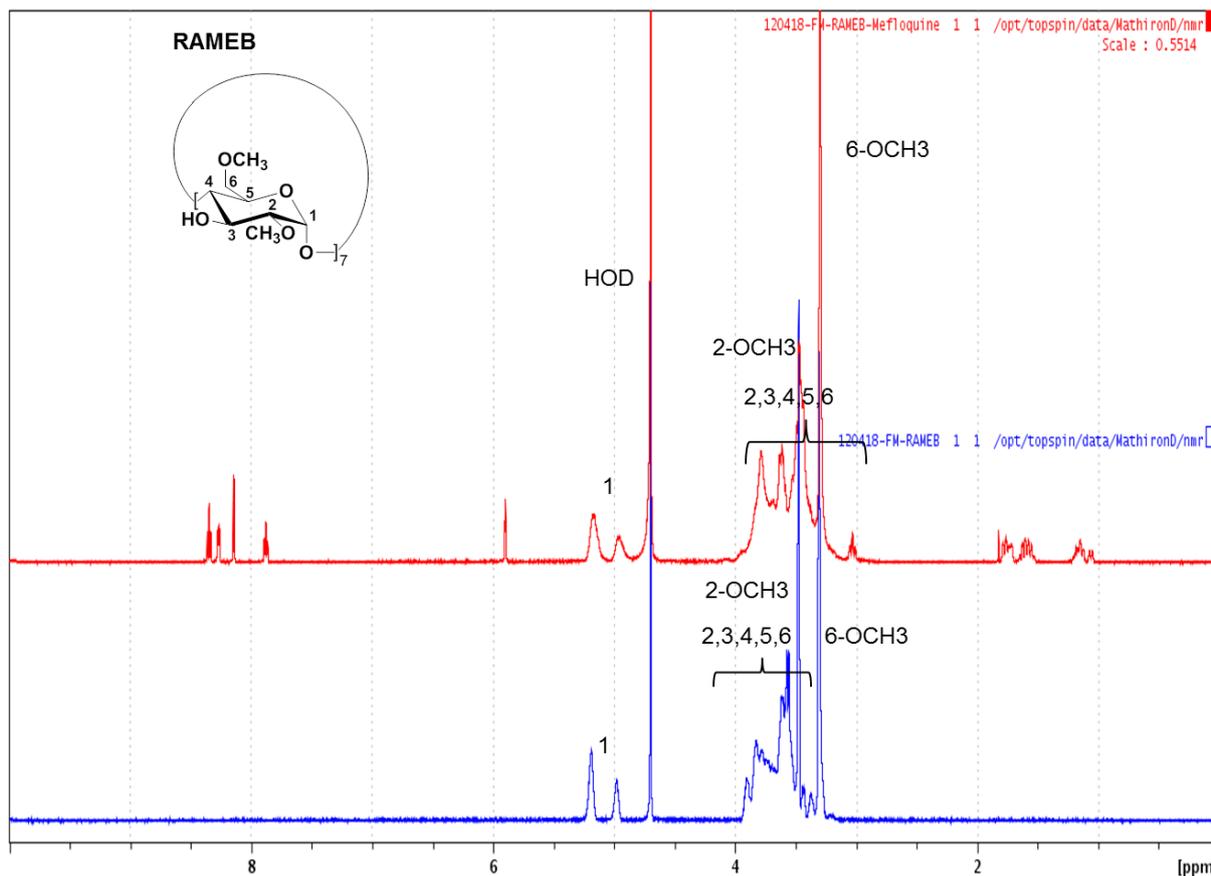


Figure 17 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, 300 K) de la RAMEB (5 mM dans D_2O) en présence (en haut) et en absence (en bas) de méfloquine (5 mM dans D_2O)

En comparant les spectres RMN ^1H de la RAMEB en absence et en présence de méfloquine, il a été observé une modification de l'enveloppe spectrale dans la zone entre 3 et 4 ppm indiquant des variations de déplacements chimiques pour certains protons (**Figure 17**). Ceci montre qu'il existe une interaction entre la RAMEB et la méfloquine mais à ce stade il n'est pas possible d'affirmer qu'il s'agisse d'un phénomène d'inclusion.

En considérant les spectres RMN ^1H de la méfloquine seule et en présence de RAMEB, il a été observé des variations de déplacements chimiques des signaux des protons de la méfloquine confirmant l'interaction non covalente entre les deux partenaires. En présence de RAMEB, la plupart des protons de la méfloquine se sont déplacés vers les champs faibles (déblindage) ce qui montre un changement dans la polarité de l'environnement de la méfloquine suite à l'interaction [53]. De plus, le spectre RMN ^1H de la méfloquine s'est complexifié avec un éclatement plus ou moins important de l'ensemble des signaux. Ceci peut être attribué à la différenciation chirale des protons de la méfloquine correspondant à la séparation de ses deux énantiomères en formant des complexes diastéréoisomériques [54]. Il a été observé un éclatement important des signaux pour les protons H-3 et H-5. Du fait de la complexation avec la RAMEB, les protons H-3 de chaque énantiomère de la méfloquine se sont totalement séparés alors que les protons H-5 ne se sont que partiellement séparés puisque les deux doublets se chevauchent pour donner un signal ressemblant à un triplet.

Pour les protons H-6 et H-7, un début de séparation des énantiomères avec un dédoublement des triplets et doublets respectivement a été perçu (**Figure 18**).

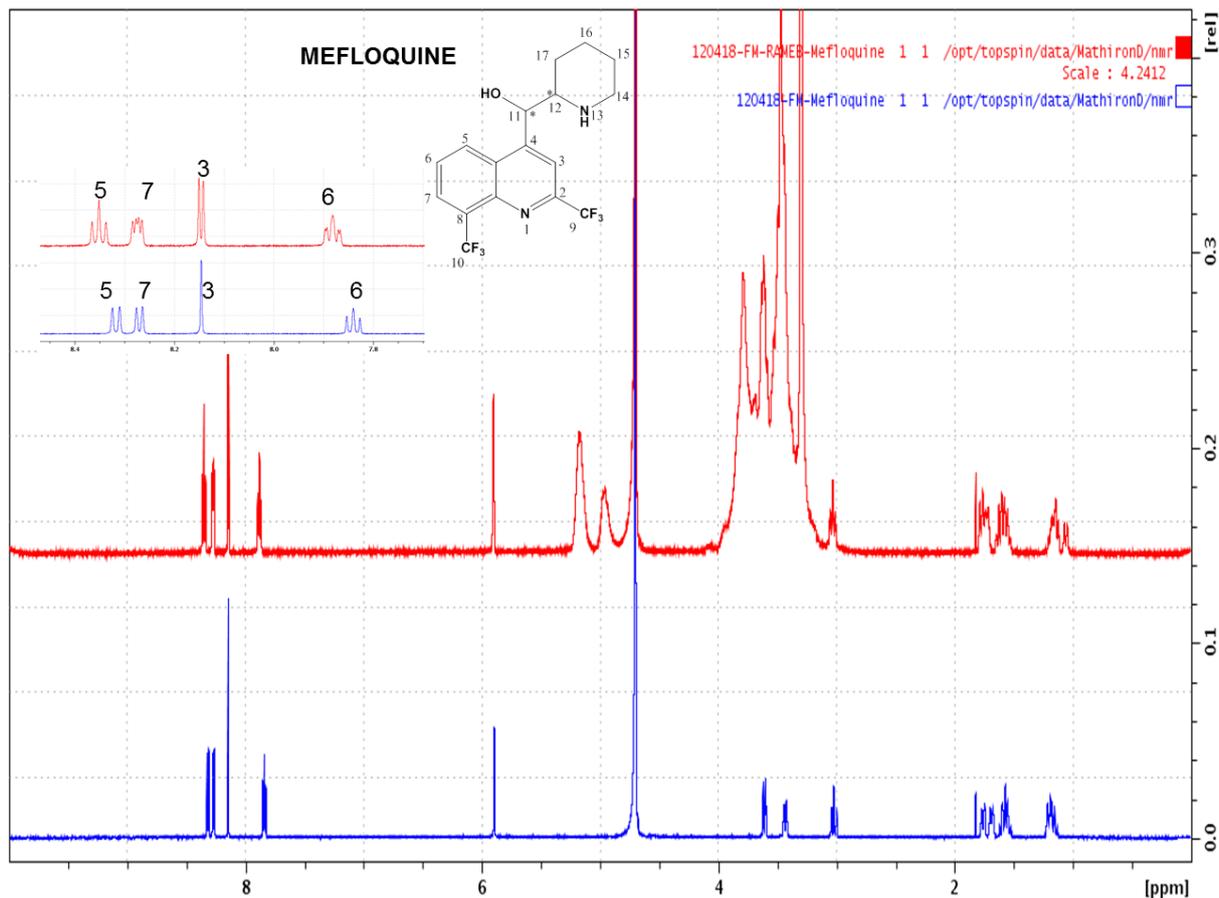


Figure 18 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, 300 K) de la méfloquine (5 mM dans D_2O) en présence (en haut) et en absence (en bas) de RAMEB (5 mM dans D_2O). Agrandissement sur la zone des protons aromatiques de la méfloquine

La méfloquine possédant des atomes de fluor dans sa structure avec deux groupements CF_3 , les signaux RMN ^{19}F de la méfloquine seule et en présence de RAMEB ont été analysés (**Figure 19**).

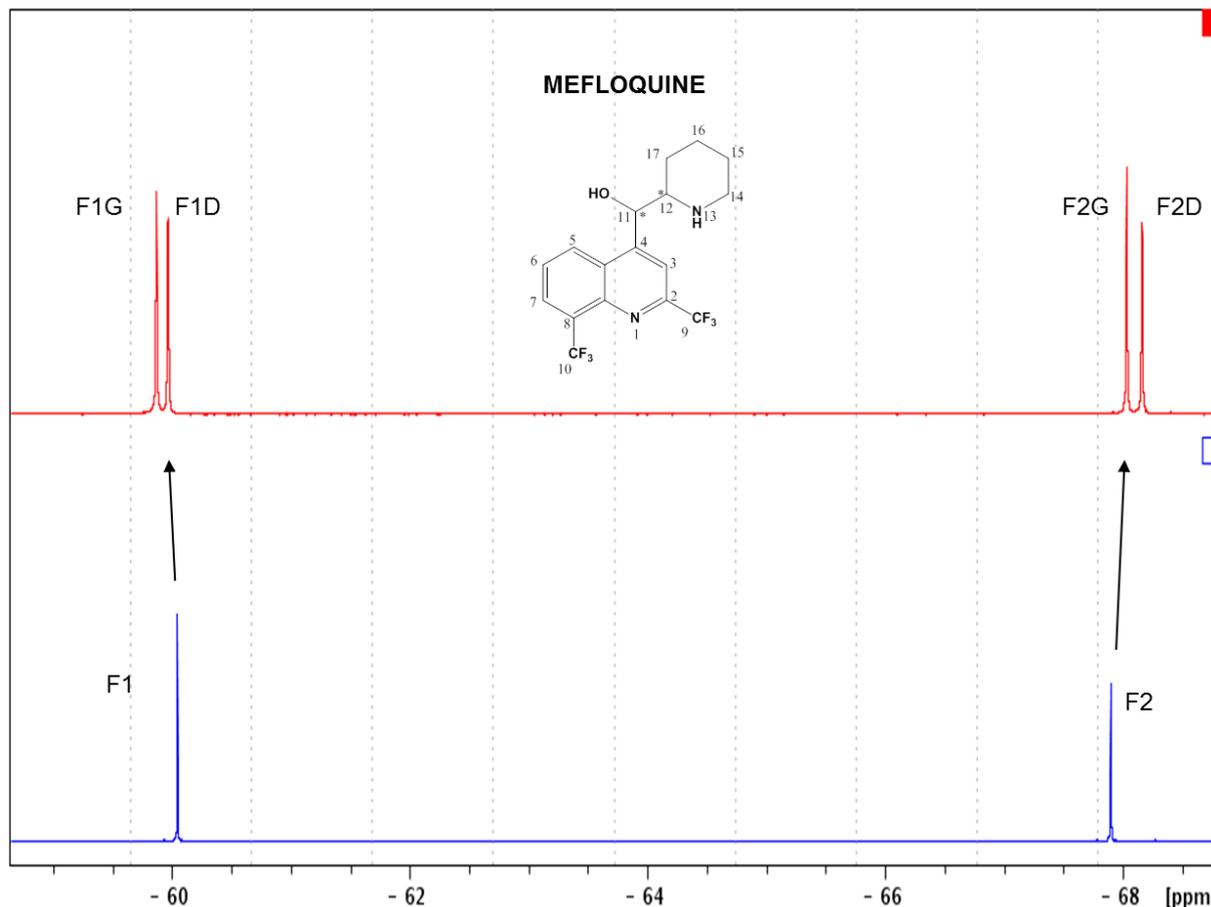


Figure 19 : Spectre RMN ^{19}F (564 MHz, 300 K) partiel de la méfloquine (5 mM dans D_2O) en présence (en haut) et en absence (en bas) de RAMEB (5 mM dans D_2O). F1 : signal du fluor le plus déblindé ; F2 : signal du fluor le plus blindé ; F1/2G et F1/2D : signaux de gauche (plus déblindé) et de droite (plus blindé) des fluors correspondants

Sur le spectre RMN ^{19}F de la méfloquine, deux singulets ont été distingués vers -60 ppm et -68 ppm correspondant aux deux groupements CF_3 . En présence de RAMEB et sous l'influence de la complexation, des variations des déplacements chimiques ont de nouveau été observées ainsi qu'un dédoublement des signaux de la méfloquine dû à la séparation des deux énantiomères ($\text{F1} \rightarrow \text{F1G} + \text{F1D}$, $\text{F2} \rightarrow \text{F2G} + \text{F2D}$). En présence de RAMEB, les signaux ^{19}F de la méfloquine n'évoluaient pas dans le même sens à savoir que le fluor F1 vers -60 ppm s'est déblindé alors que le signal F2 vers -68 ppm s'est blindé (**Figure 19**).

Pour tenter de savoir si la méfloquine interagit avec la RAMEB via la formation d'un complexe d'inclusion ou par association avec l'extérieur de la RAMEB, il convient d'utiliser son modèle chimiquement pur, la DIMEB.

Contrairement à la RAMEB, les signaux RMN ^1H de la DIMEB étaient bien résolus (**Figure 20**). En présence de méfloquine, les variations de déplacements chimiques étaient importantes pour le proton H-3 (-0,1 ppm) et faibles pour le proton H-5 de la DIMEB. Les variations des déplacements chimiques de ces protons se trouvant à l'intérieur de la cavité témoignent de la formation d'un complexe d'inclusion entre la DIMEB et la méfloquine. Les

variations de déplacements chimiques étaient également assez importantes (- 0,04 ppm) pour les protons H-1, H-4, H-6 et 2-OCH₃. Le blindage des protons de la DIMEB s'explique par les effets d'anisotropie et de courants d'anneaux créés par l'invité de structure aromatique [53]. A ce stade, il n'est pas possible d'exclure l'existence d'une association de la méfloquine avec l'extérieur de la DIMEB (**Figure 20**).

