

N° d'ordre : 15/2007-M/CH

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE
(U.S.T.H.B) ALGER



Faculté de Chimie

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

EN : CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique Appliquée

Par

OUAREZKI Radia

Thème

Inclusion du Méloxicam (un anti-inflammatoire non stéroïdien) dans la β -cyclodextrine

Soutenu publiquement le 05/04/2007, devant le jury composé :

Mr A.AIT.KACI	Professeur à l'USTHB	Président
Mr M.H.GUERMOUCHE	Professeur à l'USTHB	Directeur
Mr H.A.Y.BADJAH	Professeur à l'USTHB	Examineur
Mr SEBIH	Professeur à l'USTHB	Examineur

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au laboratoire de chromatographie (institut de chimie USTHB), sous la direction scientifique de Monsieur le professeur **M.H.GUERMOUCHE**. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance pour l'honneur et la confiance qu'il a placé en moi en me confiant ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements pour l'aide bienveillante qu'il a su m'accorder.

Monsieur **A.AIT.KACI**, professeur à l'USTHB a bien voulu honorer de sa présence et présider le jury de ce mémoire. Qu'il accepte ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

Mes remerciements vont également à messieurs les professeurs **S.SEBIH, H.A.Y.BADJAH** de l'USTHB pour l'honneur qu'il me font d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail.

Je suis très heureuse d'exprimer ma vive reconnaissance à Madame **S.GHERMOUCH**, pour ces conseils, ses idées, l'aide qu'elle m'a apportée et sa contribution à la réalisation de ce travail.

Que tous les membres du laboratoire de chromatographie soient remerciés pour l'ambiance de travail agréable qu'ils ont su créer tout au long de ces années.

A ma mère,

A mon père,

A ma sœur, mes frère,

A tous mes amis (es).

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Chapitre I

Revues bibliographiques.

I. Les cyclodextrines.....	4
I.1 Historique	
I.2. Propriétés des cyclodextrines.....	4
I.2.1. Propriétés structurales.....	4
I.2.2. Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines.....	6
I.3. Propriétés de complexation.....	8
I.4. Mécanisme de formation des complexes d'inclusion.....	10
I.5 .Principales techniques de préparation des complexes d'inclusion.....	11
Co-précipitation.....	11
Le séchage par pulvérisation (spray-drying).....	12
Slurry complexation.....	12
Malaxage (kneading).....	12
Mélange humide ou « dump mixing ».....	12
Mélange physique.....	12
Lyophilisation.....	12
I.6.Paramètres influençant la formation des complexes d'inclusion.....	13
I.6.1.Influence de la température.....	13
I.6.2. Influence de la méthode de préparation.....	13
I.6.3. Influence de la présence d'un solvant organique.....	13
a) Agent de diffusion.....	13
b) Agent d'interaction avec le complexe.....	13
I.7.Toxicité des CDs.....	15
I.8.Principales applications des cyclodextrines.....	16

II. Passage du médicament dans l'organisme.....	17
a) Absorption.....	17
b) Distribution.....	17
c) Elimination.....	17
III. Le méloxicam.....	18
III.1. Propriétés physico-chimiques du méloxicam.....	18
III.2. Pharmacocinétique.....	20
a) Absorption.....	21
b) Distribution.....	21
c) Biotransformation.....	21
d) Elimination	21
IV. Méthodes expérimentales d'analyses	21
IV.1. Méthode de solubilisation.....	22
IV.2. Analyse par la résonance magnétique nucléaire.....	24
IV.3. L'analyse thermique différentielle (DSC).....	25
IV.4. Analyse par la diffraction des rayons X.....	26
IV.5. Techniques spectrométriques.....	27
a) Analyse par FTIR.....	27
b) La spectroscopie d'absorption et d'émission (UV/vis).....	28
V. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	28
VI. Extraction en phase solide.....	20
VII. Contrôle de la biodisponibilité in vitro.....	31

Chapitre II

Partie expérimentale

- Méthodes de préparation des systèmes binaires ME/ β -CD (1:1).....	33
Première méthode (PM).....	33
Deuxième méthode (KD).....	33

Troisième méthode(CS).....	33
II- Méthode expérimentales de caractérisation des complexes.....	33
II-1 Méthode de solubilisation.....	33
II-2 Méthode chromatographique.....	33
III-2-1 Appareillage et réactifs.....	33
a) Réactifs.....	33
b) Appareillage.....	33
III-2-2 Conditions chromatographiques.....	33
III-2-3 Courbes d'étalonnage.....	34
II-2-3-1 Avec étalon.....	34
a)- Préparation des solutions	34
b)- Sans étalon interne.....	36
III.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN- ^1H , ^{13}C).....	36
III.3. L'analyse thermique différentielle (DSC)	36
III.4. Analyse par la diffraction des rayons X	37
III.5. Spectrométrie infrarouge.....	37
III.6.Spectrométrie UV-visible.....	37
IV. Etude de la pharmacocinétique du système ME/ β -CD.....	37
IV.1 Evolution de la dissolution in vitro.....	37
a)Appareillage.....	37
b) Conditions opératoires.....	38
IV.2.Evolution de la dissolution in vivo.....	38
IV.2.1 Conditions opératoires.....	38
IV.2.2.Courbes d'étalonnage.....	38
IV.2.3.Protocole d'extraction.....	39

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1. Caractérisation.....	41
III.1.1 Etude de la solubilité dans l'eau du méloxicam complexé par la cyclodextrine	41
III.1.2 Analyse par spectroscopie UV.....	43
III.1.3 Analyse par spectroscopie infrarouge.....	44
III-1-4 Analyse par DSC.....	47
III-1-5 Analyse par DRX.....	51
III-1-6 Etude par RMN ^1H et ^{13}C du complexe ME/CD.....	53
IV. Analyse chromatographique.....	61
IV.1. Courbes d'étalonnage.....	61
a) Courbe d'étalonnage en absence du sérum.....	61
b) Courbe d'étalonnage en présence du sérum.....	63
b-1.Sélectivité.....	64
V.Biodisponibilité du méloxicam.....	65
V.1.Dissolution in vitro.....	65
V.2.Analyse du méloxicam dans le sérum.....	66
Conclusion générale	68

Références bibliographiques

Liste des figures et tableaux

Figures

<u>Figure (I-1)</u> :Structure de α -(n=6), β -(n=7) et γ -(n=8) des cyclodextrines.....	6
<u>Figure (I-2)</u> :Représentation schématique de la forme de la cyclodextrine et du positionnement des différentes fonctions.....	6
<u>Figure (I-3)</u> :Densité de probabilité de présence des molécules d'eau au voisinage des cyclodextrines.....	8
<u>Figure (I-4)</u> :Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion.....	11
<u>Figure (I-5)</u> :Les différentes formes(cationique,anionique,zwitterionique) du méloxicam.....	19
<u>Figure (I-6)</u> :Diagramme de solubilité type A (Higuchi & Connors).....	25
<u>Figure (I-7)</u> :Diagramme de solubilité type A (Higuchi & Connors).....	26
<u>Figure (I-8)</u> :Schéma d'analyse thermique différentielle.....	27
<u>Figure (I-9)</u> :Schéma de diffraction de rayons X.....	28
<u>Figure (III-1)</u> :Diagramme de solubilité du ME à T=25°C, 37°C, 45°C.....	44
<u>Figure (III-2)</u> :Variation du logarithme de la constante d'équilibre en fonction de l'inverse de la température (Van't Hoff) du ME en présence de la B-CD.....	45
<u>Figure (III-3)</u> :Spectres UV : a) ME pur ; b) ME-CD(1 :1) ; c) ME-CD(1 :2).....	46
<u>Figure (III-3)</u> :Spectres FTIR 1)-CD ; 2)-Me ; 3)-ME-CD (1 :1)CS ; 4)-ME-CD (1 :2)CS....	47
<u>Figure (III-3)</u> : thermogramme de la β -CD.....	50
<u>Figure (III-4)</u> : thermogramme du ME pur.....	50
<u>Figure (III-5)</u> : thermogramme du ME/CD(1 :1)KD.....	51
<u>Figure (III-6)</u> : thermogramme du ME/CD(1 :2)KD.....	51
<u>Figure (III-7)</u> : thermogramme du ME/CD(1 :1)CS.....	52
<u>Figure (III-8)</u> : thermogramme du ME/CD(1 :2)CS.....	52
<u>Figure(III-9)</u> :SpectresRDX :a)M-CD(1 :2)PM ; b)M-CD(1 :2)KD ; c)M ; d)M-CD(1 :2)CS.....	54
<u>Figure (III-10)</u> :spectre RMN ¹ H du meloxicam.....	58
<u>Figure (III-11)</u> : spectre RMN ¹ H du M-CD(1 :1)CS.....	59
<u>Figure (III-12)</u> : Spectre RMN ¹ H de la β -CD.....	60
<u>Figure (III-13)</u> : Spectre RMN ¹³ C de la β -CD.....	61
<u>Figure (III- 14)</u> : Spectre RMN ¹³ C du Meloxicam.....	62
<u>Figure (III-15)</u> : Spectre RMN ¹³ C du M-CD(1 :1)CS.....	63
<u>Figure (III-17)</u> : Courbe d'étalonnage en absence du sérum (avec étalon interne).....	64

<u>Figure (III-18)</u> : Courbe d'étalonnage en absence du sérum (sans étalon interne).....	65
<u>Figure (III-19)</u> : Courbe d'étalonnage en présence du sérum.....	67
<u>Figure (III-20)</u> : Profil de dissolution in vitro du méloxicam pur et complexé.....	68
<u>Figure(III-21)</u> : Chromatogramme représentatif d'un extrait sérique.....	69
<u>Figure (III-22)</u> : Courbes pharmacocinétiques du méloxicam seul et complexé.....	69

Tableaux

<u>Tableau (I-1)</u> : Caractéristiques physico-chimiques des principales cyclodextrines.....	9
<u>Tableau (I-2)</u> : propriétés physico-chimiques du méloxicam.....	20
<u>Tableau (II-1)</u> : conditions chromatographiques.....	36
<u>Tableau (II-2)</u> : préparation des échantillons pour SM1.....	37
<u>Tableau (II-3)</u> : préparation des échantillons pour SM2.....	38
<u>Tableau (III-4)</u> : préparation des échantillons pour SM3.....	40
<u>Tableau (II-5)</u> : protocole de test de dissolution	
<u>Tableau (II-6)</u> : préparation d'échantillons par rapport à SM2.....	41
<u>Tableau (II-7)</u> :préparation d'échantillon par rapport à SM3.....	41
<u>Tableau (II-8)</u> :Protocole d'extraction du méloxicam.....	41
<u>Tableau (III-1)</u> :Constantes d'équilibre de complexation , solubilités aqueuses , coefficients de corrélation et paramètres thermodynamique du ME en présence de la B-CD à T=25°C ,37°C et 40°C.....	44
<u>Tableau (III-2)</u> :Attribution des pics IR du ME.....	48
<u>Tableau (III-3)</u> :Attribution des pics IR de la β -CD.....	48
<u>Tableau(III-4)</u> :Résultats de l'analyse calorimétrique différentielle.....	53
<u>Tableau (III-5)</u> :Attribution des signaux RMN ^1H et ^{13}C de la β -CD.....	55
<u>Tableau (III-6)</u> : Attribution des signaux RMN ^1H et ^{13}C du méloxicam.....	56
<u>Tableau(III-7)</u> : Chromatogrammes représentatifs :I)d'une solution contenant 0.2mg.L ⁻¹ du meloxicam et (10mg.L ⁻¹ du piroxicam ;II) d'une solution contenant (10mg.L ⁻¹)du méloxicam.....	64
<u>Tableau (III-8)</u> : chromatogrammes représentatifs d'un sérum blanc et d'un sérum chargé ...	67
<u>Tableau (III-9)</u> : paramètres pharmacocinétiques du méloxicam seul et complexé.....	69

Introduction

Générale

Le mode d'administration d'un médicament joue très souvent un rôle déterminant dans l'expression de l'activité pharmacologique.

La voie orale constitue le mode d'administration le plus utilisé pour les traitements chroniques mais de nombreuses molécules présentent une faible biodisponibilité orale de part leur faible solubilité aqueuse. Pour cette classe de composés, la dissolution dans l'environnement digestif est l'étape limitante du processus d'absorption.