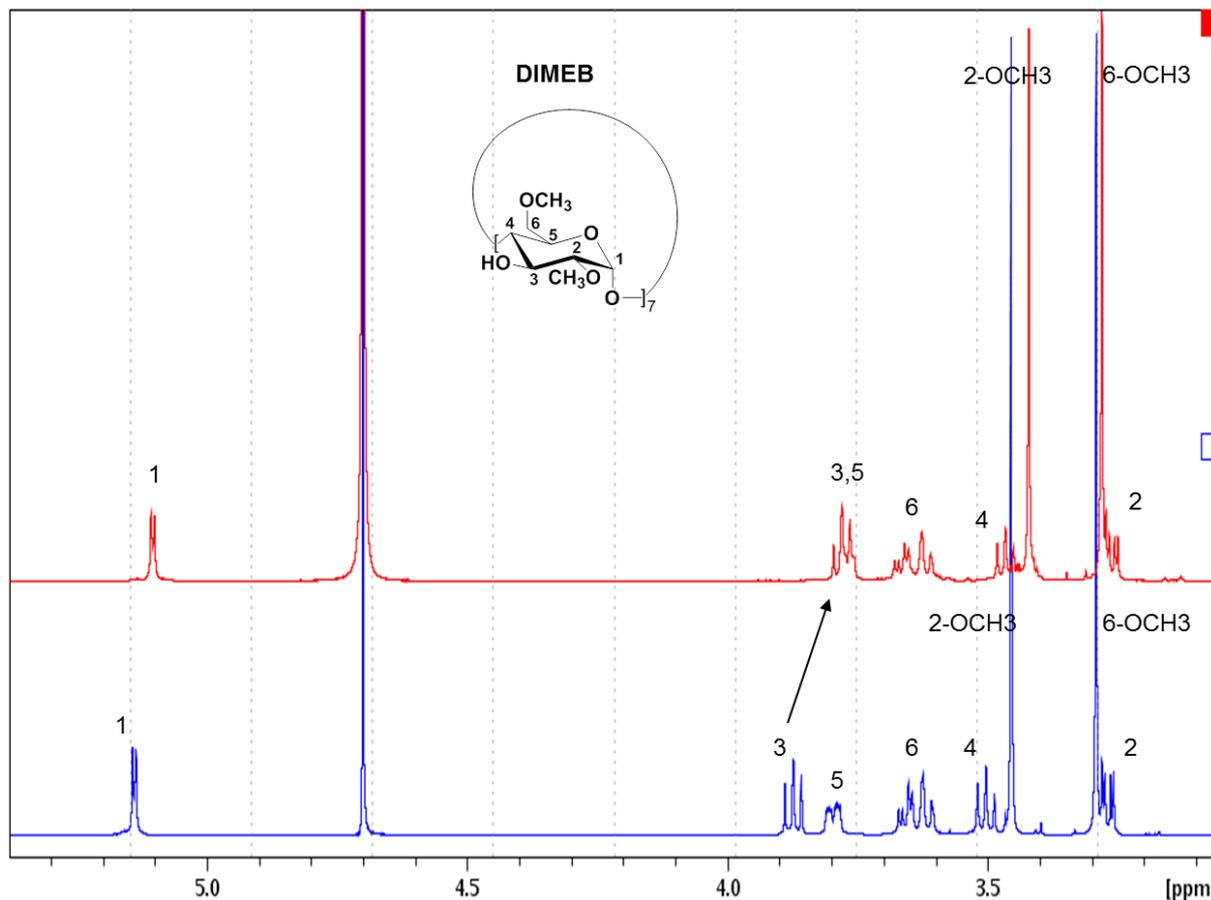


Figure 20 : Spectre RMN ¹H (600 MHz, 300 K) partiel de la DIMEB (5 mM dans D₂O) en présence (en haut) et en absence (en bas) de méfloquine (5 mM dans D₂O)

Sur le spectre RMN ¹H de la méfloquine en présence de DIMEB, il a été observé comme précédemment avec la RAMEB des variations des déplacements chimiques importantes ainsi qu'un éclatement de l'ensemble des signaux des protons aromatiques de la méfloquine et par conséquent une séparation nette des deux énantiomères de la méfloquine (**Figure 21**).

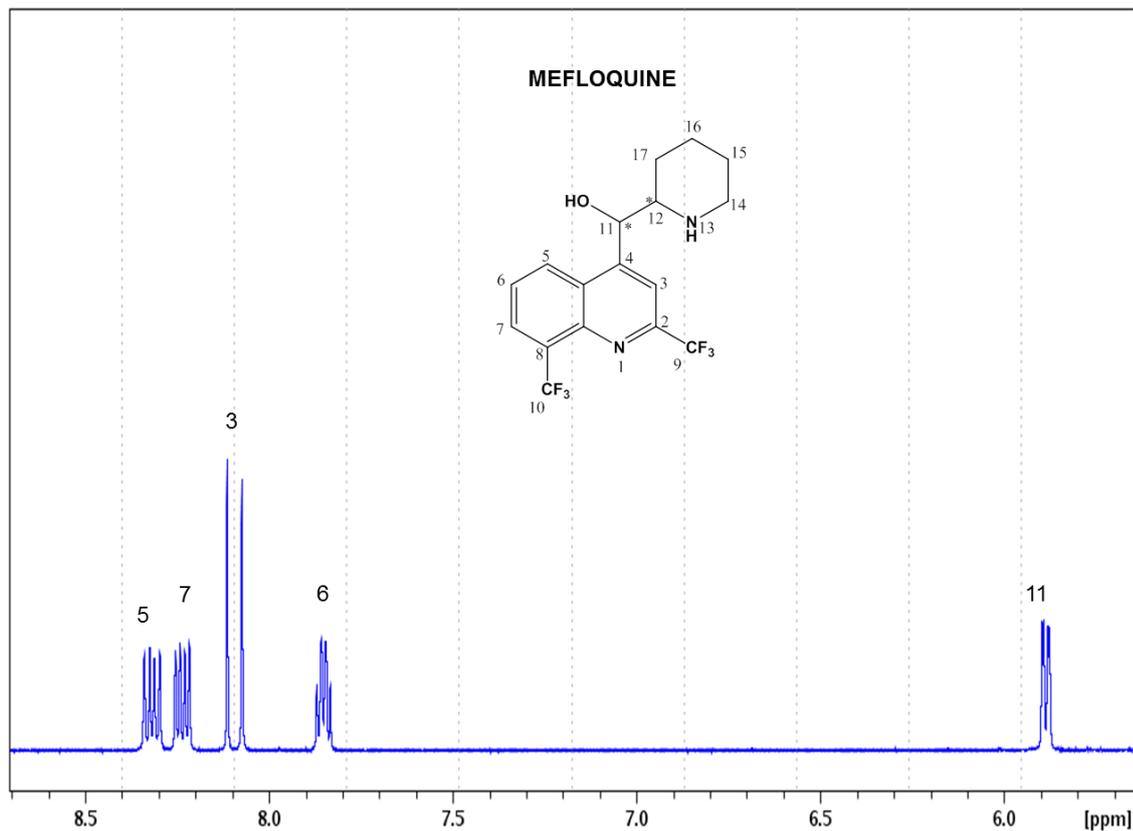


Figure 21 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, 300 K) partiel de la méfloquine (5 mM dans D_2O) en présence de DIMEB (5 mM dans D_2O)

La méfloquine semble interagir en solution avec la DIMEB de deux manières en formant soit un complexe d'inclusion soit un complexe d'association avec l'extérieur de la cyclodextrine.

Afin d'obtenir davantage d'informations sur les interactions méfloquine-DIMEB, une expérience T-ROESY a été conduite. La présence de tâches de corrélation intermoléculaires correspondant aux couplages dipolaires entre les protons de la méfloquine et ceux de la DIMEB confirme l'interaction entre ces deux composés. Sur la carte T-ROESY, l'intensité des tâches peut être corrélée à la proximité spatiale entre les noyaux. Les deux tâches de corrélation les plus intenses correspondent à l'interaction entre les protons H-11 et H-5 de la méfloquine et le proton H-6 de la DIMEB (**Figure 22**)(**Figure 23**). Le proton H-7 des deux énantiomères interagit avec la DIMEB au niveau des protons H-6 et H-3 et/ou H-5 (**Figure 23**).

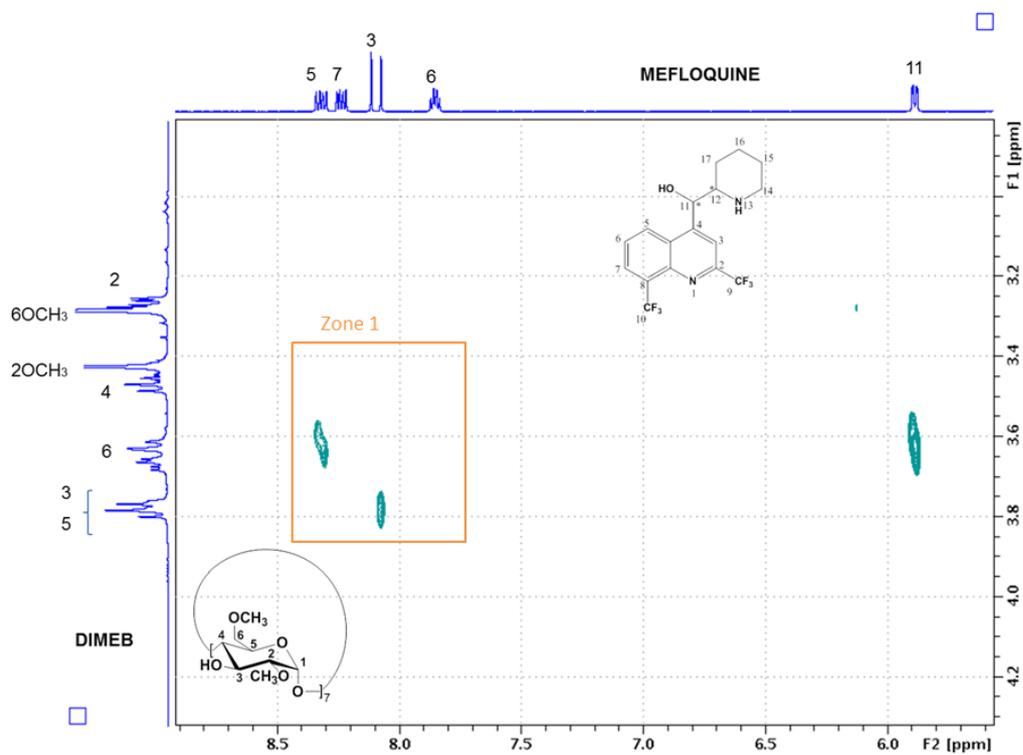


Figure 22 : Carte T-ROESY partielle de la méfloquine (5 mM dans D₂O) en présence de DIMEB (5 mM dans D₂O)

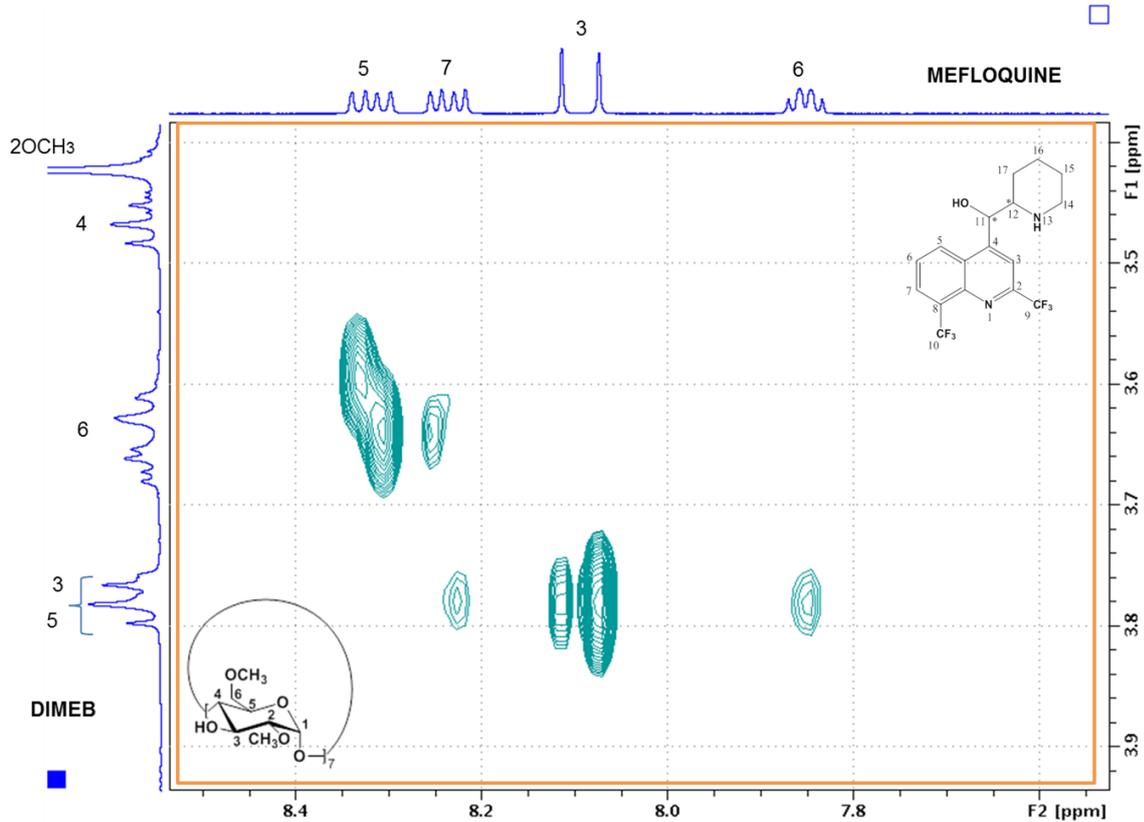


Figure 23 : Agrandissement de la zone 1 de la carte T-ROESY partielle de la méfloquine (5 mM dans D₂O) en présence de DIMEB (5 mM dans D₂O)

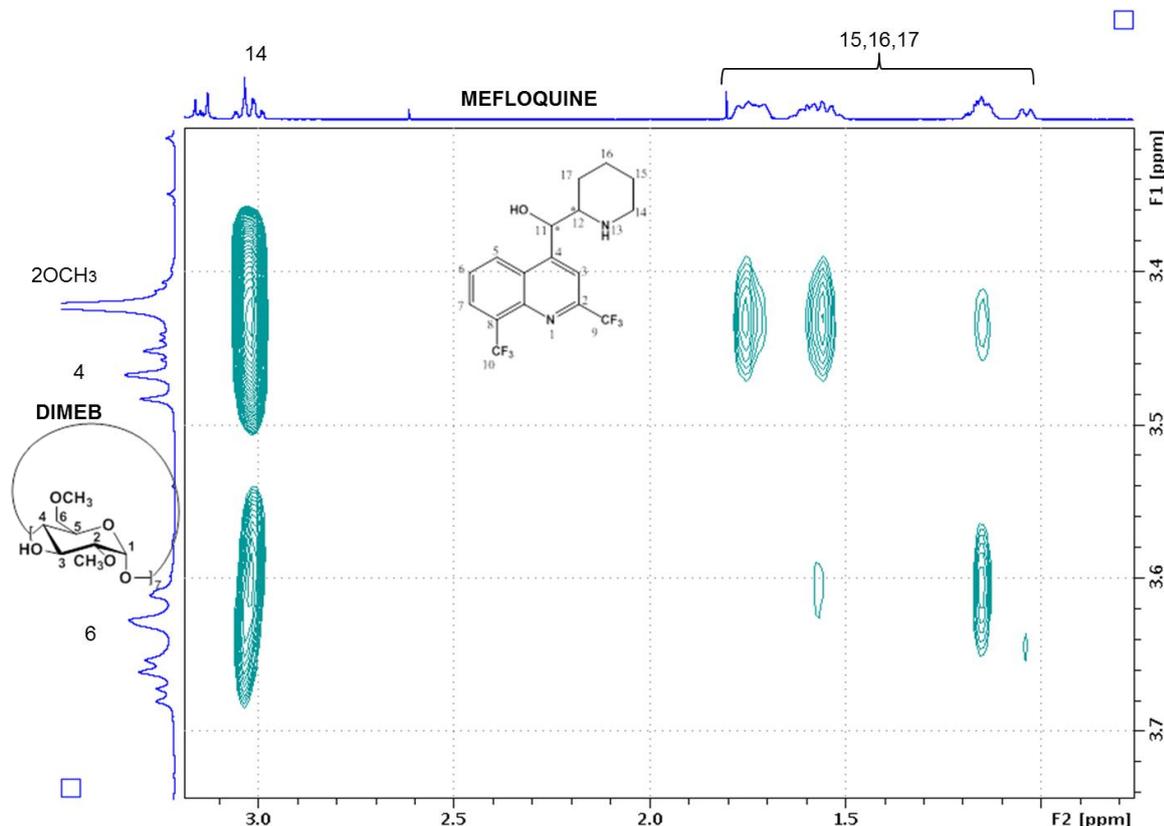


Figure 24 : Carte T-ROESY partielle de la méfloquine dans la zone des protons aliphatiques (5 mM dans D₂O) en présence de DIMEB (5 mM dans D₂O)

Les tâches de corrélation entre les protons H-6, H-4 et 2-OCH₃ de la DIMEB et les protons aliphatiques du cycle pipéridine, notamment le proton H-14, étaient moins intenses qu'avec les protons précédents (**Figure 24**).

Le nombre important d'interactions entre les protons H-3 et H-5 de la DIMEB et les protons de la méfloquine a témoigné de l'existence de différents complexes d'inclusion. Afin de compléter la caractérisation des complexes RAMEB-méfloquine et HPBCD-méfloquine, la stœchiométrie du complexe et la valeur de la constante d'association ont été déterminées. Pour cela des approches graphiques ont été utilisées en se basant sur des expériences RMN ¹⁹F en observant les variations des déplacements chimiques des fluors de la méfloquine en fonction de la concentration en cyclodextrine.

Les expériences RMN ¹⁹F conduites selon la méthode de Job ont permis de visualiser un éclatement des signaux ¹⁹F pour des concentrations de RAMEB et d'HPBCD respectivement égales à 1/10^e et 2/10^e de la concentration totale. La distance séparant les signaux ¹⁹F a augmenté de manière plus importante, parallèlement au ratio de cyclodextrine avec la RAMEB suggérant une interaction plus forte avec la RAMEB qu'avec l'HPBCD. En présence de cyclodextrine, les variations des déplacements des fluors nommés F1G et F2D se sont

révélées semblables tout comme les variations des déplacements de F1D et F2G. Ces signaux dédoublés sembleraient correspondre aux signaux des deux énantiomères et l'un des énantiomères a subi une variation plus importante de ses déplacements chimiques en présence de cyclodextrines (Figure 25).

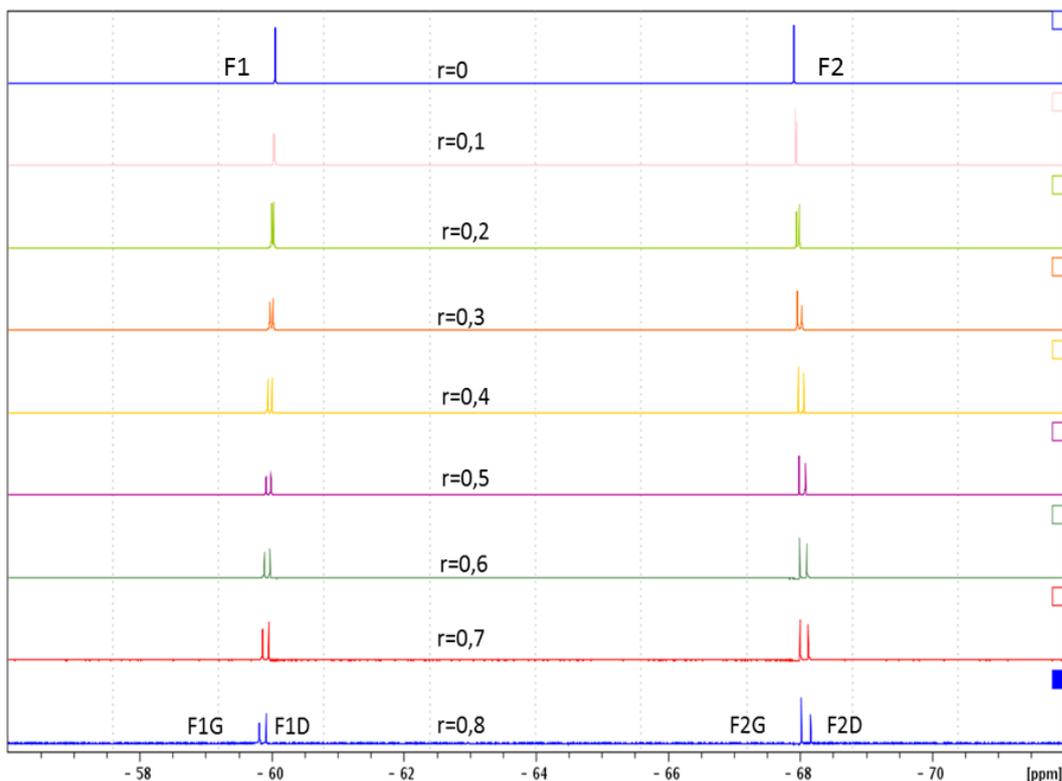


Figure 25 : Spectres RMN ^{19}F (564 MHz, 300 K) partiels de la méfloquine en présence de RAMEB obtenus en faisant varier r (r = fraction molaire de RAMEB)

Pour chaque cyclodextrine, les courbes polynomiales $\Delta\delta * [MQ] = f(r)$ tracées grâce au déplacement des fluors ont présenté un maximum pour $r = 0,5$ (Figure 26) conférant aux complexes une stœchiométrie 1:1.

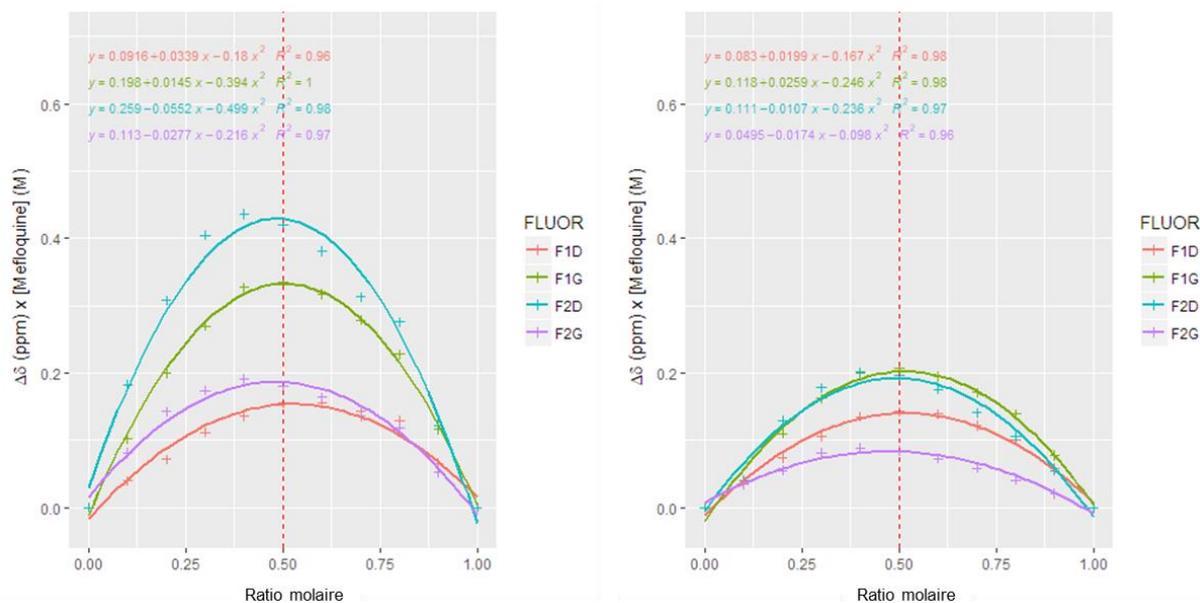


Figure 26 : Évolution de la variation de déplacement chimique pour les signaux du fluor en fonction du ratio molaire en présence de RAMEB (à gauche) et de HPBCD (à droite)($n=1$)

La méthode de Benesi-Hildebrand a permis d'accéder aux valeurs des constantes d'association K_a des différents complexes. L'aspect linéaire des tracés obtenus a confirmé la stœchiométrie de type 1:1. Les signaux des fluors se sont dédoublés dès la plus petite concentration de cyclodextrine. La distance séparant les pics des fluors a augmenté avec la concentration en cyclodextrine. Pour chaque cyclodextrine, les 4 graphiques correspondant au dédoublement des 2 fluors ont présenté une bonne linéarité ($R^2 > 0,95$) (**Figure 27**). Les signaux F1G et F2D ont présenté la variation de déplacement chimique la plus importante. Les valeurs moyennes des constantes d'association correspondant aux signaux F1G et F2D, et aux signaux F2G et F1D ont été mesurées respectivement à 64 M^{-1} et 42 M^{-1} pour l'HPBCD et 53 M^{-1} et 20 M^{-1} pour la RAMEB, valeurs qui sont faibles pour des complexes de cyclodextrine.

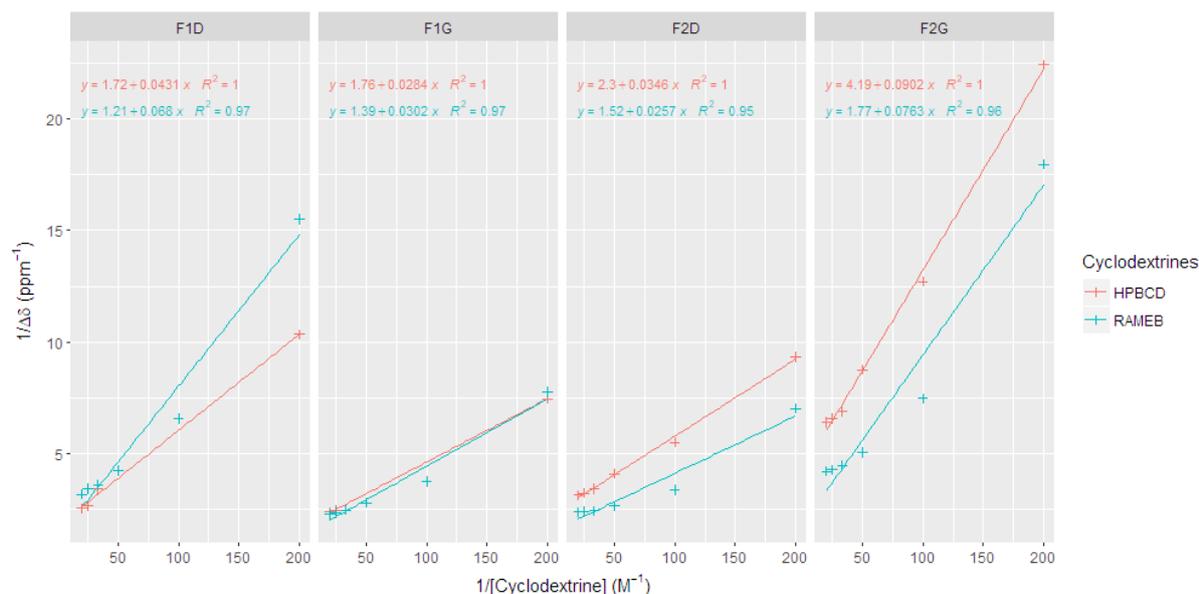


Figure 27 : Détermination graphique de la constante d'association de la méfloquine pour HPBCD et RAMEB par la méthode de Benesi-Hildebrand. $\Delta\delta$: variation des déplacements chimiques ; F1 et F2 : signal du fluor le plus déblindé et le moins déblindé ; FG et FD : signaux de gauche et de droite des fluors ($n=1$)

Par la suite, les signaux RMN ¹⁹F et ¹H appartenant aux deux énantiomères de la méfloquine ont été attribués. L'expérience RMN ¹⁹F ne permettait pas de différencier directement les signaux des deux énantiomères qui sont sortis aux mêmes valeurs de déplacement chimique (**Figure 28**). En présence de DIMEB, nous avons observé pour le mélange racémique de méfloquine une séparation des signaux ¹⁹F des énantiomères grâce à la formation de complexes diastéréoisomériques. L'ajout de l'énantiomère pur 11R,12S au mélange racémique a permis de créer un excès énantiomérique qui s'est traduit par l'augmentation de l'intensité de deux des signaux sur le spectre ¹⁹F. Il a été possible d'attribuer les signaux F1G et F2D à l'énantiomère 11S,12R et les signaux F1D et F2G à l'énantiomère 11R,12S. Il est désormais possible d'affirmer que l'énantiomère 11S,12R présente une association légèrement plus affine pour la DIMEB que l'énantiomère 11R,12S.