Les principes actifs relativement lipophiles sont capables de passer à travers les membranes biologiques par diffusion passive. Cette diffusion est régie par la concentration en principe actif dans le milieu aqueux extérieur de la membrane ou dans le vecteur aqueux qui contient le principe actif. Ainsi une plus grande perméabilité pourrait être obtenue avec des principes actifs qui sont à la fois lipophiles et très solubles dans le milieu aqueux extérieur. Cette réflexion a amené les chercheurs à utiliser les cyclodextrines pour améliorer la pénétration de certains principes actifs et donc de conférer aux cyclodextrines le rôle de promoteur d'absorption.

En effet, afin de solubiliser un principe actif lipophile, il est impératif que la surface de contact entre ce dernier et la solution aqueuse soit minimale. Cet objectif peut-être atteint au moyen de complexants présentant une couronne ou une cavité apolaire suffisamment grande pour accueillir le principe actif en son sein. La solubilité du complexe est alors dictée par les groupements fonctionnels présents à la surface du complexe comme, les groupes hydroxyles.

Découvertes il y a près de 100 ans, les cyclodextrines sont des capsules moléculaires produites par conversion enzymatique de l'amidon. Elles ont la propriété de former des complexes d'inclusion avec une grande variété de molécules hôtes dans le but de les protéger de dégradation diverses, physiques ou chimiques, de permettre leur solubilisation dans l'eau ou encore de les extraire de différents milieux. Leur particularité tient à leur structure spatiale : une cavité hydrophobe et une périphérie hydrophile liée à la présence de groupements hydroxyles. Selon l'enzyme utilisée et les conditions expérimentales, on obtient différentes cyclodextrines. Les plus connues sont les alpha, bêta et gamma. La forme bêta est la plus utilisée.

Les conséquences d'inclusion d'un composé faiblement soluble en milieu aqueux par la cyclodextrine sont très nombreuses et sont à la base du très grand intérêt porté aux cyclodextrines et à leur complexes d'inclusion. En général, on observe une augmentation de la

concentration de la molécule invitée dissoute dans le milieu aqueux . Par ailleurs les propriétés spectroscopiques et thermodynamiques de l'invité sont très souvent modifiées.

L'objectif de cette thèse est donc d'étudier la capacité de complexation d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (Méloxicam) par la β -cyclodextrine et par conséquent la valorisation de son effet thérapeutique dont la biodisponibilité est limitée par sa faible solubilité dans l'eau.

Dans un premier temps, différentes méthodes de préparation du complexe ont été employées : mélange physique(PM), malaxage(KD) et co- évaporation(CS).

Ensuite, nous avons réalisé une caractérisation physico-chimique qualitative de l'interaction entre la molécule du méloxicam et la cyclodextrine, suivie de la détermination de la stoechiométrie du couple méloxicam/ β -CD. Pour ce faire, nous avons mené une étude par les techniques de solubilité, de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), d'analyse enthalpique différentielles (DSC), d'analyse par diffraction de rayon X , résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN ^1H et ^{13}C) et de spectroscopie UV. L'analyse qualitative a été réalisée par HPLC. D'autre part nous avons étudié l'évolution de la dissolution du méloxicam via sa complexation avec la β -CD.

Le mémoire présentant les résultats de notre travail comporte cinq chapitres :

Le premier chapitre comprend un aperçu bibliographique sur les propriétés physico-chimiques et structurale des cyclodextrines ainsi que ceux du méloxicam et sur les méthodes les plus utilisées pour analyser leurs complexes d'inclusion.

Les techniques expérimentales utilisées au cours de notre travail sont décrites dans le chapitre II. Il s'agit de :

- La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ;
- L'analyse enthalpique différentielles (DSC) ;
- L'analyse par diffraction de rayon X ;
- Résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN ^1H et ^{13}C) ;
- La spectroscopie UV ;

La partie expérimentale traite aussi l'étude de la réalisation pharmacocinétique du complexe ME-CD.

Enfin,le quatrième chapitre rassemble tous les résultats obtenus sur des complexes d'inclusion de la β -CD avec le méloxicam.

Il s'agit de :

- La solubilité du complexe en fonction du rapport ME/CD ;
- La caractérisation du complexe par les différentes techniques décrites ci-dessus ;
- La pharmacocinétique du complexe chez le rat comparé au ME pur.

Revue

Bibliographiques

I. Les cyclodextrines

I.1 Historique

Les cyclodextrines ont été isolées pour la première fois par Villiers ^[1] en 1891, grâce à l'expérience de la dégradation de l'amidon par une souche de micro-organismes (l'amylase de *Bacillus macerans* : cyclodextrinase). Villiers met en évidence deux produits (probablement l' α - et la β -cyclodextrines) ayant des propriétés physico-chimiques proches de celles de la cellulose. Les cyclodextrines ont été caractérisées en 1903 par Schardinger^[2] en tant que oligosaccharides cycliques ; c'est pour cette raison qu'elles sont nommées dextrines de Shardingner dans les premières publications traitants des cyclodextrines. En 1938 Freudenberg et al^[3] ont mis en évidence que les cyclodextrines sont construites à partir d'unités de D-glucose liées entre elles par des liaisons α (1-4) glucosidiques. Freudenberg^[4] et al ont découvert que les cyclodextrines étaient capable de former des complexes d'inclusion, et déterminent entièrement la structure de la γ -cyclodextrines Dans les années 1950, le groupe de French^[5] et celui de Cramer^[6] ont intensément travaillé sur la synthèse et la purification de complexes de cyclodextrines. Le premier brevet concernant l'application des cyclodextrines pour la mise en forme d'un composé à activité biologique sera déposé par Freudenberg^[7] en 1953. A partir de ce moment, l'étude des cyclodextrines prend un essor considérable : fabrication industrielles, synthèse de cyclodextrines modifiées, synthèse de complexes d'inclusion, etc. Dans les années 1970-80, Szejtli ^[8,9], appelé aussi « godfather » des cyclodextrines apporte une importante contribution dans le domaine. Depuis 1970, on dénombre un peu plus de 130000 documents traitant des cyclodextrines (publications, brevets, abstracts).

I.2. Propriétés des cyclodextrines

I.2.1. Propriétés structurales

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques non-réducteurs de l' α -, la β - et la γ -cyclodextrines contenant respectivement 6, 7 et 8 unités D-glucopyranosiques (Figure I-1) liées en α -1,4. Il existe aussi des cyclodextrines plus grandes (appelées géantes) qui peuvent contenir jusqu'à 14 unités glucopyranosiques^[10,11].

Les cyclodextrines possèdent une cavité d'environ 5 à 8 Å de diamètre qui leur permet d'inclure de nombreux composés organiques pour former des complexes d'inclusion à l'état solide ou en solution. De nombreuses nomenclatures différentes sont utilisées pour désigner les cyclodextrines. Ainsi, la β -cyclodextrine est appelée β -CD, β -CyD ou bien encore C7A. Toutes ces nomenclatures simplifient la nomenclature IUPAC qui est : 5,10,15,20,25,30,35-heptakis(hydroxyméthyl)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29,32,34-tétradécaoxaocyclodécane-36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49-tétradécole.

Grâce aux structures tridimensionnelles obtenues par diffraction des rayons X, la forme tronconique (Figure I-2) des cyclodextrines a pu être déterminée, ainsi que le réseau de liaison hydrogène interglucosidiques des hydroxyles primaires et des hydroxyles des hydroxyles secondaires.

Sur la partie la plus large du cône se trouvent les hydroxyles secondaires (O2 et O3) (Figure 2) et sur l'extrémité la plus étroite se trouvent les hydroxyles primaires (O6). Les oxygènes interglucosidiques (O4) sont situés sur l'équateur du cône et dirigés vers l'intérieur de la cavité. Les hydrogènes H1, H2 et H4 sont dirigés vers l'extérieur de la cavité tandis que les hydrogènes H3 et H5 sont orientés vers l'intérieur. Ces derniers sont les seuls pouvant interagir avec un substrat inclus dans la cavité.

Les cyclodextrines sont des molécules chirales ; chaque unité de glucose contient 5 atomes de carbone asymétrique. La β -cyclodextrine contient donc 35 atomes de carbone asymétriques.

A cause de la structure tronconique et de la position particulière des hydroxyles, les cyclodextrines sont amphiphiles et possèdent donc deux zones de polarités distinctes. L'extérieur de la cavité et les extrémités sont polaires : ceci est dû essentiellement aux hydroxyles et favorise ainsi la solubilisation dans des solvants très polaires. En revanche, l'intérieur de la cavité où se trouvent uniquement les oxygènes interglucosidiques, est moins polaire (polarité de type éther) et cette zone est plus hydrophobe (surface de contact avec la molécule invitée).

C'est ce caractère amphiphile qui donne aux CD leur plus intéressante propriété : former des complexes supramoléculaires en solution aqueuse avec une molécule invitée. Il existe dans la littérature de nombreux exemples de complexes d'inclusion avec divers arrangements structuraux tels que des stoechiométries hôte : invité 1 : 1^[12,13], 2 : 1^[14, 15,16], 1 : 2^[17] et 2 : 2^[18].

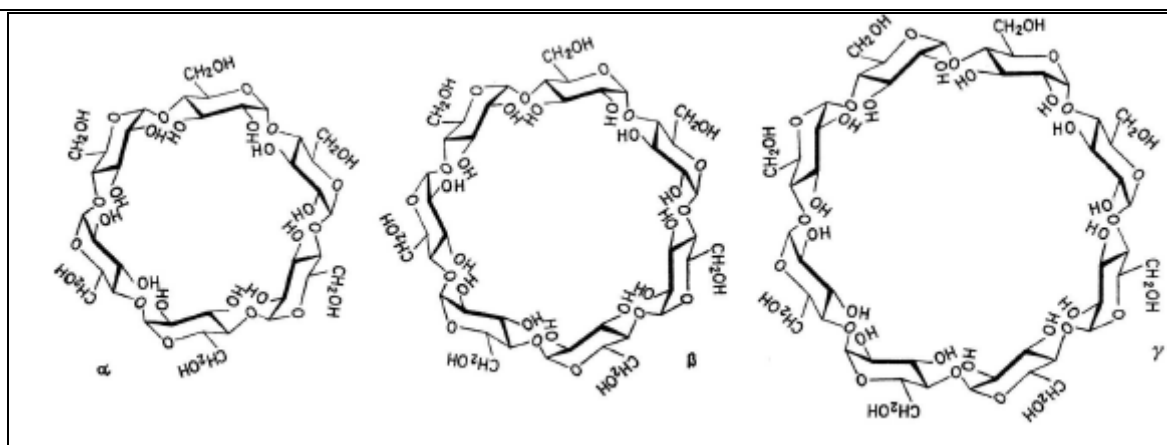


Figure (I-1) : structure de α -(n=6), β -(n=7) et γ -(n=8) cyclodextrines.

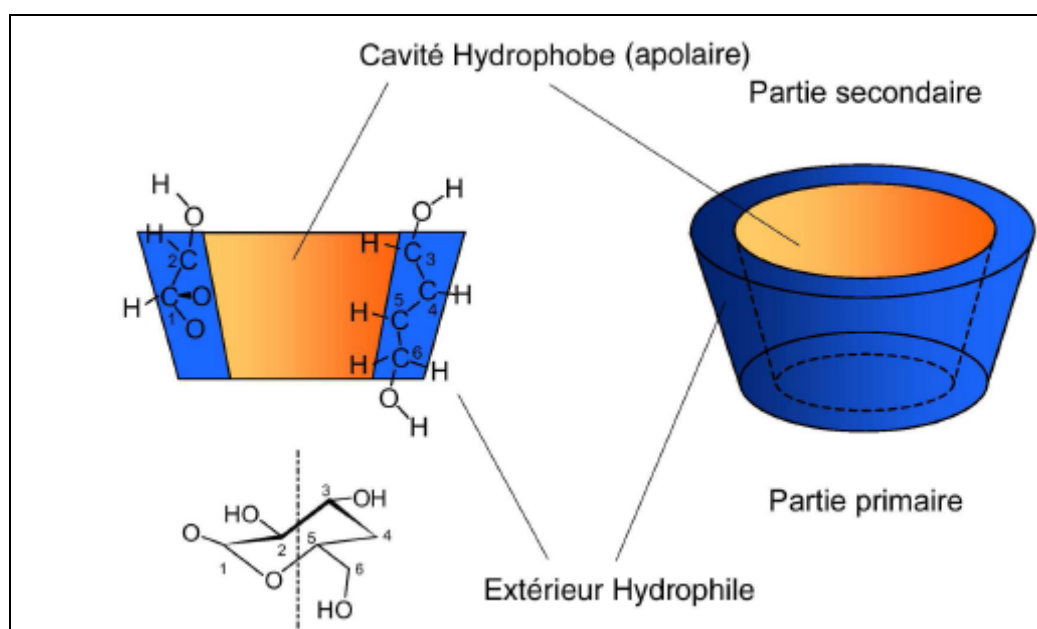


Figure (I-2) : représentation schématique de la forme de la cyclodextrine et du positionnement des différentes fonctions.

I.2.2. Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines :

Les propriétés physico-chimiques et les propriétés d'inclusion des cyclodextrines ont été étudiées essentiellement des années 1930 à 1970.

En raison de la conformation chaise des unités glucopyranose et de l'orientation équatoriale des fonctions hydroxyle, la cavité de la cyclodextrine est tapissée de liaisons C-H qui lui confèrent un caractère relativement hydrophobe, tandis que ses faces externes sont hydrophiles. Des études ont montré que la polarité des cavités de la cyclodextrine est voisine

de celle de l'octanol ^[19]. Les paires d'électrons libres portées par les oxygènes glucidiques sont dirigées vers l'intérieur de la cavité ; cette densité électronique élevée donne à la cyclodextrine un caractère de base de Lewis.

Les CDs sont soluble dans l'eau et dans des solvants polaires aprotiques tels que diméthylsulfoxyde (DMSO), le diméthylformamide (DMF) et la pyridine. Les CDs sont stables en milieu alcalin mais peuvent subir une hydrolyse partielle à pH inférieur à 3,5 à une température supérieure à 60°C, produisant ainsi du glucose et une série de maltosaccharides acycliques.

Les valeurs de solubilité des cyclodextrines dans l'eau à la température de 25°C (tableau I-1) montrent que malgré une forte similitude structurale, les CDs n'ont pas un comportement comparable vis-à-vis des molécules d'eau. La solubilité limitée de la β -CD peut être expliquée par la formation d'une ceinture continue de liaison hydrogènes entre les groupements hydroxyles O₂ et O₃ d'unité de glucose adjacentes qui rend la molécule β -cyclodextrine plus rigide que les molécules de α - ou γ -cyclodextrines^[20] (Figure I-3). En effet, la formation de cette ceinture continue n'est pas possible pour les α - et γ -cyclodextrines : l' α -cyclodextrine possède une unité de glucose en conformation tendue ce qui ne rend possible que l'établissement de 4 liaisons hydrogène sur six possibles ; la molécule de γ -cyclodextrine est quant à elle non planaire et possède une structure moins rigide ce qui lui confère la plus grande solubilité des trois cyclodextrines les plus communes.

Les termes thermodynamiques en solution montrent que la solubilité relativement faible de la β -cyclodextrine est associée à un ΔH° et un ΔS° moins favorables.

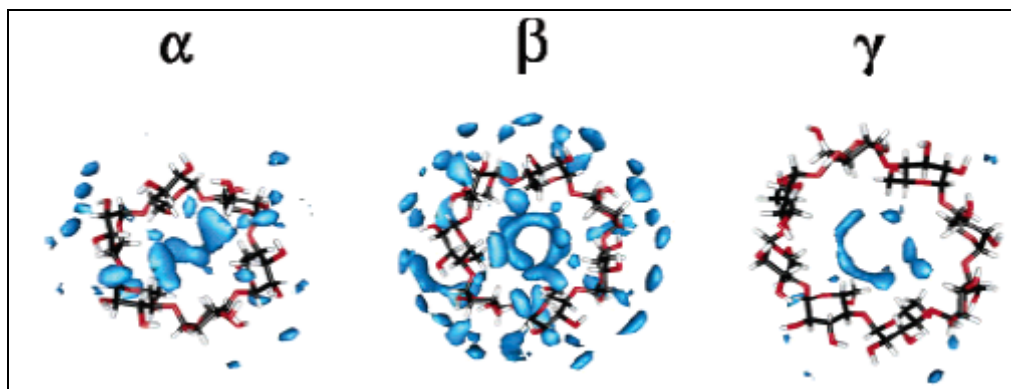


Figure (I-3): Densité de probabilité de présence des molécules d'eau au voisinage des cyclodextrines .

I.3 Propriétés de complexation

La bipolarité des cyclodextrines, hydrophile à l'extérieur et hydrophobe à l'intérieur, est l'une des plus importantes caractéristiques de ces molécules. En effet, cette propriété permet aux cyclodextrines de former des complexes d'inclusion à l'état solide ou en solution avec une grande variété de substance allant des composés organiques ou inorganiques, neutres ou ioniques, polaires ou apolaires aux gaz nobles. Le terme de complexe d'inclusion introduit pour la première fois par Schlenck en 1950 désigne l'association de deux ou de plusieurs composés dont l'un (la molécule invitée) est entièrement ou partiellement inclus dans une cavité formée par la molécule hôte. Les molécules invitée doivent satisfaire à deux conditions : elles doivent comporter un groupement moins polaire que l'eau et être de taille adaptée aux dimensions de la cavité de la molécule hôte ^[21]. En effet, des molécules trop hydrophiles ne pourraient être complexées ainsi que des molécules trop petites qui passeraient au travers de la cavité. Ainsi, la présence sur la molécule invitée, d'un groupement relativement hydrophobe et de taille proche de la cavité de la molécule hôte permet d'obtenir des complexes d'inclusion stables.

D'une manière générale, les petites molécules possédant un seul noyau aromatique (dérivés du benzène) ou une chaîne aliphatique courte épousent bien la cavité de l' α -CD ; celles composées de deux noyaux (dérivés du naphthalène, du biphenyle...) se complexent à la β -CD et les pyrènes substitués s'incluent dans les cavités de la γ -CD. Des molécules plus volumineuses peuvent également se complexer aux CDs en ne pénétrant que partiellement dans la cavité ou en mobilisant deux molécules de cyclodextrine^[22].

La faculté de complexation des CDs peut être améliorée par une modification chimique de ces dernières, notamment par substitution des atomes d'hydrogène des fonctions hydroxyle ou des groupements hydroxyles eux-mêmes.

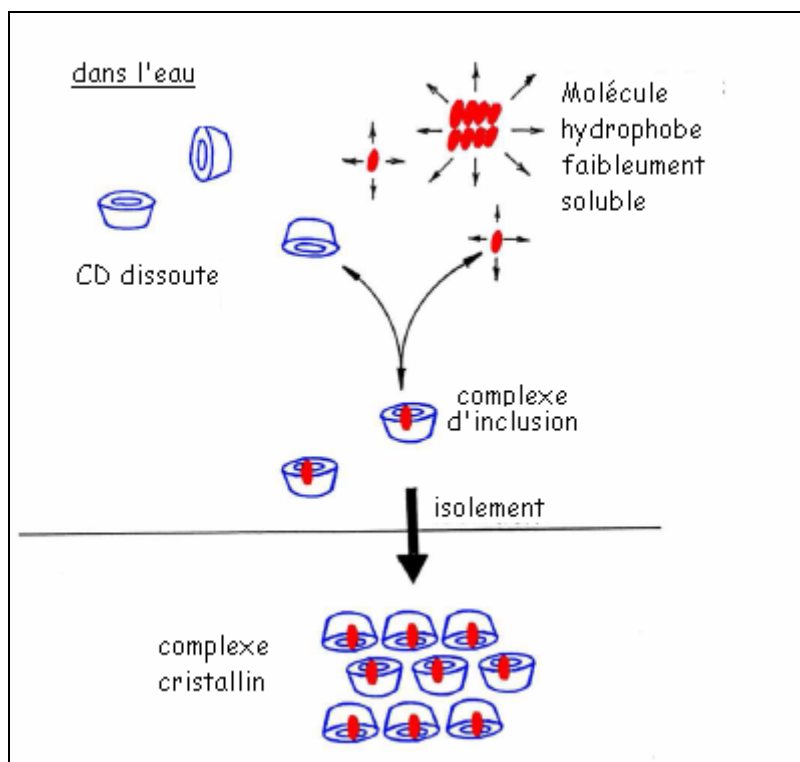
	α CD	β CD	γ CD
Nombre d'unités glucose	6	7	8
M (g/mol)	972	1135	1297
Formule brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Solubilité dans l'eau à 298K (g/l)	145	18.5	232
$[\alpha]_D^{25^\circ}$	150 $\pm$ 0.5	162 $\pm$ 5 0.5	177.4 $\pm$ 0.5
Diamètre de la cavité interne ($\text{\AA}$)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Diamètre de la cavité externe ($\text{\AA}$)	14.6	15.4	17.5
pKa	12.33	12.2	12.08
Point de fusion et de décomposition ($^\circ\text{C}$)	551	572	540
Hydratation CD, n H ₂ O	6 à 12	10 à 12	7 à 13
ΔH° (solution) Kcal.mol ⁻¹)	8.36	9.98	11.22
ΔS° (solution) Kcal.mol ⁻¹)	13.8	11.7	14.7
La forme des cristaux	Plaques hexagonales	Parallélogrammes monocliniques	Prismes quadriques

Tableau (I-1) : Caractéristiques physico-chimiques des principales cyclodextrines

I.4. Mécanisme de formation des complexes d'inclusion

Le principe général d'un invité dans la cavité moléculaire de la cyclodextrines est basé sur le gain énergétique réalisé par le système hôte-invité lors du processus. En effet, en solution aqueuse, la cavité légèrement apolaire de la cyclodextrines est occupée par des molécules d'eau qui engendrent des interactions énergétiques défavorables de type polaire/apolaire^[23,24]. Ainsi ces molécules d'eau peuvent être substituées par une molécule invitée moins polaire. L'association et la dissociation du complexe formé entre la cyclodextrine et l'invité sont alors gouvernées par l'équilibre thermodynamique suivant dans le cas d'une complexation entre une molécule de cyclodextrine et une molécule invitée.

Les interactions intermoléculaires responsables de la stabilité du complexe sont encore sujettes à discussion. Ainsi plusieurs forces intermoléculaires coexistent simultanément afin de favoriser et de préserver la stabilité du complexe, la relativité de chacune des forces dépendant de la molécule invitée et du solvant. Les plus importantes de ces forces intermoléculaires assurant la stabilité du système hôte-invité sont les interactions de van der Waals^[25] qui sont prédominantes du point de vue énergétique. L'invité est alors stabilisé à l'intérieur de la cavité moléculaire de la cyclodextrine par des interactions faibles avec les hydrogènes H3 et H5 de la cyclodextrine. Cependant cette interprétation ne permet pas d'expliquer l'inclusion de composés polaires dans les cyclodextrines. La stabilité de tels complexes serait alors due à la formation de liaisons hydrogènes entre les hydroxyles des cyclodextrines et les hétéroatomes de l'invité^[26]. Néanmoins il est très difficile d'établir de façon générale les forces conduisant à l'inclusion et à la stabilisation d'une molécule invitée dans la cavité de la cyclodextrine, celles-ci dépendant très fortement de la nature de l'invité. Ainsi les interactions responsables peuvent être de type dipolaire^[27] lorsque l'invité et la cyclodextrine s'orientent de façon à ce que l'interaction entre leurs moments dipolaires soit maximale. La formation et la stabilité de ces systèmes peuvent être également dues, dans une moindre mesure, à des interactions coulombiques, hydrophobes^[28], aux forces d'induction de Debye (essentiellement dipôle permanent/ dipôle induit) ou encore de dispersion de London^[29].



Figure(I-4) :représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion

I.5 .Principales techniques de préparation des complexes d'inclusion :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la formation des complexes d'inclusion telles que la coprécipitation, la lyophilisation (freeze drying), le spray-drying,...etc. Pour toutes ces méthodes, il est important de savoir que les quantités utilisées sont régies par le rapport d'inclusion ^[30].

☞ Co-précipitation :

Une quantité de principe actif est ajoutée à la quantité équivalente de cyclodextrine dissoute préalablement dans l'eau (ou dans une solution tampon). La suspension formée est mélangée à température ambiante pendant quelques jours. Le précipité est séparé soit par décantation, soit par centrifugation, soit par filtration sous vide puis lavé avec quelques millilitres de solvant organique froid (le méthanol par ex.), pour enlever le principe actif non complexé .