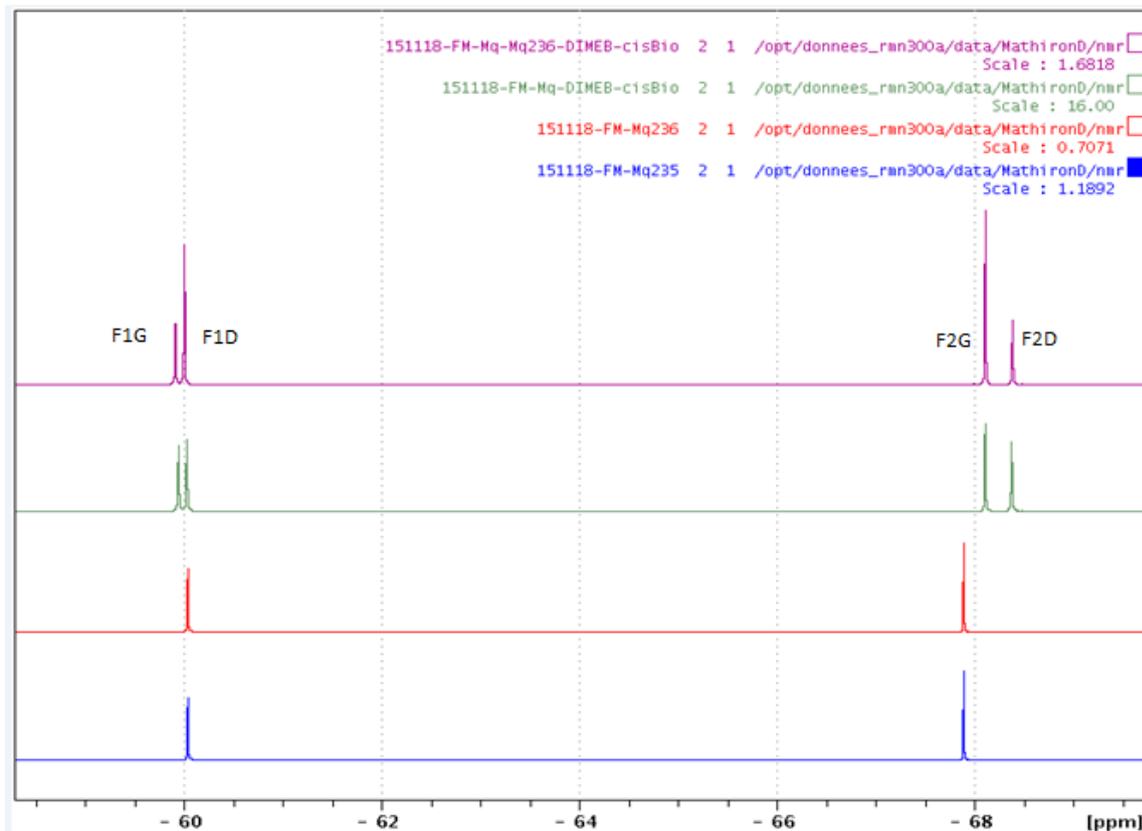


Figure 28 : Spectres RMN ^{19}F partiels des énantiopurs 11S,12R (bleu) et 11R,12S (rouge), du mélange racémique - DIMEB (vert) et du mélange racémique - 11R,12S - DIMEB (violet) (5mM dans D_2O)

De la même manière que précédemment, l'ajout de l'énantiomère 11R,12S au racémique de méfloquine a rendu possible l'attribution en RMN ^1H des signaux des protons aromatiques des deux énantiomères. Les protons H-3, H-5 et H-11 de l'énantiopur 11R,12S sont plus déblindés que ceux de l'énantiopur 11S,12R tandis que ce constat est inversé pour les protons H-6 et H-7 (**Figure 29**).

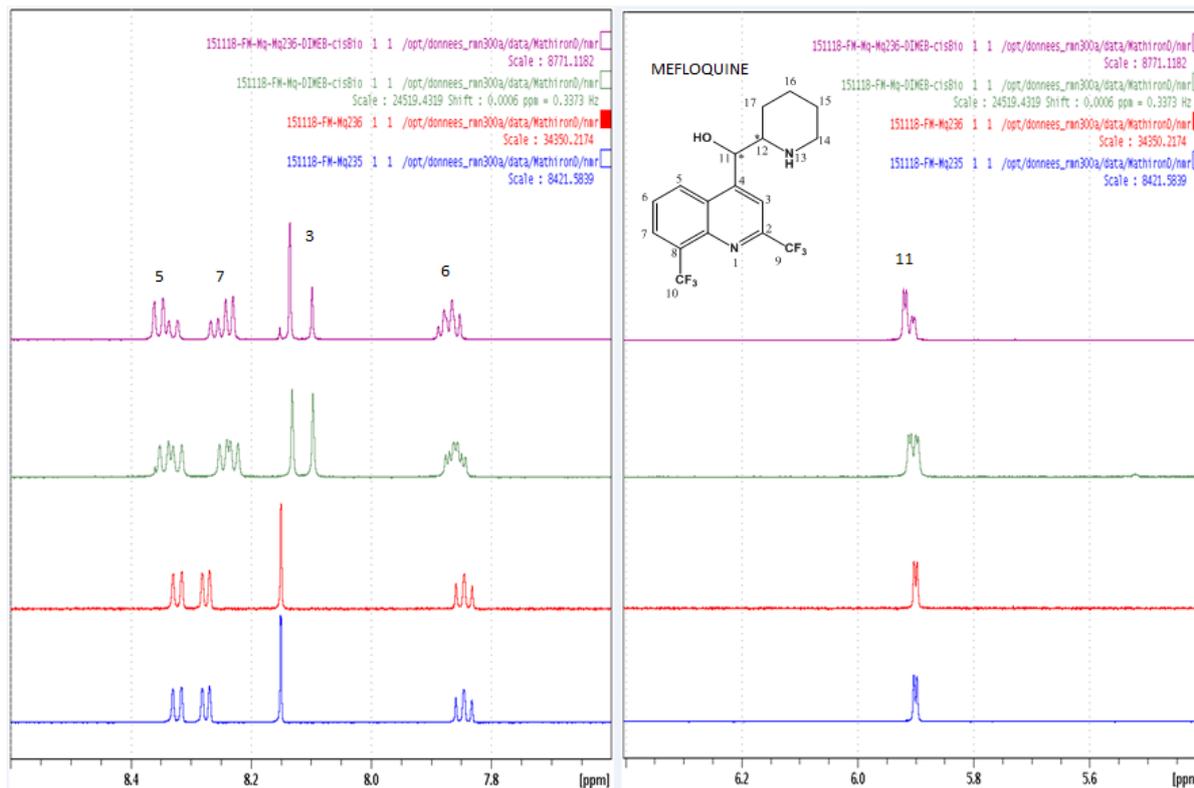


Figure 29 : Spectres RMN ^1H partiels des énantiopurs 11S,12R (bleu) et 11R,12S (rouge), du mélange racémique - DIMEB (vert) et du mélange racémique - 11R,12S - DIMEB (violet) (5mM dans D_2O)

Concernant l'étude structurale des complexes d'inclusion, l'expérience T-ROESY n'a pas permis de mettre en évidence des modes d'interaction différents entre chaque énantiomère de la méfloquine et la DIMEB. Les tâches de corrélation entre les protons du mélange racémique - énantiopur 11R,12S et ceux de la DIMEB étaient identiques de manière qualitative et quantitative aux tâches de corrélation entre les protons du racémique et de la DIMEB. Cela suggère que les deux énantiomères s'associent avec la DIMEB en formant de nombreux complexes d'inclusion qui ne sont pas propres à l'un ou l'autre des énantiomères.

3.5. Stabilité des solutions de méfloquine en présence de cyclodextrines

3.5.1. Dégradation forcée

La méfloquine n'a pas été altérée, dans les conditions expérimentales éprouvées, par la lumière UV-visible utilisée dans les conditions de l'étude de photostabilité (7500 lux, 1,1 W/m^2 , 250-785 nm) [49], la thermo dégradation (60 °C ou 70 °C) ou l'oxydation (H_2O_2 3 % à 30 %).

Aucune dégradation de la méfloquine n'a été observée aux faibles concentrations d'HCl (0,1 N, 0,33 N) et seulement 25 % et 12 % de méfloquine étaient retrouvés aux concentrations les plus fortes d'HCl (0,5 N, 1 N). Cette dégradation s'est présentée sous la forme d'une réduction de l'aire du signal de méfloquine et l'apparition de nouveaux signaux présentant un spectre UV identique à celui de la méfloquine. Le produit de dégradation primaire formé avec HCl 0,5 N, de signal 2,9 fois plus intense que le signal de la méfloquine à 283 nm, présentait un temps de rétention plus faible (5,5 min) que la méfloquine tout comme le produit de dégradation secondaire formé avec HCl 1 N (4,7 min) qui possédait un signal 7 fois plus intense que le signal de la méfloquine (**Figure 30**)(**Figure 31**).

La méfloquine a été dégradée par le réactif basique dès la plus faible concentration (0,1 N). Les pourcentages résiduels de méfloquine étaient respectivement de 96 %, 21 %, 6 % et 1 %. Le produit de dégradation formé présentait également un temps de rétention plus faible (5,2 min) mais sa présence était moins marquée avec NaOH 0,33 N (1,5 % du signal de la méfloquine) qu'avec NaOH 0,1 N (2,6 % du signal de la méfloquine). Le spectre UV du produit de dégradation formé en présence de NaOH 0,33 N ressemblait moins au spectre UV de la méfloquine que le spectre UV du produit de dégradation formé avec NaOH 0,1 N (**Figure 30**)(**Figure 31**).

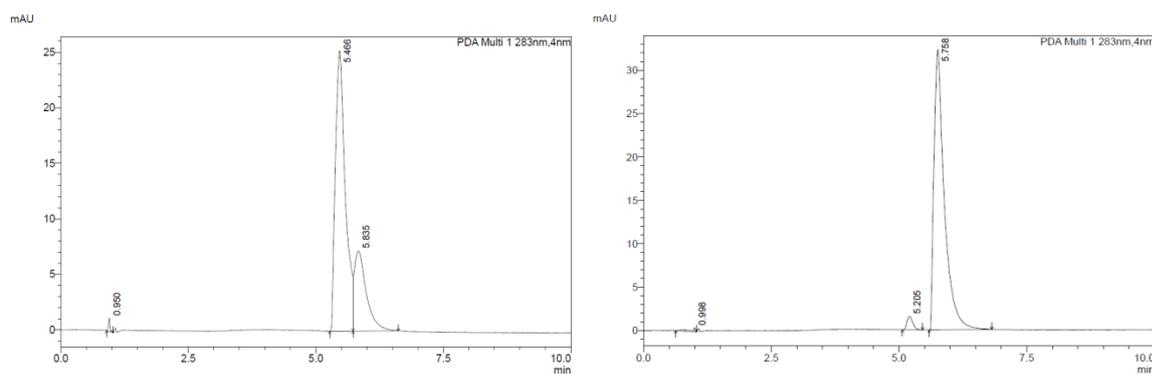


Figure 30 : Chromatogramme UHPLC-UV à 283 nm de la méfloquine à 1 mg/mL dans l'acétonitrile diluée au demi dans HCl 0,5 N (à gauche) et NaOH 0,1 N (à droite)

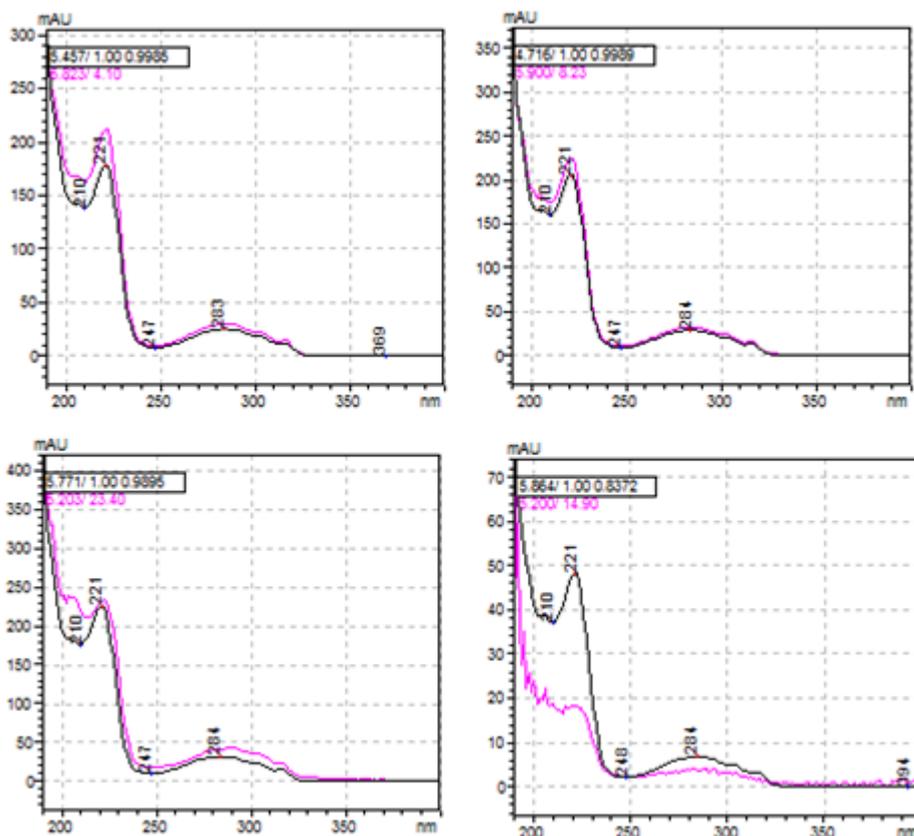


Figure 31 : Spectres UV de la méfloquine (en noir) et de ses produits de dégradation (en rose) formés en présence de HCl 0,5 N (en haut à gauche), HCl 1 N (en haut à droite), NaOH 0,1 N (en bas à gauche) et NaOH 0,33 N (en bas à droite)

3.5.2. Dégradation en temps réel

Concernant les solutions de méfloquine préparées dans le tampon citrate 50 mM pH 3,0, la concentration de méfloquine est restée dans la fourchette [90-110] % de la valeur initiale pour toutes les solutions conservées sous exposition lumineuse pendant 120 jours et à l'obscurité pendant 90 jours (**Figure 32**).