☞ **Le séchage par pulvérisation (spray-drying) :**

La cyclodextrine est dissoute dans de l'eau (ou solution tampon), le principe actif, compte à lui, est dissout dans un solvant organique adéquat. La solution finale obtenue, après mélange et passage aux ultrasons, est nébulisée (méthode de séchage).

☞ **Slurry complexation:**

On ajoute 50 à 60% de CD à un volume d'eau. Ainsi, après mise sous agitation, on obtient une solution saturée en CD. L'invité est alors complexé par la CD en solution. Une fois que la phase aqueuse est saturée par le complexe formé, ce dernier se cristallise ou se précipite.

☞ **Malaxage (kneading) :**

Une petite quantité d'eau est ajoutée à la molécule invitée pour obtenir une pâte. Cette dernière est mélangée à la CD dans un mortier ou broyeur à pilon durant environ 10 minutes. Le complexe obtenu peut être séché directement ou moulu s'il présente une masse solide très importante.

☞ **Mélange humide ou « dump mixing » :**

La molécule invitée et la CD préalablement bien mélangés sont mis dans une fiole scellée en présence d'une petite quantité d'eau. Le contenu est chauffé à environ 100 °C puis séparé et séché.

☞ **Mélange physique :**

Comme son nom l'indique c'est le mélange des deux substances (CD et molécule invitée) directement à l'état poudre dans un mortier en verre et ce après tamisage afin d'avoir la même granulométrie pour le PA et la CD.

☞ **Lyophilisation :**

La lyophilisation est une dessiccation sous vide, à basse température de produits liquides préalablement congelés. La molécule invitée est ajoutée à la solution aqueuse de cyclodextrine. Après mélange sous agitation, la suspension obtenue est congelée puis lyophilisée dans un lyophilisateur.

I.6.Paramètres influençant la formation des complexes d'inclusion

I.6.1.Influence de la température:

La température a un double effet sur le complexe formé: d'une part elle augmente généralement sa solubilité, mais en même temps elle modifie sa stabilité. L'effet de la température dépend de la nature du substrat et de la cyclodextrine. Globalement, il apparaît qu'une élévation de la température est souvent défavorable à la formation des complexes CD/principe actif^[31].

I.6.2. Influence de la méthode de préparation:

Les méthodes de préparation des complexes d'inclusion telles que la dispersion solide, kneading, l'évaporation du solvant, la co-précipitation, le spray drying et la lyophilisation, peuvent affecter l'inclusion du principe actif / CD. L'efficacité de la méthode dépend de la nature du principe actif et de la cyclodextrine. Dans la plupart des cas, le spray drying et la lyophilisation sont les méthodes les plus efficaces pour l'inclusion des principes actifs^[32].

I.6.3. Influence de la présence d'un solvant organique:

L'influence d'un co-solvant sur la complexion d'une molécule invitée par une CD dépend de la nature et la concentration du solvant organique présent^[33].

a) Agent de diffusion : n'importe quel solvant favorisant une interaction de la substance active avec la molécule hôte. Cet agent de diffusion est choisi dans le groupe constitué par les alcools, les cétones, les éthers, les esters et l'eau.

L'agent de diffusion peut être ajouté en continu ou en discontinu dans une quantité comprise entre 1 et 50% en masse, de préférence entre 10 et 25% en masse. Par exemple la présence d'un agent de diffusion permet une forte interaction des particules de piroxicam avec les cyclodextrines, ce qui favorise la dissolution en milieu aqueux.

b) Agent d'interaction avec le complexe: tout agent organique ou minéral améliorant les propriétés physico-chimiques, en particulier les propriétés de solubilisation en milieu aqueux, du complexe moléculaire par interactions sans liaisons covalentes avec la substance active incluse dans la molécule hôte ou directement avec le complexe moléculaire. L'agent

d'interaction avec le complexe est un tensioactif par exemple le lauryl sulfate de sodium, un acide ou une base. Le choix d'un agent acide ou basique dépendra de la nature acide ou basique de la substance active. Ainsi, préférentiellement, un agent acide sera utilisé avec un complexe moléculaire contenant une substance active basique et un agent basique avec un complexe moléculaire contenant une substance active acide. L'agent d'interaction avec le complexe est choisi parmi un acide aminé, un acide carboxylique, un acétate, un carboxylate, une amine ou l'ammoniaque, avantageusement sous forme de solution ammoniacale à 28 %. De façon encore plus avantageuse, il est choisi parmi l'acide acétique, l'acide tartarique, l'acide citrique, l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide lactique, l'acide maléique, l'acide fumarique, la L-Lysine, la L-valine, la L-iso-leucine, la L-arginine ou l'ammoniaque. De façon encore plus avantageuse, il s'agit de l'ammoniaque.

Cet agent d'interaction avec le complexe interagit selon deux hypothèses plausibles :
☞ interactions fortes avec la substance active incluse dans la molécule hôte lors des étapes précédentes, et/ou interactions fortes avec le complexe formé. Ceci permet d'améliorer principalement les propriétés de dissolution du complexe dans les liquides biologiques, et notamment l'eau et éventuellement d'augmenter le taux d'inclusion de la substance active dans la molécule hôte.

☞ L'amélioration des propriétés physico-chimiques, notamment en terme de dissolution du système formé peut avoir pour origine - Une interaction non covalente de l'agent d'interaction avec le complexe avec la substance active, la molécule hôte ou les deux (complexation, salification...).

Différents documents font part de l'amélioration de la solubilité d'une substance active par addition d'agent d'interaction avec le complexe ^[34]. La solubilité de la substance active seule, de la substance active en présence de l'agent d'interaction avec le complexe, du complexe binaire substance active/cyclodextrine et enfin du complexe ternaire substance active/cyclodextrine/agent d'interaction avec le complexe sont étudiés. Ainsi, Buvâri-Barcza et al. ^[35] étudient la solubilité des complexes (acide benzoïque/ β -cyclodextrine) et (benzène/ β -cyclodextrines) en présence d'acide acétique. La solubilité du (complexe benzène/ β -cyclodextrines) est indépendante de la concentration en acide acétique alors que celle du complexe (acide benzoïque/ β -cyclodextrines) croît avec la concentration en acide acétique. L'interprétation des auteurs est la suivante : dans le complexe ternaire (molécule / β -cyclodextrine/acide acétique), les liaisons hydrogène potentielles entre la molécule et la cavité intérieure de la cyclodextrine sont promotrices d'autres interactions à l'extérieur de la

cyclodextrine. De même, Mura et al.^[36] mesurent la solubilité de l'éconazole en présence de cyclodextrines (α -, β -, γ -, hydroxypropyl- β -cyclodextrines) et d'hydroxyacides (acides tartarique, citrique, gluconique, malique et lactique). Les auteurs concluent à l'effet synergique observé dans le complexe ternaire, puisque les solubilités observées sont jusqu'à 20 fois plus élevées que celle d'un complexe binaire éconazole/cyclodextrine.

Les mêmes auteurs^[37] ont également étudié les complexes ternaires du type naproxen/hydroxypropyl- β -cyclodextrine/acide aminé. Les complexes cités sont préparés soit par co-broyage, soit par co-évaporation d'une solution eau/éthanol contenant les 3 composés. Piel et al.^[38] présentent une étude de solubilité d'un complexe nimesulide/L-Lysine/ β -ou γ -cyclodextrine obtenu par spray-drying ou évaporation. La solubilité du complexe ternaire est, selon le pH de la solution, jusqu'à 3600 fois plus importante que le nimesulide seul. Là encore, les auteurs parlent d'un effet synergique de la cyclodextrine et de la L-Lysine. Fenivesy et al.^[39] s'intéressent à la complexation des substances actives terféndine, dompéridone et astémizole avec l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine en présence d'hydroxyacides.

Van Hees et al.^[40] décrivent l'utilisation d'un agent d'interaction avec le complexe, la L-lysine ou le trométamol, dans la préparation d'un complexe Piroxicam/ β -cyclodextrine par CO₂ supercritique. L'utilisation de L-lysine ou de trométamol leur permet à la fois d'augmenter le taux d'inclusion du piroxicam dans la bêta-cyclodextrine et d'améliorer la dissolution du complexe formé.

I.7.Toxicité des CDs

En général les CDs sont considérés comme relativement peu toxiques par administration par voie orale. Ces molécules ne diffusent quasiment pas à travers les membranes biologiques et ne sont pas absorbées lors du transit intestinal (DL50 oral du rat 18800 mg/kg pour la β -CD).

Certains CD sont utilisées dans beaucoup de formulations médicamenteuses et sont ingérées par voie orale^[41]. Nous pouvons alors les considérer comme agents de formulation plutôt que comme des réactifs chimiques ordinaires (contrairement aux agents de complexation ou de solubilisation) tels que les solvants organiques ou détergents.

I.8.Principales applications des cyclodextrines

On trouve un très grand nombre d'applications dans plusieurs domaines ^[42] :

Dans le domaine agroalimentaire, les principaux champs d'application actuels sont l'encapsulation d'arômes et l'extraction du cholestérol.

L'encapsulation réduit la volatilité des arômes et accroît ainsi les durées de stockage. Des produits sans cholestérol (œufs, beurre) obtenus par utilisation de cyclodextrines ont été commercialisés.

Les vitamines, comme les vitamines B et E sont protégées contre l'oxydation, la dégradation thermique ou les réactions chimiques. Les cyclodextrines peuvent être utilisées pour masquer le goût amer de certains hydrolysats de protéines ou celui de l'ail.

Une des application les plus prometteuses en agroalimentaire reste l'extraction de composés spécifique : la caféine du thé ou du café ou encore les composés amers des fruits.

La cosmétique ouvre un large champ d'applications aux cyclodextrines : protection des composés actifs, solubilisation de composés lipophiles, pénétration de composés actifs à travers la peau, stabilisation des émulsions...

Les cyclodextrines peuvent prévenir la perte des parfums, l'oxydation des acides gras et des vitamines. Elles permettent la pénétration de certains composants actifs, carnitine, à travers la peau, du fait de leur affinité pour les membranes cellulaires. Elles peuvent être utilisées pour réduire les odeurs de soufre des préparations pour permanentes ou encore pour effet matifiant, dû à leur capacité à complexer les lipides de la peau en excès.

En pharmacie, la plus ancienne application est le masquage des ingrédients amers, dans les formulations liquide ou solides. Le second champ d'application est l'accroissement de la biodisponibilité de médicaments très faiblement solubles. Cet accroissement de la biodisponibilité est souvent corrélé avec l'amélioration de la solubilité dans le tractus intestinal. Des travaux récents portent sur l'absorption nasale des drogues.

En chimie, les cyclodextrines permettent le transfert de substance lipophile de la phase organique à la phase aqueuse en formant des complexes d'inclusion solubles dans l'eau ; ce sont donc des agents de transfert de charge actifs.

II. Passage du médicament dans l'organisme :

Une fois administré, un médicament suit trois phases : l'absorption, la distribution et l'élimination ^[43]

Leur étude est nommée pharmacocinétique.

a) Absorption

L'absorption est le passage du médicament de son site d'administration vers la circulation générale. Une fraction seulement de la dose est administrée atteint la circulation générale (biodisponibilité, ou biodisponibilité biologique).

La biodisponibilité doit être assez grande pour que le médicament soit absorbé en quantité suffisante et assez rapidement pour avoir l'efficacité souhaitée. Elle dépend des propriétés physicochimiques du médicament (solubilité, vitesse de dissolution, etc.).

b) Distribution

Après son entrée dans la circulation générale, un médicament se distribue dans tout l'organisme. Sa répartition entre les différents tissus est inégale, du fait des différences de perméabilité, de volume ou d'irradiation sanguine de ces tissus.

Le fait que le médicament commence à être métabolisé (transformé physicochimiquement) dès son entrée dans l'organisme rend le processus de distribution instable et complexe.

c)Élimination

L'organisme tente d'éliminer de plus rapidement possible toute substance étrangère et/ou toxique qui a été introduite. L'élimination se fait par excrétion directe (élimination sans transformation du médicament) ou par excrétion des médicaments

dans l'organisme) grâce aux divers organes servant à évacuer les déchets du métabolisme : rein, foie, poumon, intestin, etc.

III-Le méloxicam

Le méloxicam est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) de la famille des acides énoliques et de la classe des oxicams.

Il inhibe la synthèse des prostaglandines, ce qui lui confère des propriétés anti-inflammatoire, antalgique, anti-exsudative et antipyrétique^[44].

III-1 Propriétés physico-chimiques du Méloxicam

Le meloxicam est pratiquement insoluble dans l'eau (nature aromatique lipophile) et présente un caractère acide.

Il s'agit d'un acide faible dont les pKa sont 1,1(attribué à la fonction énol) et 4,2 (cycle pyrazole).

Selon la valeur de pH du milieu de dissolution, la molécule du méloxicam existera donc sous différentes formes, à savoir :

(pH<1.1) : -le cycle pyrazole est protonée en ion pyrazolinium(-NH⁺) ;

-la fonction énone n'est pas ionisée (-OH). C'est la forme cationique(Figure I-4-b).

(1.1<pH<4.2) : -le cycle pyrazole est protoné (-NH⁺) ;

-la fonction énone est ionisée en énolate (O⁻)(figure I-c) ou bien la fonction amide est ionisée en amidate (N⁻). C'est la structure zwitterionique du meloxicam (Figure I-4-c)

En terme de conformation moléculaire la structure zwitterionique est plane. Cette planéité résulte de liaisons hydrogènes intramoléculaires entre l'anion énolate et le groupe amide d'une part puis la fonction carbonyle et le cation pyridinium d'autre part.

(pH>4.2) : la fonction émol est ionisée et le cycle n'est pas protoné. C'est la forme anionique (figureI-4-a) [45].

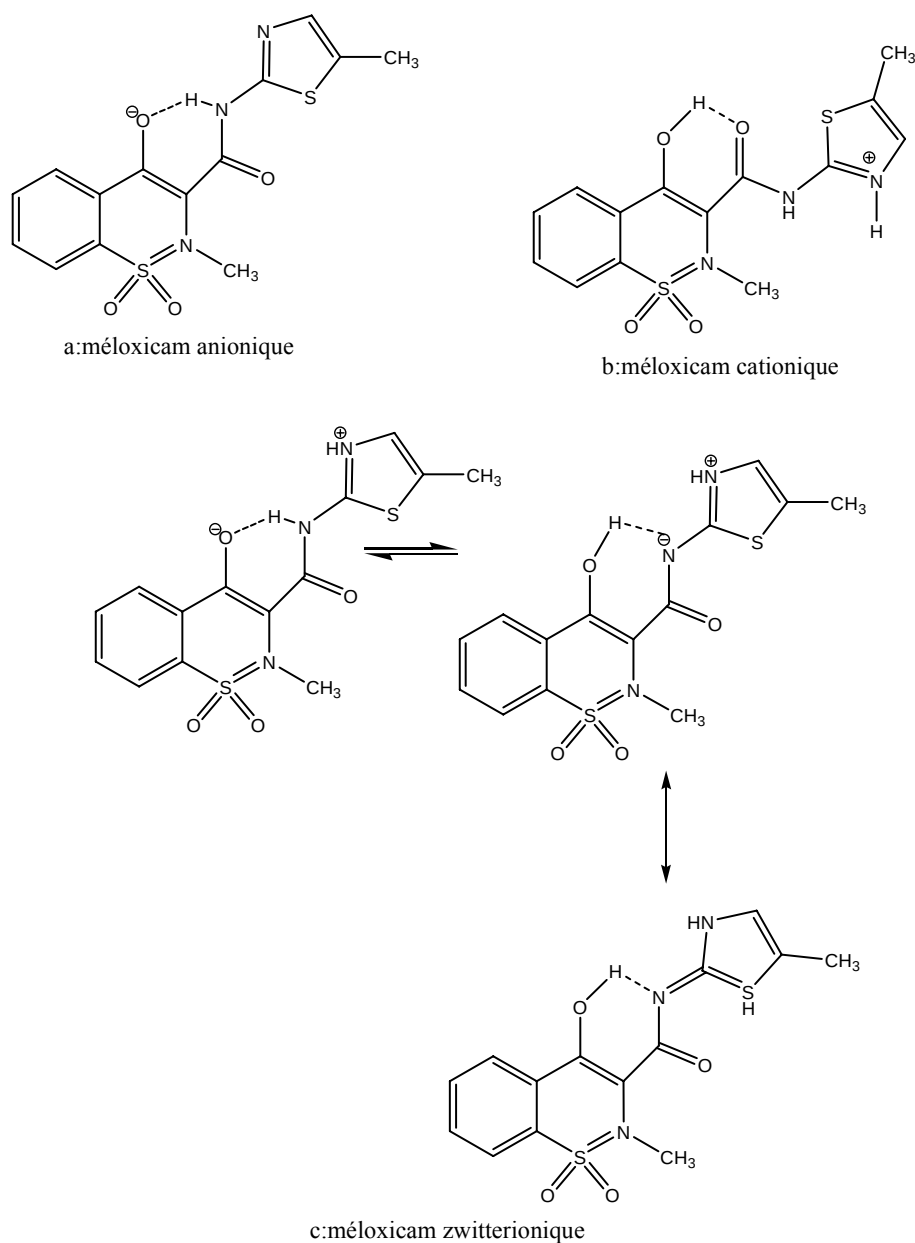
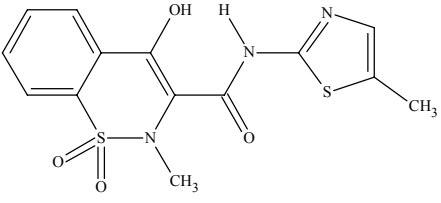


Figure (I-5) : Les différentes formes (cationique,anionique,zwitterionique) du méloxicam

Le méloxicam a pour formule chimique le 4-hydroxy-2-méthyl-N-(5-mthyl-2thiazolyl)-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxyde dont la formule chimique développée est représentée dans le tableau (I-2).

Non du produit	MOBIC®
Dénomination Commune Internationale (DCI)	Méloxicam
Groupe chimique	Enol
Dénomination chimique	4-hydroxy-2-méthyl-N-(5-méthyl-2-thiazolyl)-2H-1,2-benzo-thiazine-3-carboxiamide-1,1-dioxide.
Formule brute	$C_{14}H_{13}O_4N_3S_2$
Formule moléculaire	
Poids moléculaire(g/mol)	351
Point de fusion (°C)	242-250
Caractères	Aspect :poudre jaune. Solubilité : soluble dans le DMF ,DMSO.
(LogP)app(noctanol/tampon), pH=7,4 PH=3	0.7 2.68

pKa	1,1 et 4,2
-----	------------

Tableau (I-2) : propriétés physico-chimiques du meloxicam.

III.2.Pharmacocinétique

La pharmacocinétique du méloxicam est dominée par son caractère acide faible et la liposolubilité de leur forme non ionisée^[46].

a)Absorption

Après administration orale, le méloxicam est complètement absorbé et les concentration plasmatiques maximales sont atteintes en 4 à 5 heures.

b) Distribution

La distribution des AINS de type acide faible, tel que le méloxicam, est principalement extracellulaire. Son volume de distribution apparent est faible de l'ordre de 0.3l/Kg.

Aux doses thérapeutiques recommandées, il existe une corrélation linéaire entre la dose administrée et la concentration plasmatique. La liaison du méloxicam aux protéines plasmatiques est d'environ 97%.

c) Biotransformation

Le métabolisme des AINS est le plus souvent hépatique par l'intermédiaire d'enzymes de type oxydase.

Le méloxicam se retrouve principalement dans le plasma et est essentiellement excrété par voie biliaire tandis que les urines ne contiennent que des traces du produit inchangé. Le méloxicam est métabolisé en un dérivé alcool, un dérivé acide et plusieurs métabolites polaires. Il a été démontré que tous les principaux métabolites sont pharmacologiquement inactifs.

d) Elimination

La demi-vie d'élimination du méloxicam est longue, environ 24 heures, et peut varier entre 17 et 36 heures. Près de 75% de la dose administrée se retrouve dans les fèces, le reste étant excrété par voie urinaire.

IV. Méthodes expérimentales d'analyses

Il existe plusieurs techniques permettant d'étudier ces complexes d'inclusion. Elles permettent, d'une part de mettre en évidence leur formation, et de déterminer leur stoechiométrie et leur stabilité.

Ces différentes techniques reposent sur les modifications des propriétés physico-chimiques ou optiques.

Les techniques utilisées au cours de ce travail sont :

IV.1. Méthode de solubilisation

Cette approche, telle que développée par **Higuchi et Connors**^[47], est très couramment utilisée pour l'évaluation de l'utilisation potentielle des cyclodextrines afin d'augmenter la solubilité de composés hydrophobes en milieu aqueux. Elle permet en effet d'obtenir le profil de la courbe de solubilité de la molécule invitée en fonction de la concentration en cyclodextrines et donc de prouver l'augmentation de la solubilité en présence de cyclodextrines.

Le principe de cette méthode consiste à ajouter le composé invité en quantité excédentaire à des solutions de cyclodextrines de concentrations croissantes, puis à doser la quantité de composé invité dissous.

Un diagramme de solubilité de l'invité en fonction des concentrations de cyclodextrines peut ainsi être établi. Deux types de diagrammes sont généralement observés : type A (FigureI-6) et B(FigureI-7).

Dans le diagramme de type A, la solubilité de l'invité augmente avec la concentration en cyclodextrines. Il y a formation d'un ou plusieurs complexes solubles. Les courbes de type A sont subdivisées en trois (03) sous types A_L , A_P et A_N :

- A_L : représente une augmentation linéaire de la solubilité du principe actif en fonction de la CD. Elle correspond à la formation d'un composé d'inclusion dont la stoechiométrie est équimolaire (1 : 1 ou 2 : 2 ou 3 : 3)
- A_P : cette courbe est dite «positive», c'est-à-dire incurvée vers le haut. Dans ce cas, le rapport est non équimolaire, il faut plusieurs molécules «ligand» pour une molécule de CD.

○ **A_N**: cette courbe est dite «négative», c'est-à-dire incurvée vers le bas. Cependant, son origine reste incertaine, elle pourrait être due à un changement de la constante de formation du complexe, à l'altération du solvant ou bien encore à l'association de molécules de ligands entre elles à de fortes concentrations.

Dans le diagramme de type B, la solubilité du composé d'inclusion est inférieure à celle de la cyclodextrine pure: la solubilité de l'invité augmente dans la 1^{ère} partie de la courbe à cause de la formation du composé d'inclusion, mais quand la limite de solubilité est atteinte, la formation accrue de composé d'inclusion provoque sa précipitation, représentée par un plateau. Lorsque l'excès de principe actif est consommé, on observe une décroissance qui serait liée à l'inclusion du principe actif dissout et à sa précipitation concomitante. Ce diagramme est subdivisé en deux (02) sous types B_S et B_I :

○ **B_S** : caractérise la formation des complexes à solubilité limitée.

○ **B_I** : indique la formation des complexes insolubles.

L'établissement de ces diagrammes de solubilité permet de calculer à partir de la portion ascendante rectiligne de la courbe, une constante de stabilité apparente K (M⁻¹), en se fondant sur l'équation suivante, dans le cas où la stoechiométrie du complexe est 1:1 [48]:



où CD est le hôte ; D:l'invité ; D.CD : le complexe ;

$$K_{1:1} = \frac{[D.CD]}{[D][CD]} \quad (2)$$

$$[D] = S_0 ; \quad (3)$$

$$[CD]_t = [CD] + [D.CD] \quad (4)$$

$$[D]_t = [D] + [D.CD] \quad (5)$$

En remplaçant (2) et (3) dans (5), on aura :

$$S_t = S_o + K_{1:1} * S_o \frac{1}{(1 + K_{1:1} * S_o)} ; \quad S_t = [D]_t$$

On pose:

$$\alpha = \frac{K_{1:1} * S_o}{1 + K_{1:1} * S_o} ; \quad K_{1:1} = \frac{\alpha}{S_o (1 - \alpha)}$$

avec :

α : pente de la droite ascendante du diagramme de solubilité.

S_o : solubilité apparente du principe actif dans l'eau (M).

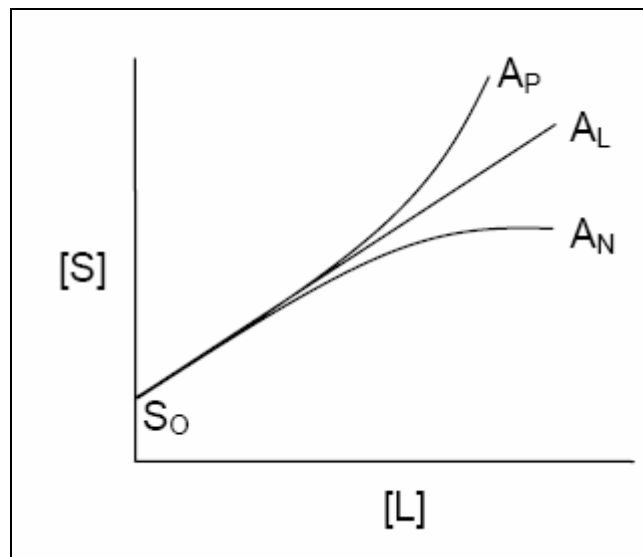


Figure (I-6) : Diagramme de solubilité type A (Higuchi & Connors).