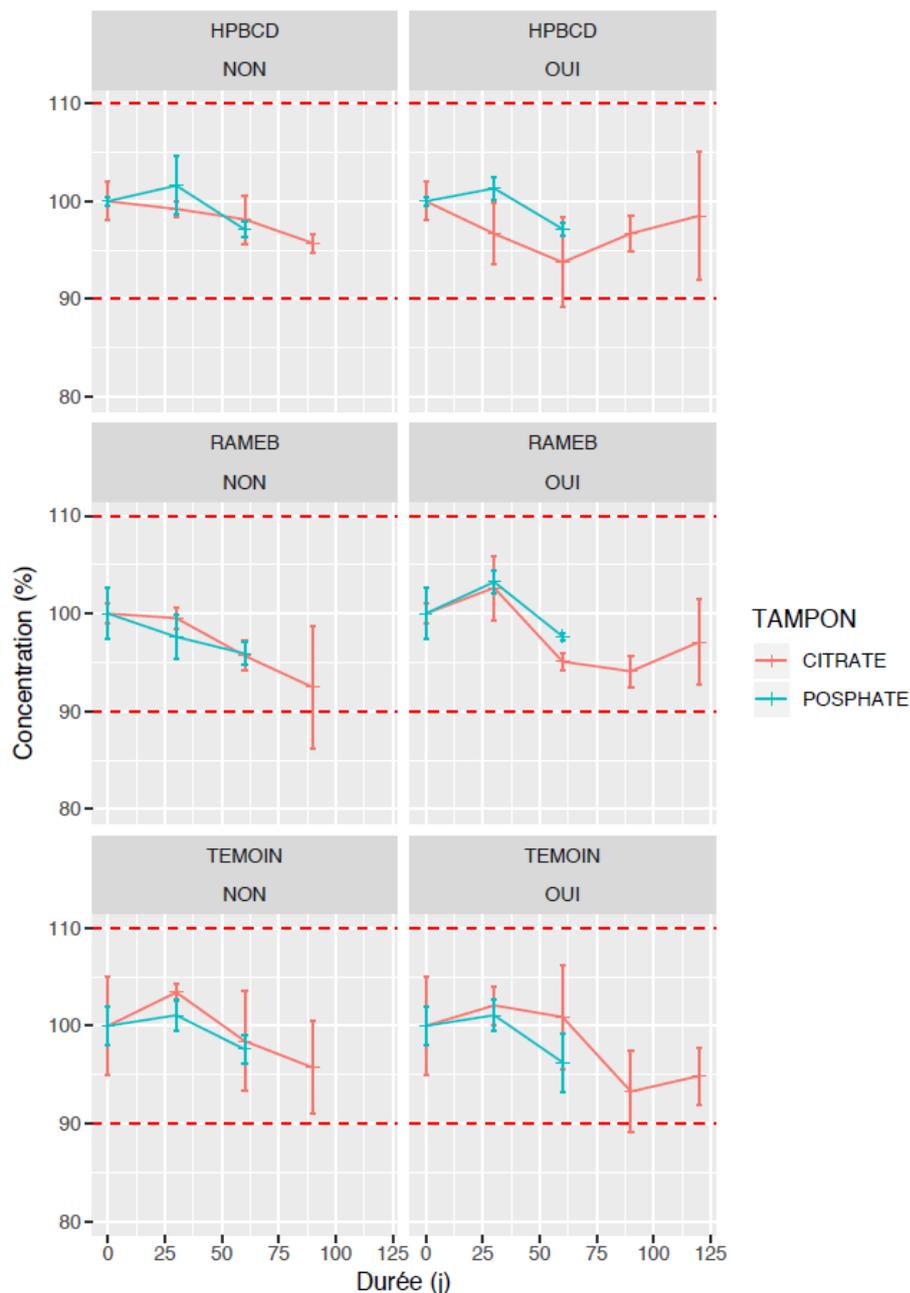


Figure 32 : Évolution de la teneur initiale en méfloquine en solution en fonction du temps, en présence de HPBCD (en haut), RAMEB (au centre) ou sans cyclodextrine (en bas), sous exposition lumineuse (à droite) ou non (à gauche) dans le tampon citrate (ligne rouge) ou phosphate (ligne bleue). Fourchette cible (ligne pointillée rouge)($n=3$, moyenne \pm écart-type)

Les solutions initiales étaient limpides et exemptes de particules visibles à l'œil nu. Les solutions conservées sous exposition lumineuse ont présenté une coloration jaunâtre à partir de 60 jours sans que cela n'ait pu être corrélé avec l'apparition d'un produit de dégradation détecté en UV. Des produits de dégradation sont apparus à partir de 60 jours mais aucun ne présentait un signal supérieur à 0,5 % du signal de méfloquine (**Tableau III**). Ces produits

ont été qualifiés de produits de dégradation car leur spectre UV était au moins en partie similaire au spectre UV de la méfloquine. Les produits de dégradation possédant le spectre UV le plus proche de celui de la méfloquine sont ceux formés au bout de 90 jours sous exposition lumineuse dans le tampon citrate en présence d'HPBCD. D'une manière générale, ces produits de dégradation étaient présents dans les solutions contenant des cyclodextrines ou non et conservées à la lumière ou non (**Figure 33**).

Tableau III : Produits de dégradation formés lors de l'étude de stabilité

Produit de dégradation (PDD)	Temps de rétention (min)	Surface du pic de méfloquine (%)	Conditions
PDD1	2,1	0,25	tampon citrate, J90, UV, HPBCD
PDD2	3,1	0,39	tampon citrate, J90, UV, HPBCD
PDD3	4,2	0,17	tampon citrate, J60, abri de la lumière, HPBCD tampon citrate, J90, abri de la lumière, HPBCD et
PDD4	5,2	0,10-0,42	RAMEB et methanol

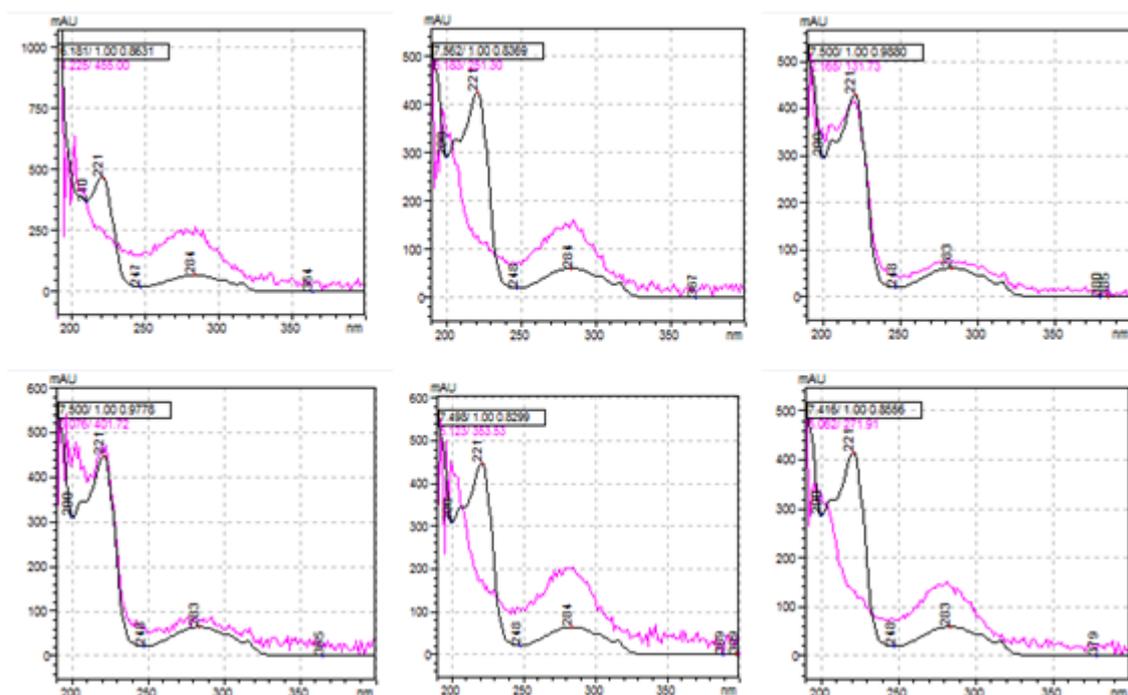


Figure 33 : Spectres UV de la méfloquine (en noir) et de ses produits de dégradation (en rose) formés dans les conditions suivantes : tampon citrate, 60 jours, noir, HPBCD (en haut à gauche), tampon citrate, 90 jours, noir, HPBCD (en haut au centre), tampon citrate, 90

jours, UV, HPBCD (en haut à droite et en bas à gauche), tampon citrate, 90 jours, noir, RAMEB (en bas au centre), tampon citrate, 90 jours, noir, methanol (en bas à droite)

Dans le tampon phosphate 80 mM pH 2,7, la concentration résiduelle de méfloquine est restée dans la fourchette [90-110] % pour toutes les solutions conservées à l'obscurité ou sous exposition lumineuse pendant 60 jours (**Figure 32**). Toutes les solutions sont restées limpides et exemptes de particules pendant 60 jours. Aucun produit de dégradation avec une structure UV similaire à celle de la méfloquine n'est apparu au bout de 60 jours.

4. Discussion

4.1. Méthode de dosage de la méfloquine

Les méthodes de dosage de la méfloquine par UHPLC-UV publiées dans les pharmacopées européenne [55] et américaine [56] et dans la littérature scientifique [57–60] n'ont pas été transposées afin de s'adapter à l'évolution du matériel à disposition, d'optimiser la durée de l'analyse et de pouvoir ultérieurement transposer cette méthode à l'analyse par spectrométrie de masse ce qui empêche l'utilisation des tampons phosphate. La méthode de dosage s'est avérée linéaire sur l'intervalle de dosage [50 – 5000] µg/mL qui encadre les valeurs de solubilité ultérieurement mesurées.

4.2. Solubilité et solubilisation de la méfloquine

La composition du solvant, sa température, la durée d'agitation, le temps de sédimentation et la rétention du principe actif sur les filtres ou les instruments sont des facteurs connus comme pouvant impacter l'équilibre de solubilité, sa vitesse d'obtention et la solubilité mesurée du principe actif [61].

Lors des études de solubilité de la méfloquine dans les différents tampons, un effet notable du pH a été retrouvé. Les tampons les plus acides (p.ex. tampon phosphate 80 mM, pH 2,6) solubilisent mieux la méfloquine que les tampons à pH plus neutre (p.ex. tampon phosphate 50 mM, pH 6,5). Le tampon citrate (50 mM, pH 2,7) constituait une exception à ces observations, la solubilité du chlorhydrate de méfloquine y étant bien plus faible (0,64 mg/mL) que dans le tampon phosphate (80 mM pH 2,6) (4,81 mg/mL). Une agrégation semblable à une floculation a été observée avec le tampon citrate, pouvant être liée à un effet paire d'ions entre l'anion du tampon citrate et l'amine protonée de la méfloquine et qui pourrait expliquer la faible solubilité observée [61].

La solubilité du chlorhydrate de méfloquine mesurée au cours des expériences dans l'eau PPI (4,12 mg/mL) ou dans les tampons phosphate (0,78 mg/mL dans le tampon 50 mM, pH 6,5 et 4,81 mg/mL dans le tampon 80 mM, pH 2,6) est en adéquation avec les valeurs publiées dans la littérature : 0,17 mg/mL (tampon phosphate pH 7.5) et 1,41 mg/mL (tampon phosphate pH 3.0) pour des solutions agitées une nuit à 37 °C [16].

Dans leur étude, Kitamura *et al.* ont montré que le temps d'agitation supérieur à 24 h semblait ne pas avoir d'impact sur la solubilité aqueuse maximale de la méfloquine. Celle-ci était de 4,8 mg/mL dans l'eau distillée chauffée à 37 °C, que l'agitation ait duré 10 h ou 50 h [62].

Le chlorhydrate de méfloquine s'est avéré peu soluble dans l'eau comme mentionné par la pharmacopée [55] (très peu soluble – soit solubilité inférieure à 1 mg/mL).

La solubilité mesurée dans les tampons à pH inférieur à 7 (valeur minimale 0,64 mg/mL) confirme que la méfloquine est un composé BCS II.

Les différentes valeurs de solubilité de la méfloquine publiées dans la littérature peuvent s'expliquer par l'utilisation de différentes formes polymorphes, solvatomorphes ou amorphes du même principe actif. Ces différentes formes peuvent posséder une cinétique de

dissolution différente et une solubilité intrinsèque différente [63]. Il a cependant été rapporté que les différentes formes polymorphes de la méfloquine présentaient des solubilités assez proches [62].

L'ajout de cyclodextrines a permis de réduire les effets négatifs du tampon citrate sur la solubilisation de la méfloquine. Aux plus fortes concentrations de cyclodextrines employées, la solubilité de la méfloquine est globalement identique entre les solutions préparées dans le tampon citrate, le tampon phosphate et l'eau PPI, notamment en présence de RAMEB.

Lors de l'expérience des diagrammes de phases, la solubilité du chlorhydrate de méfloquine a été améliorée de façon linéaire par les cyclodextrines, selon un profil de type A_L [64]. Aux plus faibles concentrations d'HPBCD et de RAMEB employées (26 mM), la solubilité de la méfloquine a été respectivement augmentée d'un facteur 1,33 et 1,69. Des études effectuées avec de plus faibles concentrations de cyclodextrines ont donné des résultats similaires. Treasa a décrit que l'apport de 10 mM d'alpha- ou d'hydroxy-propyl-alpha-cyclodextrine à une solution aqueuse de méfloquine permettait d'augmenter sa solubilité de 5,0 à 5,1 mM (0.19 mg/mL) soit une multiplication par 1,02 [65]. Patil a décrit que l'apport de 10 mM de beta-cyclodextrine avait permis d'améliorer la solubilité de la méfloquine de 0,39 mg/mL à 0,46 mg/mL ce qui représente un facteur multiplicatif de 1,18 [33]. Ce profil s'explique par la substitution des cyclodextrines et par leur utilisation à concentration bien inférieure à la limite de solubilité ce qui évite l'auto-agrégation [35].

L'apport de quantités plus importantes de HPBCD et de RAMEB (264 mM) a quant à lui permis d'augmenter la solubilité aqueuse du chlorhydrate de méfloquine par respectivement 2,66 et 5,45. Cela a permis d'atteindre avec la RAMEB la solubilité cible de la méfloquine fixée à 20 mg/mL. Cet objectif n'a pas été atteint avec l'HPBCD mais il est envisageable d'augmenter la concentration d'HPBCD pour atteindre cet objectif car la solubilité semble croître parallèlement à la concentration de cyclodextrine. L'apport oral journalier maximal en HPBCD étant de 16 g soit 14 mmol, la concentration maximale en HPBCD dans un volume administré de 10 mL est de 1400 mM. L'augmentation de la concentration d'HPBCD ne devrait pas induire de toxicité particulière [66].