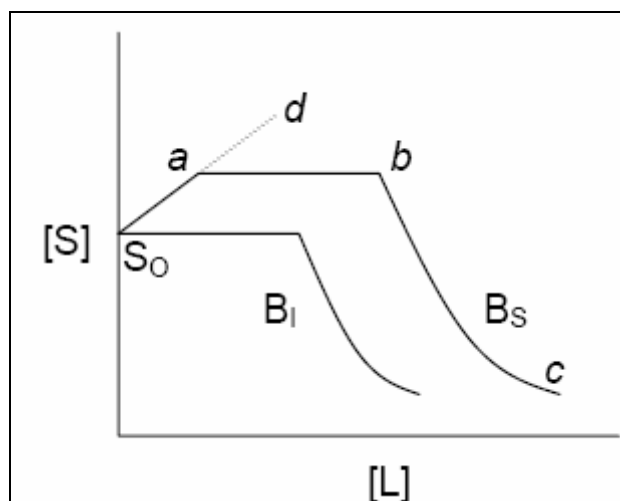


Figure (I-7) : Diagramme de solubilité type B (Higuchi & Connors).

IV.2. Analyse par la résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie RMN est devenue la méthode la plus importante pour l'élucidation de la structure des composés organiques, particulièrement à l'état liquide. Son utilisation pour l'étude des complexes d'inclusion des CD repose sur l'idée suivante :

Si la molécule 'invitée' a pénétré dans la cavité de CD, les atomes d'hydrogène situés à l'intérieur de la cavité (H-3 et H-5) seront considérablement perturbés, tandis que ceux qui se trouvent sur la surface externe (H-2, H-4 et H-6) ne sentent pas d'influence^[49].

La RMN utilise le principe de l'aimantation de certains noyaux atomiques présentant une distribution anisotrope de charge, le spin. Placés dans un champ magnétique (B_0), ils interagissent avec lui.

En effet soumis à B_0 , les noyaux ne perçoivent pas tous le même champ magnétique. Le champ magnétique extérieur induit une circulation d'électrons autour du noyau considéré et en retour cette circulation de charge produit un champ magnétique très faible. Il en résulte que le champ au voisinage est différent. La RMN du proton permet d'identifier une molécule d'après le déplacement de ses protons. Toute modification de l'environnement du noyau, comme par exemple l'approche d'une autre molécule provoquera des modifications de son déplacement chimique. Ceci est particulièrement intéressant pour les cyclodextrines pour lesquelles il est possible de repérer les variations de déplacements chimiques des protons situés à l'intérieur de la cavité (H3, H5). Lorsqu'il y a inclusion, ceux-ci sont les plus affectés

IV.3. L'analyse thermique différentielle (DSC)

Dans le cas des complexes d'inclusion, la DSC est l'une des techniques la plus couramment utilisée car elle permet de comparer les propriétés thermiques des produits isolés et des complexes présumés. En effet, l'observation de nouveaux pics ou la disparition d'un accident thermique de la molécule invitée donne des indices sur la présence d'un éventuel complexe ^[50].

Le but de cette technique est d'enregistrer la différence entre le changement d'enthalpie qui se produit dans un échantillon et celle d'une référence inerte quand ils sont soumis à l'effet de la chaleur. L'échantillon étudié et la référence sont munis d'appareil de chauffage individuel (voir figure I-7). Avec la calorimétrie différentielle à balayage, il est possible d'obtenir des valeurs d'enthalpie à partir de l'aire sous les pics. En plus de mesurer les changements enthalpiques de réactions chimiques ou de changements de phase, cette technique permet entre autre de mesurer la capacité calorifique, la pureté des composés ainsi que les vitesses de réaction.

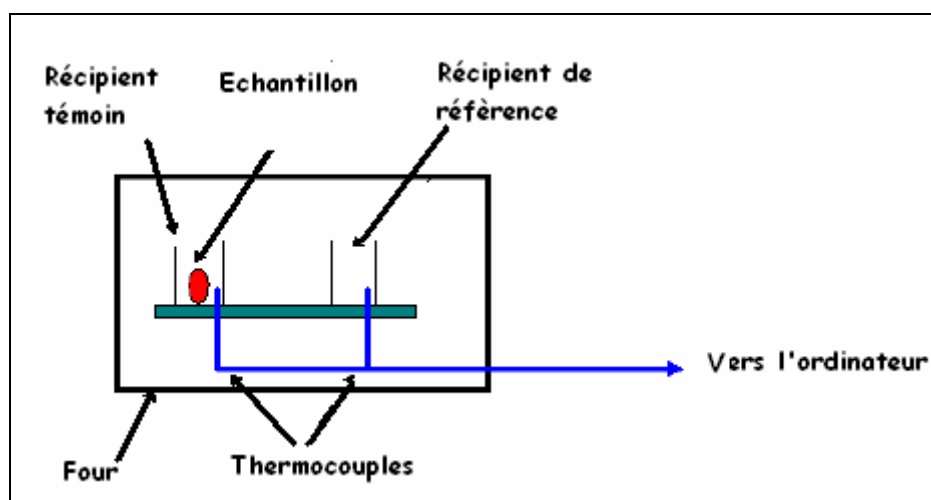


Figure (I-7) : schéma d'analyse thermique différentielle

IV.4. Analyse par la diffraction des rayons X

L'étude des complexes d'inclusions par diffraction des rayons X est très souvent employée et permet, d'obtenir des informations sur la cristallinité de la substance incluse ^[51].

Un faisceau de rayons X monochromatique et parallèle qui frappe un cristal est diffracté dans une direction donnée par chacune des familles des plans réticulaires à chaque fois que la condition ou loi de Bragg est réalisée :

$n\lambda = 2d \sin\theta$: ordre de la diffraction λ : longueur d'onde du faisceau de rayons X,

d : distance de deux plans réticulaires,

θ : angle d'incidence des rayons X .

Pour que la diffraction se produise, il faut que les ondes diffractées par les différents plans soient en phase, c'est-à-dire que la différence de marche des rayons rencontrant ces plans soit égale à un nombre entier. Dans ce cas, l'angle suivant lequel le faisceau de rayons X est dévié est égal à l'angle d'incidence θ et est caractéristique de la distance interplanaire ou interréticulaire d . Si l'on connaît la longueur d'onde λ du faisceau de rayons X, on peut mesurer à partir de l'angle θ l'équidistance d et ainsi identifier la nature du cristal (figure I-7).

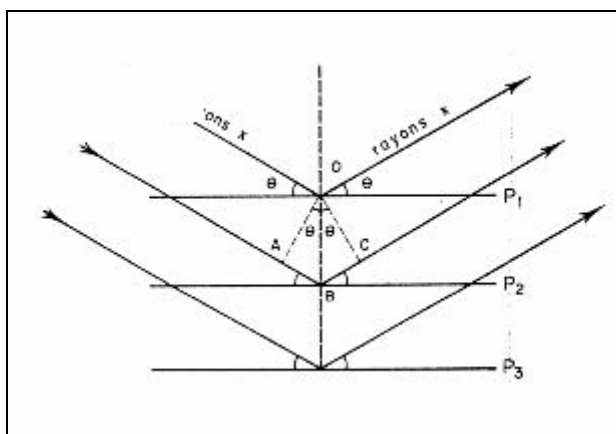


Figure (I-8): Schéma de diffraction de rayons X.

où P_1, P_2, P_3 , sont les plans d'une famille réticulaires.; q est l'angle de Bragg. La différence de marche entre deux plans consécutifs est ici égale à $AB+BC$. Or $AB+BC = 2 OB \sin q$. Comme OB est la distance interréticulaire d et que $AB+BC$ doit être égale à un nombre entier de longueur d'onde λ , en posant n = nombre entier, on retrouve la formule de Bragg :

$$n = 2d \sin q.$$

IV.5. Techniques spectrométriques

Presque toutes les méthodes optiques existantes ont été utilisées pour caractériser les phénomènes d'inclusion. Certaines comme la spectroscopie IR ne constituent pas une méthode de choix pour la détection des complexes d'inclusion. La spectrophotométrie

d'absorption ou de fluorescence (lorsque la molécule le permet) sont les plus fréquemment utilisés ^[52].

a) Analyse par FTIR

Les modifications des propriétés vibrationnelles des molécules après l'inclusion sont analysées également en utilisant la spectrométrie infra-rouge.

Cette technique est basée sur l'absorption par la matière d'un rayonnement électromagnétique. Le rayonnement IR peut générer des mouvements de rotation et de vibration des atomes ou de molécules.

Dans la région de l'infrarouge (entre 400 et 4000 cm^{-1}), deux types de vibration sont principalement observée :

☞ vibration d'élongation : un mouvement rythmique le long de l'axe de la liaison de sorte que la distance interatomique est croissante ou décroissante.

☞ vibration de déformation angulaire : consiste en une variation de l'angle formé entre deux liaisons successives, c'est-à-dire ayant un atome en commun, ou le mouvement d'un groupe d'atomes par rapport au reste de la molécule, mais sont mouvements des atomes du groupe les uns par rapport aux autres.

b) La spectroscopie d'absorption et d'émission (UV/vis)

Souvent, la formation du complexe produit des modifications dans le spectre d'absorption dans le domaine UV/visible. En effet, le passage d'une molécule de la phase aqueuse vers la cavité de la cyclodextrine modifie la polarité de son environnement. Ceci provoque une augmentation ou une atténuation de son intensité d'absorption ou d'émission ^[53].

Les caractéristiques d'absorptions des molécules organiques dans la région UV dépendent des transitions électroniques qui peuvent se produire et de l'effet de l'environnement atomique sur les transitions. Toutefois, chaque transition électronique est toujours accompagnée de transitions simultanées, vibrationnelles et rotationnelles, d'énergie plus faible. Conformément à la loi de Beer-Lambert, l'intensité d'une radiation électromagnétique en passant à travers un milieu absorbant présente une décroissance exponentielle, exprimée par :

$$A = D.O = \log_{10} (I_0/I) = -\log T = \epsilon c l$$

où le produit sans dimension $\epsilon c l$ est appelé « absorbance » de l'échantillon à une fréquence donnée (ou "densité optique" -D.O.) et T "la transmission" de la solution . ; c= la concentration du soluté ; l=la longueur du chemin optique à travers l'échantillon ; ϵ est le coefficient d'extinction molaire caractérise une propriété moléculaire fondamentale et ne dépend pas de la concentration c de la solution.

V. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La CLHP est fondée sur le principe de partage des solutés entre la phase stationnaire et la phase mobile, toutes les deux liquides. La phase stationnaire est constituée d'un support, qui est soit imprégné par un liquide, soit greffé de motifs organiques variés (très souvent des hydrocarbures en C8 ou C18). La phase mobile est un liquide pur ou un mélange de liquides dont les interactions avec la phase stationnaire doivent être la plus faible possible (liquide non miscible de polarité différente). Les méthodes chromatographiques peuvent mettre en œuvre : Une phase stationnaire polaire et une phase mobile apolaire : c'est la chromatographie d'adsorption où la phase stationnaire est polaire. Elle est actuellement peu utilisée.

Une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire, c'est la chromatographie de partage à polarité de phase inversée.

De nombreuses raisons ont justifié la polarité de ce système ; en effet, la chromatographie sur phase inversée présente :

- Utilise l'eau, principal avantage
- Une excellente résolution même pour des composés de structures chimiques extrêmement proches
- Une sélectivité facilement contrôlable par modification de la nature de l'éluant
- Une excellente reproductibilité des analyses sur des périodes de temps importantes

Les supports couramment utilisés en RP-CLHP sont des microparticules de silice poreuse, modifiée par un dérivé silane contenant des chaînons hydrophobes alkyle. Les ligands les plus couramment greffés sont le n-butyle, le n-octyle et le n-octadécyle. Malgré le greffage d'une importante densité de greffons sur le support, des groupes silanol résiduels restent accessibles. Par conséquent, deux paramètres jouent un rôle essentiel dans le processus d'interaction chromatographique (i) le caractère hydrophobe relatif des ligands immobilisées et leur flexibilité (ii) la présence des groupes silanol résiduels agissant comme des acides

faibles avec les résidus basiques des substances et conduisant à une diminution de la résolution. La nature des chaînons greffés est donc un des facteurs importants pouvant être varié afin de modifier la sélectivité de la colonne.