Les effets indésirables des cyclodextrines sont principalement gastro-intestinaux car ils sont, mis à part la RAMEB, peu absorbés. Cela explique que la RAMEB ne peut être utilisée pour un usage oral [67,68].

4.3. Étude de l'interaction méfloquine-cyclodextrine

La RMN a permis de mettre en évidence que les cyclodextrines HPBCD, RAMEB et DIMEB sont capables de s'associer à la méfloquine pour former des complexes diastéréoisomériques qui vont être à l'origine de la séparation des signaux ^1H et ^{19}F de ses deux énantiomères [69,70]. Ces énantiomères présentent des constantes d'association différentes qui peuvent être corrélées à des interactions différentes avec les cyclodextrines et à des solubilités différentes. Cette dualité dans les valeurs de K_a a également été décrite pour les énantiomères des dérivés de phenylalkylamine par électrophorèse capillaire [71]. Les deux énantiomères de la méfloquine forment plusieurs complexes d'inclusion avec la DIMEB et probablement avec la RAMEB. L'importance de la variation de déplacement chimique des protons H-3, H-5 et H-6 de la DIMEB semble montrer une inclusion partielle

dans la cavité de la cyclodextrine [72]. Cette inclusion se fait principalement par le plus petit côté de la cavité de la cyclodextrine et avec le centre asymétrique en position 11 de la méfloquine (**Figure 34**) où l'encombrement stérique est le plus faible ainsi qu'avec le cycle benzénique du noyau quinoléine. Le fait d'observer une corrélation assez intense impliquant le proton H-3 de la méfloquine montre que la DIMEB interagit avec l'autre cycle du noyau quinoléine. Par contre il n'est pas possible de savoir si cette interaction a lieu avec le proton H-3 et/ou H-5 et le grand ou le petit côté de la DIMEB.

La présence de complexes d'association (interactions faibles de la méfloquine avec l'extérieur de la cyclodextrine) n'a pas été visualisée par l'expérience T-ROESY. Il est possible que la proximité entre les protons aliphatiques de la méfloquine et les protons H-4 et les protons du groupement 2-OCH₃ de la DIMEB soit secondaire à l'inclusion de la méfloquine au niveau de ses protons H-3 et H-5 qui, si elle induit le repliement du cycle pipéridine, rapproche les protons aliphatiques de la méfloquine des protons de la DIMEB.

L'attribution des signaux fluors n'a pas été effectuée mais il a été démontré dans d'autres conditions expérimentales que les fluors en position 9 étaient plus déblindés que les fluors en position 10 [10] ce qui s'explique par l'électronégativité de la liaison C=N. En transposant ces résultats, les fluors en position 9 correspondraient aux signaux nommés F1 tandis que les fluors en position 10 seraient les fluors F2.

L'inclusion de la méfloquine dans la cavité de cyclodextrine est peu profonde au vu des interactions avec le proton H-6 de la DIMEB qui est situé à l'entrée de la cavité. Il est possible d'extrapoler ces résultats et penser qu'il en est de même avec la RAMEB.

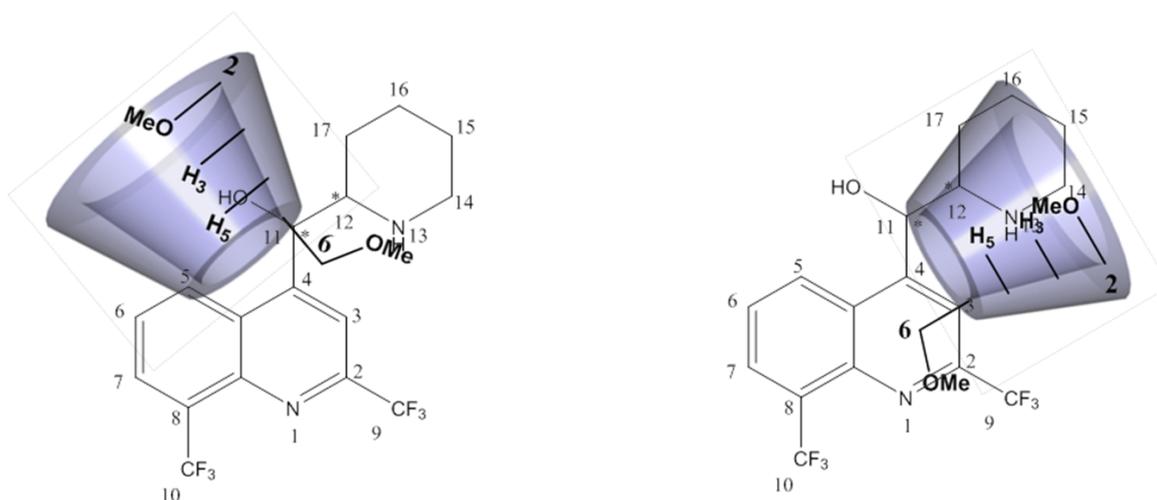


Figure 34: Représentation schématique de certains complexes d'inclusion entre la méfloquine et la DIMEB

Nous avons fait le choix de ne pas montrer les spectres RMN impliquant l'HPBCD dans un souci de concision mais les résultats étaient identiques à ceux obtenus avec la RAMEB.

4.4. Mesure de la constante d'association

Avec la méthode des diagrammes de phases la constante d'association mesurée est la moyenne des constantes d'association des différents complexes. Cette méthode utilise la valeur de la solubilité intrinsèque du principe actif qui a un impact important sur la pente et la valeur calculée de la constante d'association. Cet effet est d'autant plus marqué pour les principes actifs peu solubles comme la méfloquine. Le solvant de la phase mobile exerce également un effet sur l'équilibre de complexation puisqu'il interagit avec la méfloquine, les cyclodextrines et la colonne et favorise la plus ou moins grande solubilité de ces composés dans la phase mobile. Cette méthode de mesure est donc discutable [43]. La mesure de la constante d'association doit être effectuée par des méthodes plus précises qui s'affranchissent de ce type de biais comme la RMN ou la titration calorimétrique isotherme (ITC).

Concernant la méthode de mesure de la constante d'association par modification des temps de rétention de la méfloquine en HPLC, la valeur de K_a correspond également à une constante moyenne pour les différents complexes en solution. L'utilisation d'un taux important de méthanol dans la phase mobile (60 %) a également pu déplacer l'équilibre de complexation [44,71]. Les concentrations molaires de cyclodextrines dans la phase mobile (0 à 80 mM) étaient également bien plus importantes que les concentrations employées dans d'autres expériences qui étaient inférieures à 10 mM [44,73,74] ce qui peut impacter sur la valeur de la constante d'association.

La méthode de Job, basée sur des expériences RMN ^{19}F , a permis de confirmer la stœchiométrie 1:1.

Les valeurs des constantes d'association de la méfloquine pour HPBCD et RAMEB sont relativement faibles pour des complexes de cyclodextrines (**Tableau IV**) mais semblables aux valeurs retrouvées avec des diagrammes de phase pour la beta-cyclodextrine (120 M^{-1}) [33], l'alpha-cyclodextrine (110 M^{-1}) ou l'hydroxypropyl-alpha-cyclodextrine (160 M^{-1}) [65] d'autant plus que ces expériences avaient été effectuées avec de plus faibles concentrations de cyclodextrines ce qui a tendance à tirer la pente vers le haut.

Tableau IV : Détermination de la constante d'association de la méfloquine pour les cyclodextrines par différentes méthodes

Méthode de détermination de K_a	K_a MQ-HPBCD (M^{-1})	K_a MQ-RAMEB (M^{-1})
Diagramme de phase eau PPI, pH 4,6, racémique	5	16
Diagramme de phase tampon citrate 50 mM pH 2,9, racémique	63	161
Diagramme de phase tampon phosphate 80 mM pH 2,9, racémique	7	16
Temps de rétention, racémique	8	25
RMN énantiopur 11S,12R	64	53
RMN énantiopur 11R,12S	42	20

Les légères différences observées dans les valeurs de K_a entre les techniques chromatographiques et les techniques RMN peuvent également s'expliquer par la formation de multiples complexes. A pH acide, le noyau pipéridine de la méfloquine est protoné ce qui entraîne la formation des 4 isomères de la méfloquine, tous susceptibles de former des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines [75,76]. L'ionisation du principe actif diminue son affinité pour la cavité apolaire des cyclodextrines ce qui réduit la valeur de K_a [77,78].

Les valeurs de K_a calculées en RMN peuvent également être sous-estimées. Les fluors n'étant a priori pas inclus au sein de la cavité, l'évolution de leurs déplacements chimiques est potentiellement plus faible que l'évolution des déplacements des protons impliqués dans l'inclusion. Les paramètres $\Delta\delta$ et $\frac{1}{\Delta\delta}$ sont respectivement sous et surestimés ce qui surestime la valeur de la pente et sous-estime la valeur de K_a [53].

4.5. Stabilité des solutions de méfloquine en présence de cyclodextrines

L'expérience de dégradation forcée a été effectuée en solubilisant la méfloquine dans l'acétonitrile car la méfloquine est peu soluble dans l'eau, l'acétonitrile est un solvant inerte chimiquement, qui n'absorbe pas dans l'UV et qui est présent dans la phase mobile utilisée lors de l'analyse HPLC-UV [79].

L'étude de stabilité en temps réel n'a pas permis de démontrer un impact positif ou négatif des cyclodextrines sur la stabilité d'une solution de méfloquine dans ces conditions expérimentales. L'étude de stabilité dans le tampon phosphate nécessite d'être poursuivie afin d'évaluer la stabilité de la méfloquine sur un temps plus long. La nature du ou des composés ayant provoqué la coloration jaunâtre de la solution de méfloquine dans le tampon citrate doit être déterminée par une méthode de détection plus sensible telle que la spectrométrie de masse.

5. Conclusions et perspectives

La solubilité aqueuse du chlorhydrate de méfloquine a été améliorée par l'utilisation de cyclodextrines avec lesquelles il forme des complexes d'inclusion.

L'énantiopur actif 11S,12R présente une meilleure affinité pour les cyclodextrines que l'énantiomère 11R,12S. L'utilisation thérapeutique de ce seul énantiomère pourrait permettre d'améliorer la complexation par les cyclodextrines, la solubilité et ainsi l'efficacité du traitement tout en réduisant sa toxicité. Cependant, les valeurs des constantes d'association ne sont pas significativement différentes. Il a été démontré que l'usage sélectif de l'énantiopur 11S,12R par rapport au racémique permettait de réduire les troubles de l'humeur et du sommeil mais pas les troubles gastro-intestinaux ou les céphalées. Le profil de tolérance de l'énantiopur 11S,12R n'est donc pas meilleur que celui du racémique [80].

Il serait intéressant de réaliser une expérience HOESY ^{19}F - ^1H pour tenter de mettre en évidence des interactions entre les fluors de la méfloquine et les protons des cyclodextrines afin d'approfondir notre connaissance de la structure des complexes en particulier pour le complexe DIMEB:méfloquine.

D'un point de vue pharmaceutique, le recours aux cyclodextrines est envisageable pour augmenter la concentration en méfloquine dans un médicament et formuler une solution stable. De futures études restent nécessaires pour analyser l'impact des cyclodextrines sur :

- la biodisponibilité de la méfloquine. La méfloquine est un composé classé BCS II. Si les cyclodextrines permettent aux médicaments classés BCS II et IV de devenir des composés BCS I en augmentant leur solubilité et leur perméabilité intestinale [81], il convient de vérifier la perméabilité de la méfloquine complexée aux cyclodextrines par une expérience *in vitro* sur culture cellulaire de type Caco-2 par exemple afin de confirmer la classification BCS II.

- la palatabilité de la méfloquine. La méfloquine est un principe actif amer [21]. Les cyclodextrines masquent l'amertume des principes actifs en les complexant ce qui réduit leur interaction avec les récepteurs du goût, en interagissant avec ces mêmes récepteurs et en apportant un propre pouvoir édulcorant [82]. Cependant, la palatabilité des solutions de méfloquine en présence de HPBCD ou de RAMEB restait très désagréable. Si les cyclodextrines ont permis d'édulcorer la solution et de réduire l'amertume, cela n'a pas été suffisant pour que la palatabilité soit acceptable. D'autres excipients doivent être utilisés ou une autre forme galénique envisagée.

6. Bibliographie

1. Organisation mondiale de la santé - centre des médias. Paludisme - Aide-mémoire N°94 [Internet]. World Health Organization; 2017 [cited 2018 Mar 20]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/fr/>
2. Schlagenhauf P, Adamcova M, Regep L, Schaerer MT, Bansod S, Rhein H-G. Use of mefloquine in children - a review of dosage, pharmacokinetics and tolerability data. *Malar J*. 2011 Oct 7;10:292.
3. Organisation mondiale de la santé - centre des médias. L'Assemblée mondiale de la Santé adopte une nouvelle stratégie mondiale de lutte contre le paludisme et son budget [Internet]. World Health Organization; 2015 [cited 2018 Mar 27]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/wha-20-may-2015/fr/>
4. Société de pathologie infectieuse de langue française. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation. 2017.
5. World health organization. Guidelines for the treatment of malaria. 2015.
6. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Résumé des Caractéristiques du Produit du Lariam(®). 2013.
7. European Medicines Agency. Inventory of paediatric therapeutic needs - Infectious diseases [Internet]. 2013 [cited 2018 Mar 20]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2014/05/WC500166168.pdf
8. Organisation mondiale de la santé. Liste modèle de l'OMS des médicaments essentiels destinés à l'enfant 3e liste (Révision mars 2011) [Internet]. 2011 [cited 2018 Mar 20]. Available from: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>
9. Marçon F. Paediatric Needs: Challenge and Opportunities for Hospital Pharmacists. *Pharm Technol Hosp Pharm*. 2018 May 1;3(2):47–8.
10. Lim P. Mefloquine Hydrochloride. *Anal Profiles Drug Subst*. 1985 Jan 1;14:157–80.
11. Dassonville-Klimpt A, Jonet A, Pillon M, Mullié C, Sonnet P. Mefloquine derivatives: synthesis, mechanisms of action, antimicrobial activities. In: A. Méndez-Vilas, editor. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 2011.
12. Karle JM, Olmeda R, Gerena L, Milhous W. Plasmodium falciparum: role of absolute stereochemistry in the antimalarial activity of synthetic amino alcohol antimalarial agents. *Exp Parasitol*. 1993;76:345–51.
13. Fletcher A, Shepard R. Use of (+)-mefloquine for the treatment of malaria with reduced side-effects. WO 9839003, 1998.
14. Dassonville-Klimpt A, Cézard C, Mullié C, Agnamey P, Jonet A, Da