Les analyses par chromatographie de phase inversée mettent en jeu une phase mobile polaire constituée d'une solution aqueuse acide à laquelle est ajouté graduellement un solvant organique.

Les solvants organiques les plus couramment utilisés sont l'acétonitrile, le méthanol et le tétrahydrofurane. Chacun de ces éluants présente une transparence optique aux longueurs d'ondes d'absorption utilisées^[54].

VI. Extraction en phase solide

L'extraction en phase solide appelée aussi extraction solide-liquide est une méthode très utilisée lors du traitement des échantillons complexes tel que les milieux biologiques (sérum, urines...). Les espèces à séparer doivent être concentrés au préalable pour être détectables, surtout si la chromatographie en phase liquide (CPL) est utilisée comme méthode séparative. Cependant, dans les matrices complexes, on est confronté au problème de la co-extraction d'autres analytes présents dans la matrice de l'échantillon et risquant d'interférer avec la méthode de séparation et de détection utilisée^[55].

L'extraction en phase solide présente les avantages suivants :

- ✎ Traitement d'un grand nombre d'échantillons en un temps réduit.
- ✎ Reproductibilité.
- ✎ Grande capacité.
- ✎ Bonne sélectivité.
- ✎ Rendement élevé.
- ✎ Un protocole d'extraction simple à mettre en œuvre.

Une procédure de l'extraction sur phase solide comporte trois ou quatre étapes en général. La première est le *conditionnement* de l'adsorbant contenu dans la cartouche d'extraction.

Cette étape permet de mouiller le support en solvantant les groupements fonctionnels présents à sa surface. Ainsi un support hydrophobe est tout d'abord mouillé par un solvant

organique, puis par un solvant de polarité similaire à celle de solvant constituant l'échantillon, généralement l'eau (ou un mélange eau-solvant organique). Lors de la seconde étape, on procède à la *percolation* de l'échantillon sur le support. Les interférents n'ayant aucune affinité avec la phase solide ne sont pas retenus sur le support lors de cette étape. Par contre, les molécules cibles et éventuellement des composés présentent une forte affinité avec l'adsorbant sont fixés sur le support. Selon la nature de l'échantillon (eaux, extrait de sol, etc.) et des composés à analyser et selon le facteur d'enrichissement recherché, le volume d'échantillon percolé peut varier de quelques microlitres jusqu'au litre pour la recherche de micropolluant organique dans les eaux.

Une étape supplémentaire de *lavage* (étape 3) peut être effectuée de manière à éliminer les composés interférents faiblement retenus par le support. On choisira de ce fait un solvant de faible force éluante de façon à éluer les interférents tout en gardant fixés les composés d'intérêt.

Enfin on procède à l'*élution* des composés ciblés en faisant percoler un solvant spécifiquement choisi pour rompre les interactions mises en jeu entre les analytes d'intérêt et le support solide en évitant, dans la mesure du possible, d'éluer les composés interférents fortement retenus sur le support.

VII. Contrôle de la biodisponibilité in vitro

L'étude des cinétiques de dissolution des composés d'inclusion solides peut mettre en évidence une amélioration de la solubilité et une augmentation de la vitesse de passage en solution.

L'essai de dissolution se fait à l'aide d'un appareillage approprié appelé « dissolu test ». ce dernier est composé de six à huit récipients cylindriques à fond hémisphérique, d'une capacité nominale de 1000 ml, dans les quels est introduit le milieu de dissolution. Ces récipients sont placés dans un bain d'eau thermostatée à 37°C et chacun d'eux est muni d'un agitateur constitué par une tige verticale à la partie inférieure sur laquelle est fixée (palette ou panier).

La partie supérieure de la tige de l'agitateur est reliée à un moteur muni d'un régulateur de vitesse. Les prélèvements des échantillons peuvent être effectués en mode manuel à l'aide des seringues ou en mode automatique. Dans le cas de l'agitateur à panier, le milieu de dissolution est stationnaire, alors que la forme pharmaceutique est agitée à cause de la rotation

du panier dans lequel elle est emprisonnée. Par contre, avec l'agitateur à palette, c'est le milieu qui est agité, le comprimé ou la capsule, demeure pratiquement immobile ^[56].

Partie

Expérimentale

I- Méthodes de préparation des systèmes binaires ME/ β -CD (1:1) et (1:2)

Il y a plusieurs méthodes de préparation des complexes d'inclusion, celles utilisées dans notre travail sont décrites ci-dessous ^[57] :

Première méthode (PM) :

Elle consiste à mélanger physiquement 1 mole du méloxicam avec 1 ou 2 mole de la β -CD pris à l'état solide.

Deuxième méthode (KD) :

Cette méthode de préparation est dite pétrissage en phase solide (en anglais, 'kneading') consiste à ajouté un agent de diffusion afin de favoriser l'interaction du méloxicam avec la β -CD. Dans ce cas une petite quantité d'un mélange eau-méthanol (1:1) est ajouté préalablement au mélange physique. Cet agent permet d'humidifier le complexe ou former une pâte avec le complexe. La pâte obtenue est homogénéisée avec un agitateur en verre puis séchée à l'étuve à 45°C.

Troisième méthode(CS) :

Le procédé consiste à préparer le complexe du sel de la substance active par l'ajout d'un agent d'interaction qui permet à la fois d'augmenter le taux d'inclusion de la molécule invitée dans la cyclodextrine et d'améliorer la dissolution du complexe formé.

Dans notre cas, la préparation se fait en mélangeant le ME dissous dans l'ammoniaque à une solution aqueuse de la β -CD. L'équilibre est atteint par agitation intense et refroidissement lent pendant une heure. Pour obtenir le complexe en phase solide, après que l'équilibre est atteint, l'ammoniaque est enlevée par évaporation en utilisant l'étuve réglée à 45°C.

II- Méthode expérimentales de caractérisation des complexes

II-1 Méthode de solubilisation

L'étude de solubilisation du ME a été réalisée dans des solutions aqueuses de CD à des concentrations variables.

Des prises d'essai de 25ml de solutions à différentes concentrations en cyclodextrine (0,2-1.4M) sont versées dans des flacons de 50ml. Le ME est alors ajouté sous forme solide en quantité excédant largement sa limite de solubilité. Un « blanc » sans cyclodextrine est préparé de façon identique. Toutes les solutions sont agitées pendant 5 jours à différentes températures sous agitation magnétique dans un bain-marie. Les solutions sont ensuite filtrées à 25°C sur membrane Millex nylon 5µm, Millipore. 1.5 mL du filtrat sont ensuite transférés dans un tube contenant 150 µL de méthanol.

III-2 Méthode chromatographique

III-2-1 Appareillage et réactifs

a) Réactifs :

- Les solvants utilisés sont de grade CLHP.
- Les réactifs proviennent de la firme SIGMA.

b) Appareillage :

Le matériel chromatographique utilisé est constitué par :

- Une pompe Jasco PU-980 (intelligent hplc pump).
- Un dégazeur waters IN-LINE degasser.
- Un injecteur Rhéodyne 7725 muni d'une boucle de 20 µl.
- Un détecteur Waters 2487 (Dual absorbance detector) couplé à un ordinateur Digital PC muni d'un logiciel spécialisé de référence MILLENIUM³² ;

III-2-2 Conditions chromatographiques :

Les résultats d'un précédent travail réalisé dans notre laboratoire montrent que les conditions chromatographiques choisies sont :

Conditions chromatographiques	
<i>colonne</i>	Colonne HPLC type symmetry C ¹⁸ de dimension (150*4.6 mm) d'origine Waters
<i>Phase mobile</i>	Eau à 1% d'acide acétique / THF / acétonitrile : 60/30/10 plus 100µl d'acide heptansulfonique pour 100cc du solvant
<i>Longueur d'onde</i>	365 nm
<i>Débit</i>	1ml/nm
<i>Etalon interne</i>	Piroxicam
<i>Volume injecté</i>	20µl

Tableau (II-1) : conditions chromatographiques

III-2-3 Courbe d'étalonnage :

Nous avons réalisé deux courbes d'étalonnages avec et sans étalon interne.

III-2-3-1 Avec étalon

a)- Préparation des solutions

A partir des solutions mères en Meloxicam et de Piroxicam (1g/l et 2g/l), nous avons préparé des solutions étalons contenant une concentration constante en Piroxicam et des concentrations variables en Meloxicam couvrant un domaine de concentration allant de 0.01 à 10 mg/l.

Les solutions sont préparées comme suit :

- Peser 100mg de meloxicam et la dissoudre dans 100ml de méthanol ➡(SM)
- Peser 200mg de piroxicam et la dissoudre dans 100ml de méthanol ➡(SP)
- A partir de la solution mère de Meloxicam on prépare trois solutions filles SM1 (100mg/l), SM2 (10mg/l), SM3 (1mg/l).
 - Pour SM1 : on prend 10cc et on dilue par le méthanol jusqu'à 100cc.
 - Pour SM2 : on prend 10cc de SM1 et on dilue par le méthanol jusqu'à 100cc.

● Pour SM3 : on prend 10cc de SM2 et on dilue par le méthanol jusqu'à 100cc.

A partir de la solution mère de piroxicam (SP) on prépare une solution fille SP1 (200mg/l),

● Pour SP1 : on prend 10cc de SP et on complète par le méthanol jusqu'à 100cc.

Le protocole suivi lors de la préparation est décrit dans les tableaux suivants :

N° du tube	MeOH (μ l)	SM1(μ l)	SP(μ l)	[M](mg.l ⁻¹)	[P](mg.l ⁻¹)
1	850	100	50	10	10
2	870	80	50	8	10
3	890	60	50	6	10
4	900	50	50	5	10
5	910	40	50	4	10
6	920	30	50	3	10
7	930	20	50	2	10

Tableau (II-2) : préparation des échantillons pour SM1.

N° du tube	MeOH (μ l)	SM2 (μ l)	SP (μ l)	[M](mg.l ⁻¹)	[P](mg.l ⁻¹)
1	850	100	50	1	10
2	870	80	50	0.8	10
3	890	60	50	0.6	10
4	900	50	50	0.5	10
5	910	40	50	0.4	10
6	920	30	50	0.3	10
7	930	20	50	0.2	10

Tableau (II-3): préparation des échantillons pour SM2

N° du tube	MeOH (μ l)	SM3(μ l)	SP(μ l)	[M](mg.l ⁻¹)	[P](mg.l ⁻¹)
1	850	100	50	0.1	10
2	870	80	50	0.08	10
3	890	60	50	0.06	10
4	900	50	50	0.05	10
5	910	40	50	0.04	10
6	920	30	50	0.03	10
7	930	20	50	0.02	10
8	940	10	50	0.01	10

Tableau (III-4): préparation des échantillons pour SM3.

b)- Sans étalon interne :

La courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère du meloxicam à (100mg.L⁻¹) dans le méthanol de façon à convertir un domaine de concentration allant de 10 à 100 mg.L⁻¹.

III.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN- ¹H, ¹³C)

L'ensemble des spectres a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre modèle Brüker (400 MHZ).

Les déplacements chimiques sont donnés par apport à une référence externe, le tetraméthylsilane(TMS) et le solvant employé et le DMSO-d₆.

III.3. L'analyse thermique différentielle (DSC)

Les mesures d'analyse thermiques différentielle ont été réalisées sur un appareil de type TA Instrument 2886. Les conditions opératoires utilisées sont les suivantes :

- Vitesse de chauffage : 5°C/min.
- Masse des échantillons prélevés: 2-10 mg.
- Echelle de température : 50-250°C.

III.4. Analyse par la diffraction des rayons X

L'appareil utilisé est un modèle Siemens. Les diagrammes de diffraction ont été enregistrés pour des valeurs de 2θ allant de 5 jusqu'à 35°.

III.5. Spectrométrie infrarouge

L'étude par FTIR est réalisée sur un appareil de marque *Nicolet 560* muni d'un système optique constitué d'une source, d'un interféromètre, d'un compartiment à échantillon, d'un détecteur et d'un amplificateur, ce système est équipé d'une station de données. L'étude est effectuée avec une résolution de 2 cm^{-1} et un nombre de balayage à 64.