- Nascimento S, et al. Absolute Configuration and Antimalarial Activity of erythro-Mefloquine Enantiomers. *Chempluschem*. 2013 Jul;78(7):642–6.
15. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm Res An Off J Am Assoc Pharm Sci*. 1995;12(3):413–20.
 16. Cheng H, Defulvio B, Kardos P, Wright J, Weinstein K, Murray L, et al. In vitro permeability and solubility study of mefloquine hydrochloride according to the biopharmaceutics classification system (BCS) guidelines. 2011.
 17. Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res*. 2005;22(1):11–23.
 18. Shawahna R. Pediatric Biopharmaceutical Classification System: Using Age-Appropriate Initial Gastric Volume. *AAPS J*. 2016;18(3):728–36.
 19. Benet LZ, Broccatelli F, Oprea TI. BDDCS applied to over 900 drugs. *AAPS J*. 2011 Dec;13(4):519–47.
 20. World Health Organization. Development of paediatric medicines: points to consider in pharmaceutical development [Internet]. 2011 [cited 2018 Feb 16]. Available from: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/Rev3-PaediatricMedicinesDevelopment_QAS08-257Rev3_17082011.pdf
 21. Willian N. Anti-infective. In: Gennaro A., editor. *Remington: the science and practice of pharmacy*. 2000.
 22. Walsh J, Cram A, Woertz K, Breitreutz J, Winzenburg G, Turner R. Playing hide and seek with poorly tasting paediatric medicines: Do not forget the excipients. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Jun 30;73:14–33.
 23. Thomson SA, Tuleu C, Wong ICK, Keady S, Pitt KG, Sutcliffe AG. Minitablets: New Modality to Deliver Medicines to Preschool-Aged Children. *Pediatrics*. 2009 Feb;123(2):e235–8.
 24. Patel A, Jacobsen L, Jhaveri R, Bradford KK. Effectiveness of Pediatric Pill Swallowing Interventions: A Systematic Review. *Pediatrics*. 2015 May;135(5):883–9.
 25. Lifschultz BD, Donoghue ER. Deaths due to foreign body aspiration in children: the continuing hazard of toy balloons. *J Forensic Sci*. 1996;41(2):247–51.
 26. Committee for medicinal products for human use of the European Medicines Agency. Reflection paper: Formulation of Choice for the Paediatric Population [Internet]. 2006 [cited 2018 Feb 27]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003782.pdf

27. Strickley RG, Iwata Q, Wu S, Dahl TC. Pediatric Drugs-A Review of Commercially Available Oral Formulations. *J Pharm Sci.* 2008 May 1;97(5):1731–74.
28. World Health Organization. Weight for age - boys - 5 to 10 years [Internet]. 2007 [cited 2018 Mar 20]. Available from: http://www.who.int/growthref/wfa_boys_5_10years_per.pdf?ua=1
29. World Health Organization. Weight for age - boys - birth to 5 years [Internet]. [cited 2018 Mar 20]. Available from: http://www.who.int/childgrowth/standards/sft_wfa_boys_p_0_5.pdf?ua=1
30. Yadav AV, Dabke AP, Shete AS. Crystal engineering to improve physicochemical properties of mefloquine hydrochloride. *Drug Dev Ind Pharm.* 2010 Sep 5;36(9):1036–45.
31. Mbela TK, Deharo E, Haemers A, Ludwig A. Submicron oil-in-water emulsion formulations for mefloquine and halofantrine: effect of electric-charge inducers on antimalarial activity in mice. *J Pharm Pharmacol.* 1998 Nov;50(11):1221–5.
32. Tang W-L, Tang W-H, Chen WC, Diako C, Ross CF, Li S-D. Development of a Rapidly Dissolvable Oral Pediatric Formulation for Mefloquine Using Liposomes. *Mol Pharm.* 2017 Jun 5;14(6):1969–79.
33. Patil SS, Patil AL, Patil A. Preparation, characterization and dissolution enhancement of mefloquine hydrochloride-CD inclusion complex. *Pharmazie.* 2011;66:416–20.
34. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm.* 2012;2012.
35. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Jul 30;59(7):645–66.
36. Coleman AW, Nicolis I, Keller N, Dalbiez JP. Aggregation of cyclodextrins: An explanation of the abnormal solubility of β -cyclodextrin. *J Incl Phenom Mol Recognit Chem.* 1992 Jun;13(2):139–43.
37. Fromming K-H, Szejtli J. *Cyclodextrins in Pharmacy.* Kluwer Aca. 1994.
38. Van der Vossen AC, Van der Velde I, Smeets OSNM, Postma DJ, Eckhardt M, Vermes A, et al. Formulating a poorly water soluble drug into an oral solution suitable for paediatric patients; lorazepam as a model drug. *Eur J Pharm Sci.* 2017 Mar 30;100:205–10.
39. Loftsson T, Brewster M. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci.* 1996;85:1017–25.
40. ICH expert working group. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005.
41. Hubert P, Chiap P, Crommen J, Boulanger B, Chapuzet E, Mercier N, et al. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug

- bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. *Anal Chim Acta*. 1999 May 31;391(2):135–48.
42. Higuchi T, Connors K. Phase-solubility techniques. *AdvAnalChemInstr*. 1965;4:117–22.
 43. Loftsson T, Hreinsdóttir D, Másson M. The complexation efficiency. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2007 Mar 28;57(1–4):545–52.
 44. Buha SM, Baxi G a., Shrivastav PS. Liquid Chromatography Study on Atenolol-Cyclodextrin Inclusion Complex. *ISRN Anal Chem*. 2012;2012:1–8.
 45. Job P. Formation and Stability of Inorganic Complexes in Solution. *Ann Chim*. 1928;9:113–203.
 46. Benesi H., Hildebrand J. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *J Am Chem Soc*. 1949;71(8):2703–7.
 47. Tonnesen HH, Grislingaas A-L. Photochemical stability of biologically active compounds. II. Photochemical decomposition of mefloquine in water. *Int J Pharm*. 1990;60:157–62.
 48. Popielec A, Loftsson T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs. *Int J Pharm*. 2017 Oct 15;531(2):532–42.
 49. ICH Expert working group. ICH Guideline Q1B Photostability testing of new drug substances and products. 1996.
 50. Rowe R, Sheskey P, Quinn M. Handbook of pharmaceutical excipients. 2009.
 51. Thakkar AL, Demarco P V. Cycloheptaamylose Inclusion Complexes of Barbituretes: Correlation between Proton magnetic resonance and Solubility Studies. *J Pharm Sci*. 1971;60(4):652.
 52. Marçon F, Mathiron D, Pilard S, Lemaire-Hurtel A-S, Dubaele J-M, Djedaini-Pilard F. Development and formulation of a 0.2% oral solution of midazolam containing γ -cyclodextrin. *Int J Pharm*. 2009 Sep 11;379(2):244–50.
 53. Djedaïni F, Lin SZ, Perly B, Wouessidjewe D. High-field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a beta-cyclodextrin:indomethacin inclusion complex. *J Pharm Sci*. 1990;79(7):643–6.
 54. Ali SM, Upadhyay SK. Complexation study of midazolam hydrochloride with β -cyclodextrin: NMR spectroscopic study in solution. *Magn Reson Chem*. 2008;46(7):676–9.
 55. Direction européenne de la qualité du médicament et soins de santé. Pharmacopée Européenne. 9.0. 2017.
 56. Council of experts and its expert committees. U.S. Pharmacopeia 34, National Formulary 29. 2010.
 57. Chopade V V, Tembhurkar NB, Jadhav SB, Chaudhari PD. Development and Validation of A Stability Indicating Assay Method of Mefloquine HCl By Using

- Different Stress Degradation Conditions. *J Pharm Res.* 2012;5(5):2631–5.
58. Jyothi P, Geetha K, Ajitha A, Uma V, Rao M, Ramarao N. Stability Indicating Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Mefloquine and Artesunate in Tablet Dosage Form. *Sch Acad J PharmacyOnline) Sch Acad J Pharm.* 2014;3(5):2320–4206.
 59. Nogueira FHA, Goulart L de PL, César I da C, de Campos LMM, Pianetti GA. Development and validation of an HPLC method for mefloquine hydrochloride determination in tablet dosage form. *J AOAC Int.* 2011;94(4):1089–93.
 60. Patil Y, Ahmad S, Shastry VM, Shinde V, Sajjad A. Analytical method development and validation for the simultaneous estimation of artesunate and mefloquine by reversed-phase high-performance liquid chromatography in bulk and tablet dosage forms. *SPER J Anal Drug Regul Aff.* 2017;2(2):56–61.
 61. Avdeef A, Fuguet E, Llinàs A, Ràfols C, Bosch E, Völgyi G, et al. Equilibrium solubility measurement of ionizable drugs – consensus recommendations for improving data quality. *ADMET DMPK.* 2016;4(2):117.
 62. Kitamura S, Chang L-C, Guillory JK. Polymorphism of mefloquine hydrochloride. *Int J Pharm.* 1994 Jan 1;101(1–2):127–44.
 63. Brittain HG. Polymorphism in pharmaceutical solids. M. Dekker; 1999.
 64. Messner M, Kurkov S V, Jansook P, Loftsson T. Review Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *Int J Pharm.* 2010;387:199–208.
 65. Treasa MS, Kumari JP. Characterization and Solubility Studies of Mefloquinehydrochloride Inclusion Complexes with α -Cyclodextrin/Hydroxypropyl α -Cyclodextrin. *Int J Sci Res Publ.* 2015;5(7).
 66. Irie T, Uekama K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. *J Pharm Sci.* 1997 Feb;86(2):147–62.
 67. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J Pharm Pharmacol.* 2010 Nov;62(11):1607–21.
 68. European Medicines Agency. Cyclodextrins used as excipients [Internet]. 2017 [cited 2018 Feb 28]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2017/10/WC500235904.pdf
 69. Fanali S, Camera E. Use of cyclodextrins in the capillary electrophoretic separation of erythro- and threo-mefloquin enantiomers. *J Chromatogr A.* 1996;745:17–23.
 70. Thunhorst M, Holzgrabe U. Utilizing NMR spectroscopy for assessing drug enantiomeric composition. *Magn Reson Chem.* 1998;36(3):211–6.
 71. Szoko E, Gyimesi J, Barcza L, Magyar K. Determination of binding constants

- and the influence of methanol on the separation of drug enantiomers in cyclodextrin modified capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 1996;745:181–7.
72. Greatbanks D, Pickford R. Cyclodextrins as Chiral Complexing Agents in Water, and their Application to Optical Purity Measurements. *Magn Reson Chem*. 1987;25:208–15.
 73. Gazpio C, Sánchez M, García-Zubiri IX, Vélaz I, Martínez-Ohárriz C, Martín C, et al. HPLC and solubility study of the interaction between pindolol and cyclodextrins. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;37(3):487–92.
 74. Uekama K, Hirayama F, Nasu S, Matsuo N, Irie T. Determination of the stability constants for inclusion complexes of cyclodextrins with various drug molecules by high performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1978;26(11):3477–84.
 75. Kuhn R, Riester D, Fleckenstein B, Wiesmüller K-H. Evaluation of an optically active crown ether for the chiral separation of di- and tripeptides. *J Chromatogr A*. 1995 Nov 17;716(1–2):371–9.
 76. Stephani R, Cesare V. Optical resolution of 2-phenylsuccinic acid. *J Chem Educ*. 1997;74(1226).
 77. Mura P, Franchi G, Faucci MT, Manderioli A, Bramanti G. Improvement of Econazole Solubility in Multicomponent Systems with Cyclodextrins and Acids. In: Torres Labandeira JJ, Vila-Jato JL, editors. *Proceedings of the Ninth International Symposium on Cyclodextrins*. 1999. p. 375–8.
 78. Dodziuk H, Koźmiński W, Ejchart A. NMR Studies of Chiral Recognition by Cyclodextrins. *Chirality*. 2004;16(2):90–105.
 79. Piechocki JT, Thoma K. Pharmaceutical photostability and stabilization technology. *Informa Healthcare*; 2007. 445 p.
 80. Tansley R, Lotharius J, Priestley A, Bull F, Duparc S, Möhrle J. A randomized, double-blind, placebo-controlled study to investigate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of single enantiomer (+)-mefloquine compared with racemic mefloquine in healthy persons. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Dec;83(6):1195–201.
 81. Loftsson T. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2002;44(1/4):63–7.
 82. Szejtli J, Sente L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005 Oct 1;61(3):115–25.

7. Annexes

Annexe 1. Paramètres de validation de la méthode de dosage

Spécificité : Une méthode de dosage est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré correspond uniquement à la substance à analyser et non pas à des impuretés de synthèse, produits de dégradation et autres substances présentes dans la formulation. La méthode analytique consistant en la dissolution de la méfloquine dans le méthanol, la spécificité de la méthode a été évaluée par injection de blancs c'est-à-dire de méthanol pur afin d'observer ou non la présence d'un pic au temps de rétention de la méfloquine.

Fonction de réponse : La fonction de réponse d'une méthode analytique est, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon. Il convient de vérifier l'homogénéité des variances en traçant la courbe $variance = f([concentration])$, de réaliser la régression afin d'obtenir les paramètres du modèle, de valider cette fonction de réponse en déterminant le coefficient de détermination. Il convient de vérifier l'absence de corrélation entre le signal et le niveau de concentration

Linéarité : La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon. Différentes méthodes permettent de vérifier la linéarité. Il est possible de vérifier que la pente et l'ordonnée à l'origine de la courbe $[concentration]_{recalculée} = f([concentration]_{introduite})$ sont respectivement égales à 1 et 0, de montrer que les résidus de la courbe $signal_{observé} - signal_{recalculé} = f([concentration])$ ou que les valeurs sur la courbe $facteur\ de\ réponse = f(concentration)$ se répartissent de manière homogène autour de l'axe $x = 0$.

Justesse : La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée comme telle. La justesse donne une indication sur les erreurs systématiques. La justesse est exprimée pour chaque niveau de concentration des standards de validation en terme de :

$biais\ absolu\ (\mu g/mL) = |concentration\ recalculée - concentration\ introduite|,$

$biais\ relatif\ (\%) = 100 * \frac{|concentration\ recalculée - concentration\ introduite|}{concentration\ introduite},$

$taux\ de\ recouvrement\ (\%) = 100 * \frac{concentration\ recalculée}{concentration\ introduite}$

Fidélité: La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle donne des informations sur l'erreur aléatoire et est évaluée à deux niveaux : la répétabilité (rep) et la fidélité intermédiaire (fil). La fidélité peut être exprimée en écart type (σ) et en terme de coefficient de variation (CV). Pour cette méthode, le niveau d'acceptation des coefficients de variation a été fixé à 5 %.

$\sigma\ rep = \sqrt{variance\ intrasérie}$

$$\sigma_{fil} = \sqrt{\text{variance intrasérie} + \text{variance intersérie}}$$

$$CV_{rep} (\%) = 100 * \frac{\sigma_{rep}}{\text{concentration introduite}}$$

$$CV_{fil} (\%) = 100 * \frac{\sigma_{fil}}{\text{concentration introduite}}$$

Exactitude : L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme vraie. L'exactitude prend en compte l'erreur totale, c'est à dire l'erreur systématique et l'erreur aléatoire liées au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. Elle est estimée à partir du profil d'exactitude. Le profil d'exactitude permet d'évaluer le risque d'écart à l'objectif en fonction du niveau de concentration. Les limites d'acceptation de l'erreur relative et du risque d'erreur ont été fixées à $\pm 10\%$.

Limite de quantification : La limite de quantification (LOQ) est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie.

Limite de détection : La limite de détection (LOD) d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure. Elle a ici été obtenue à partir de la valeur de la limite de quantification : $LOD = \frac{LOQ}{3.3}$

La gamme correspond à l'intervalle entre la plus faible et la plus forte concentration en analyte dont le dosage permet de fournir un résultat linéaire, exact et fidèle.

Annexe 2. Standards de calibration de la méthode de dosage

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse (mAu)
CS1L1J1	1	10	10.08	9356
CS1L2J1	1	50	50.4	46394
CS1L3J1	1	100	100.8	96806
CS1L4J1	1	500	504	500839
CS1L5J1	1	1000	1008	974102
CS1L6J1	1	3000	3024	2887711
CS1L7J1	1	5000	5040	4535093
CS2L1J1	1	10	10	10749
CS2L2J1	1	50	50	45061
CS2L3J1	1	100	100	96985
CS2L4J1	1	500	500	456654
CS2L5J1	1	1000	1000	976632
CS2L6J1	1	3000	3000	2834674
CS2L7J1	1	5000	5000	4459105
CS1L1J2	2	10	10.04	7322
CS1L2J2	2	50	50.2	44703
CS1L3J2	2	100	100.4	96072
CS1L4J2	2	500	502	486913
CS1L5J2	2	1000	1004	917025
CS1L6J2	2	3000	3012	2846214
CS1L7J2	2	5000	5020	4534154
CS2L1J2	2	10	10.08	7389
CS2L2J2	2	50	50.4	43955
CS2L3J2	2	100	100.8	93267
CS2L4J2	2	500	504	480616
CS2L5J2	2	1000	1008	949634
CS2L6J2	2	3000	3024	2793167
CS2L7J2	2	5000	5040	4553021
CS1L1J3	3	10	10.12	7139
CS1L2J3	3	50	50.6	41294
CS1L3J3	3	100	101.2	86435
CS1L4J3	3	500	506	456992
CS1L5J3	3	1000	1012	877707

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse (mAu)
CS1L6J3	3	3000	3036	2666276
CS1L7J3	3	5000	5060	4301665
CS2L1J3	3	10	10.08	9027
CS2L2J3	3	50	50.4	38368
CS2L3J3	3	100	100.8	92627
CS2L4J3	3	500	504	437847
CS2L5J3	3	1000	1008	906282
CS2L6J3	3	3000	3024	2509949
CS2L7J3	3	5000	5040	4355508

Annexe 3. Standards de validation de la méthode de dosage

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse (mAu)
VS1L1J1	1	10	10.08	11381
VS1L2J1	1	50	50.4	48658
VS1L3J1	1	100	100.8	97628
VS1L4J1	1	500	504	488225
VS1L5J1	1	1000	1008	979272
VS1L6J1	1	3000	3024	2683540
VS1L7J1	1	5000	5040	4676200
VS2L1J1	1	10	10	10550
VS2L2J1	1	50	50	47815
VS2L3J1	1	100	100	95617
VS2L4J1	1	500	500	521219
VS2L5J1	1	1000	1000	999717
VS2L6J1	1	3000	3000	2784797
VS2L7J1	1	5000	5000	4751281
VS3L1J1	1	10	10.12	10596
VS3L2J1	1	50	50.6	46535
VS3L3J1	1	100	101.2	93240
VS3L4J1	1	500	506	504503
VS3L5J1	1	1000	1012	957129
VS3L6J1	1	3000	3036	2882140
VS3L7J1	1	5000	5060	4602166
VS1L1J2	2	10	9.96	7676
VS1L2J2	2	50	49.8	43578
VS1L3J2	2	100	99.6	93429
VS1L4J2	2	500	498	470957
VS1L5J2	2	1000	996	899196
VS1L6J2	2	3000	2988	2763765
VS1L7J2	2	5000	4980	4491880
VS2L1J2	2	10	10.04	7703
VS2L2J2	2	50	50.2	44285
VS2L3J2	2	100	100.4	96197
VS2L4J2	2	500	502	478358
VS2L5J2	2	1000	1004	953718
VS2L6J2	2	3000	3012	2777016

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse (mAu)
VS2L7J2	2	5000	5020	4557127
VS3L1J2	2	10	9.92	8714
VS3L2J2	2	50	49.6	45660
VS3L3J2	2	100	99.2	94007
VS3L4J2	2	500	496	473216
VS3L5J2	2	1000	992	943838
VS3L6J2	2	3000	2972	2782662
VS3L7J2	2	5000	4960	4561103
VS1L1J3	3	10	10.08	6806
VS1L2J3	3	50	50.4	42130
VS1L3J3	3	100	100.8	91679
VS1L4J3	3	500	504	455770
VS1L5J3	3	1000	1008	923015
VS1L6J3	3	3000	3024	2625641
VS1L7J3	3	5000	5040	4570315
VS2L1J3	3	10	10.04	6621
VS2L2J3	3	50	50.2	42124
VS2L3J3	3	100	100.4	86866
VS2L4J3	3	500	502	460881
VS2L5J3	3	1000	1004	873711
VS2L6J3	3	3000	3012	2714050
VS2L7J3	3	5000	5020	4318640
VS3L1J3	3	10	10.08	7671
VS3L2J3	3	50	50.4	43647
VS3L3J3	3	100	100.8	89400
VS3L4J3	3	500	504	448115
VS3L5J3	3	1000	1008	924175
VS3L6J3	3	3000	3024	2554998
VS3L7J3	3	5000	5040	4496048

Annexe 4. Démonstration de l'équation de Higuchi et Connors

A l'équilibre : $MQ + CD \leftrightarrow MQ : CD$

$$Ka = \frac{[MQ:CD]}{[MQ][CD]}$$

Sachant que :

$$[MQ] = S_0,$$

$$[MQ]_t = S_t = [MQ] + [MQ : CD],$$

$$[CD]_t = [CD] + [MQ : CD]$$

Alors :

$$[MQ : CD] = S_t - S_0,$$

$$[CD] = [CD]_t - S_t - S_0$$

$$\text{On peut alors déterminer } Ka = \frac{S_t - S_0}{S_0([CD]_t - S_t - S_0)} = \frac{S_t - S_0}{S_0([CD]_t - S_t) - S_0}$$

$$\text{Ainsi } S_t - S_0 = \frac{S_0 \cdot Ka \cdot [CD]_t}{1 + Ka \cdot S_0}$$

$$\text{et donc } S_t = S_0 + \frac{S_0 \cdot Ka}{1 + Ka \cdot S_0} * [CD]_t$$

Annexe 5. Démonstration de l'équation de Job

La formation d'un complexe d'inclusion [méfloquine:cyclodextrine] entre la méfloquine et une cyclodextrine est décrite par l'équation :



La constante d'association du complexe est $Ka = \frac{[MQ:CD_n]}{[MQ][CD]^n}$

Les concentrations de méfloquine et cyclodextrine sous forme libre correspondent à la différence entre la concentration totale et la concentration complexée :

$$[MQ] = [MQ]_t - [MQ:CD_n] \text{ et } [CD] = [CD]_t - n[MQ:CD_n]$$

Le mélange a une concentration totale $Ct = [MQ]_t + [CD]_t = 5 \text{ mM}$

La fraction molaire ou ratio de cyclodextrine, compris entre 0 et 1, est égale à

$$r = \frac{[CD]_t}{[MQ]_t + [CD]_t}$$

Les concentrations de méfloquine et cyclodextrine sous forme libre sont :

$$[MQ] = (1 - r) * Ct - [MQ:CD_n] \text{ et } [CD] = r * Ct - n[MQ:CD_n]$$

$$r = \frac{r * Ct - n[MQ:CD_n]}{(1-r) * Ct - [MQ:CD_n] + r * Ct - n[MQ:CD_n]} = \frac{Ct(r) - n[MQ:CD_n]}{Ct(r+1-r) - [MQ:CD_n](1+n)} = \frac{1}{1+n}$$

La stœchiométrie n de la complexation ne dépend ni de la constante d'association ni des concentrations initiales en méfloquine et cyclodextrine. Elle est déterminée par l'évolution des déplacements chimiques du fluor en fonction des concentrations de méfloquine et de cyclodextrine.

$\delta_{obs} * [MQ]_t = \delta_c * [MQ:CD_n] + \delta_l * [MQ]$ avec δ_{obs} , δ_c et δ_l les valeurs des déplacements chimiques observés, à l'état complexé et à l'état libre.

$$\Delta\delta_{obs} = \delta_{obs} - \delta_l, \quad \Delta\delta_c = \delta_c - \delta_l,$$

$$\Delta\delta_c * [MQ:CD_n] = \Delta\delta_{obs} * [CD]_t$$

$$\Delta\delta_{obs} = \frac{\Delta\delta_c * [MQ:CD_n]}{[MQ]_t}$$

Le déplacement chimique $\Delta\delta_{obs}$ des fluors est proportionnel à la concentration en complexe $[MQ:CD]$ et à r .

L'abscisse maximale de la courbe $\Delta\delta_{obs} * [MQ]_t = f(r)$ permet de déterminer r et n .

Annexe 6. Démonstration de l'équation de Benesi-Hildebrand

Le déplacement chimique observé du fluor dépend du déplacement du fluor de méfloquine libre, du déplacement du fluor de méfloquine complexée et des ratios molaires de méfloquine libre et complexée selon l'équation :

$$\delta_{obs} = \delta_{MQ} * \frac{[MQ]}{[MQ]_t} + \delta_{MQ:CD} * \frac{[MQ:CD]}{[MQ]_t}$$

Sachant que $\frac{[MQ]}{[MQ]_t} = 1 - \frac{[MQ:CD]}{[MQ]_t}$:

$$\delta_{obs} - \delta_{MQ} = \frac{[MQ:CD]}{[MQ]_t} (\delta_{MQ:CD} - \delta_{MQ})$$

Sachant que $Ka = \frac{[MQ:CD]}{[MQ][CD]}$:

$$\delta_{obs} - \delta_{MQ} = \frac{Ka * [MQ] * [CD]}{Ka * [MQ] * [CD] + [MQ]} (\delta_{MQ:CD} - \delta_{MQ}) = \frac{Ka * [CD]}{Ka * [CD] + 1} (\delta_{MQ:CD} - \delta_{MQ})$$

$$\Delta\delta_{obs} = \frac{\Delta\delta c * Ka * [CD]}{Ka * [CD] + 1}$$

ou par inversion $\frac{1}{\Delta\delta_{obs}} = \frac{1}{Ka * \Delta\delta c} * \frac{1}{[CD]} + \frac{1}{\Delta\delta c}$

DURAND, Amaury

Étude de l'apport des cyclodextrines pour la formulation d'un médicament anti-infectieux pédiatrique, la méfloquine

**Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie
Université de Picardie Jules Verne
Année 2019**

Mots clés : paludisme, pédiatrie, méfloquine, formulation pharmaceutique, cyclodextrines

RESUMÉ

Introduction. Le paludisme est une infection parasitaire touchant particulièrement la population pédiatrique. Cette infection peut être prévenue et guérie par des thérapeutiques orales comme la méfloquine. Celle-ci n'est pas commercialisée sous forme galénique adaptée à l'enfant. Afin d'améliorer la prise en charge de l'infection dans la population pédiatrique, nous avons réfléchi à la préformulation d'une solution buvable de méfloquine. Les cyclodextrines présentent dans cette optique un intérêt évident.

Matériels et Méthodes. Nous avons étudié l'impact des cyclodextrines 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HPBCD) et per-(2,6-di-O-méthyl)- β -cyclodextrine (RAMEB) sur la solubilisation de la méfloquine. Une méthode de dosage par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à un détecteur ultraviolets (UHPLC-UV) a été mise au point. Des diagrammes de phases ont été réalisés et les interactions cyclodextrine-méfloquine ont été étudiées par HPLC-UV et par résonance magnétique nucléaire (RMN). La stabilité des solutions de méfloquine contenant des cyclodextrines a ensuite été évaluée.

Résultats. La méthode de dosage de la méfloquine a été validée sur l'intervalle 0,05 à 5 mg/mL. La solubilité aqueuse de la méfloquine initialement comprise entre 0.4 et 4,8 mg/mL a été multipliée, en fonction du solvant, par 3 à 16 en présence d'HPBCD et par 6 à 59 avec la RAMEB. Les cyclodextrines ont formé de multiples complexes d'inclusion avec les différents diastéréoisomères de la méfloquine avec une stœchiométrie 1:1. L'efficacité de la complexation était de 0.075 à 0.131 avec HPBCD et de 0.270 à 0.75 avec RAMEB. Les constantes d'association étaient comprises entre 5 M^{-1} et 64 M^{-1} avec l'HPBCD et entre 16 M^{-1} et 161 M^{-1} avec la RAMEB selon les méthodes de mesure. Les cyclodextrines permettent, de préserver la stabilité des solutions de méfloquine notamment conservées sous exposition lumineuse.

Discussion. Les valeurs de la solubilité aqueuse et des constantes d'association des complexes d'inclusion sont similaires aux valeurs retrouvées dans la littérature.

Conclusion. Les cyclodextrines peuvent être utilisées pour formuler une solution de méfloquine concentrée. Leur impact sur la biodisponibilité et la palatabilité reste à explorer.

JURY

Président :

M. SONNET Pascal, Pharmacien, Professeur des Universités, Université de Picardie Jules Verne, EA 4294 AGIR

Membre et directeur de thèse :

M. MARÇON Frédéric, Pharmacien, Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier, CHU Amiens-Picardie, responsable de l'unité préparations et contrôles, pharmacie à usage intérieur, EA 4294 AGIR, Université de Picardie Jules Verne

Assesseurs :

M. LANNOY Damien, Pharmacien, Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier, CHRU Lille, responsable de l'unité préparations, pharmacie à usage intérieur, EA 7365 GRITA, Université de Lille

M. BELHOUT Mohamed, Pharmacien, CHU Amiens-Picardie, chef de service pharmacie à usage intérieur

M. MATHIRON David, Ingénieur en techniques d'analyse chimique, Université de Picardie Jules Verne