Les échantillons étudiés ont été préparés à l'état solide sous forme de pastilles dans du KBr (3 mg de composé pour 147mg de KBr).

III.6. Spectrométrie UV-visible

Les spectres d'absorption ont été enregistrés en solution dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible du type modèle UV-EV1 134914 code L12E07 dans des cuves en quartz de trajet optique 1cm. La concentration des solutions est de 10^{-2} M

IV. Etude de la pharmacocinétique du système ME/ β -CD

VI.1 Evolution de la dissolution in vitro

a)Appareillage

Il est composé d'un bain thermostaté à 37°C Dissolutest *Erweka* dans lequel baignent six réacteurs. Ces récipients sont remplis d'un milieu de dissolution approprié et sont maintenus sous agitation, par un système de palettes dans lequel le ME en comprimé ou complexé est ajouté. La vitesse et la durée d'agitation sont normalisées par la monographie de l'USP.

b) Conditions opératoires

Les essais de dissolution de cette étude suivent les indications des monographies de l'USP, référence dans ce domaine.

Appareil	<i>Dissolution ERWEKA</i>
Système	<i>palette</i>
Milieu de dissolution	<i>Tampon phosphate pH 7.4</i>
Volume du milieu	<i>900 ml</i>
Vitesse d'agitation	<i>50 tours/min</i>
Temps de dissolution	<i>40 mn</i>

Tableau (II-5): protocole de test de dissolution

IV.2 Evolution de la dissolution in vivo

IV.2.1 Conditions opératoires

0.2 mg/ml du complexe ME/CD en suspension ont été administrés par voie orale (par gavage gastrique) à un lot de 10 rats femelles de race *wistar* dont le poids moyen est de 200g. Les prélèvements veineux par ponction du sinus rétro-orbitaire après une légère anesthésie ont été effectués dans un intervalle du temps correspondant à: 2h, 3h30, 4h, 5h, 6h, 24h et 48h. Après centrifugation des prélèvements sanguins, le sérum est récupéré. Il subit une congélation à -12°C. Il est décongelé avant extraction et analyse.

IV.2.2. Courbes d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage pour le dosage du Meloxicam dans le plasma sert de référence. Pour ce faire, plusieurs sérums blancs sont chargés de Meloxicam de façon à couvrir le domaine de concentration allant de (0.08 à 2 mg.l⁻¹), après addition d'une concentration constante en Piroxicam égale à 10mg /l (tableau II-6 et II-7).

VI.2.3. Protocole d'extraction

L'extraction du méloxicam, et de son étalon interne le Piroxicam à partir du sérum a été effectuée en utilisant des cartouches Oasis[®] HLB (3mg, 1cc) (Hydrophile-Lipophile Balance) provenant de la firme Waters.

Le protocole d'extraction du Meloxicam et de son étalon interne (piroxicam) est résumé dans le tableau (Tableau II-8).

N° du tube	Sérum humain (μ l)	SM2(μ l)	SP(μ l)	[M](mg.l ⁻¹)	[P](mg.l ⁻¹)
1	750	200	50	2	10
2	770	180	50	1.8	10
3	790	160	50	1.6	10
4	810	140	50	1.4	10
5	830	120	50	1.2	10
6	850	100	50	1	10
7	870	80	50	0.8	10
8	890	60	50	0.6	10
9	910	40	50	0.4	10
10	930	20	50	0.2	10

Tableau (II-6) : préparation d'échantillons par rapport à SM2.

N° du tube	Sérum humain (μ l)	SM3(μ l)	SP(μ l)	[M](mg.l ⁻¹)	[P](mg.l ⁻¹)
1	870	80	50	0.08	10

Tableau(II-7): préparation d'échantillon par rapport à SM3.

Conditionnement.	1ml de CH ₃ OH puis 1ml d'eau.
Charger.	1ml de sérum + 0.02 ml d'H ₃ PO ₄ .
Lavage	2ml de H ₂ O.
Evaporation à sec	
Reconstitution	0.5 ml de CH ₃ CN + 0.5ml de CH ₃ OH.
Injection	20μL.

Tableau (II-8) : Protocole d'extraction du méloxicam

Résultats

&

Discussion

III. Résultats et discussion

III.1 Caractérisation

III-1-1 Etude de la solubilité dans l'eau du méloxicam complexé par la cyclodextrine

Le pouvoir complexant de la β -CD a été évalué par la détermination des constantes de complexation à différentes valeurs de température.

Nous avons choisi de présenter les résultats en terme de solubilité relative (S_r) (solubilité apparente /solubilité aqueuse) qui traduit directement le « gain » de solubilité induit par la complexation du ME.

L'évolution de la solubilité du méloxicam en fonction de la concentration en β -cyclodextrine à trois valeurs de températures 25°C, 37°C et 45°C représentée dans la figure(III-1), montre clairement que la solubilité du méloxicam augmente linéairement avec la température et la concentration en B-CD en présentant un diagramme A_L qui indique la formation de complexes de stoechiométrie 1 :1.

Les valeurs des constantes de complexation, solubilités aqueuses et les coefficients de corrélation ainsi que les paramètres thermodynamique sont représentées dans le tableau (III-1).

D'après ces résultats, nous constatons que la solubilité du ME ainsi que la constante de stabilité de son complexe avec la B-CD sont affectées par la température.

Les constantes de stabilités $K_{1:1}$ calculées par la méthode d'Higuchi et Connors (134, 150, 171 M^{-1} à 25, 37, 45°C) augmentent avec la température ceci est probablement liée au changement de solvation du complexe^[58]. En effet, à haut température les molécules d'eau d'hydratation qui se trouvent à l'intérieure de la cavité de la B-CD peuvent se libérées permettant ainsi d'augmenter la capacité d'accueillir en son sein des molécules du méloxicam^[59] Ces molécules d'eau expulsées acquièrent un degré de liberté plus élevée (interactions polaires/polaires) qu'à l'intérieur de la cavité(interactions polaires/apolaires) et, de ce fait un gain d'entropie ($\Delta S > 0$).

A fin de déterminer les variations d'enthalpie et d'entropie de complexation, nous avons réalisé une étude thermodynamique (courbe de Van't Hoff) (Figure III-2).

Les valeurs positives de l'enthalpie et de l'entropie suggèrent que les interactions hydrophobes sont prédominantes ^[60] alors que les valeurs négatives de l'énergie de Gibbs indiquent une réaction spontanée de complexation.

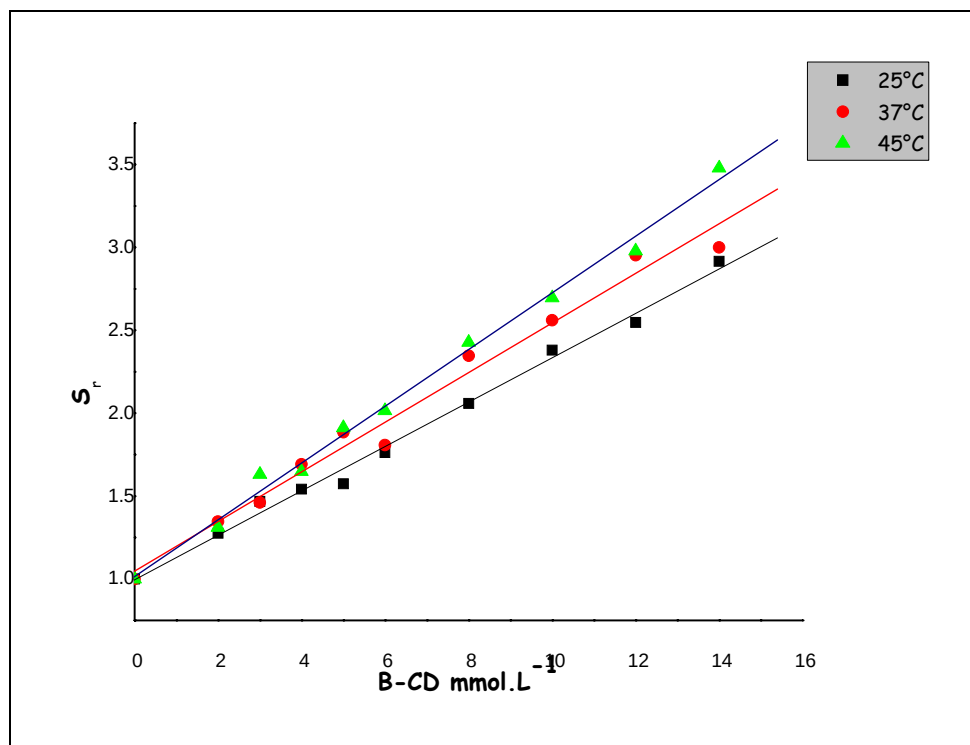


Figure (III-1) : Diagramme de solubilité du ME à T=25°C, 37°C, 45°C

T (°C)	K _{1:1(ME/CD)} (M ⁻¹)	Sw (*10 ⁻³ M)	R ²	ΔG(KJ/mol)	ΔH(KJ/mol)	ΔS(J/mol/k°)
25	134	0.0342	0.9966	-12.1435	9.3897	72.180
37	150	0.0370	0.9909	-12.9234	-	-
45	171	0.0393	0.9969	-13.3897	-	-

Tableau (III-1) : Constantes d'équilibre de complexation , solubilités aqueuses , coefficients de corrélation et paramètres thermodynamique du ME en présence de la B-CD à T=25°C ,37°C et 40°C.

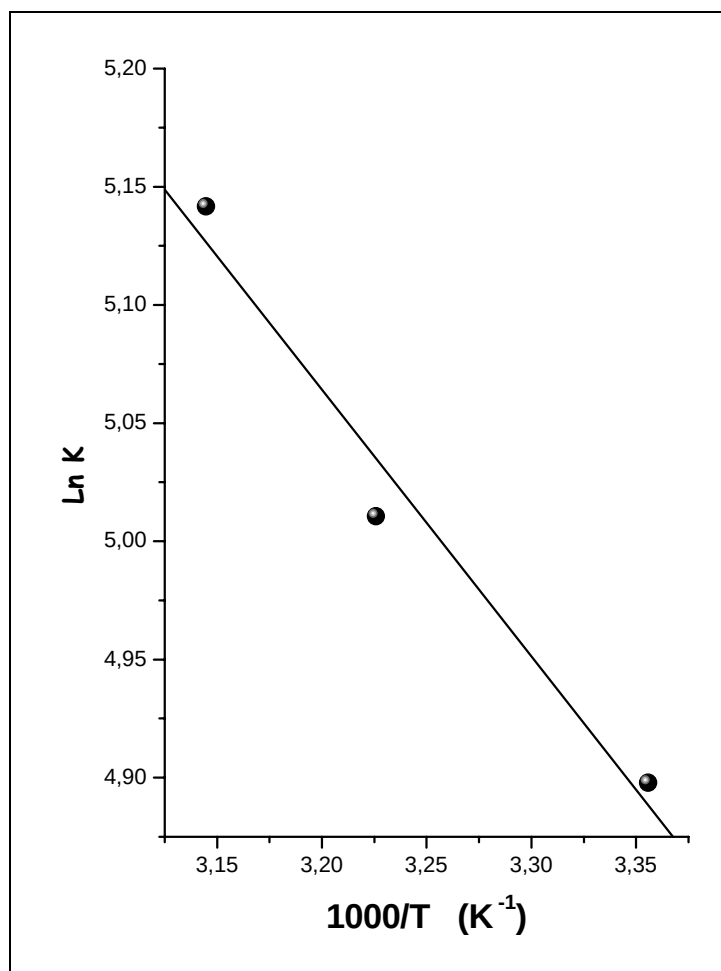


Figure (III-2) : variation du logarithme de la constante d'équilibre en fonction de l'inverse de la température (Van't Hoff) du ME en présence de la B-CD.

III-1-2 Analyse par spectroscopie UV

Nous avons réalisé les spectres UV d'absorption du meloxicam pur et en présence de la B-CD (figure III-3).

D'après ces spectres, on remarque bien que l'intensité des bandes d'absorption UV du ME est augmentée en présence de la β -CD et légèrement déplacée dans le cas du complexe 1 :2.

Ce déplacement est dû probablement au changement d'environnement qui peut être expliqué par le passage des molécules du méloxicam de la phase aqueuse vers la cavité de la cyclodextrine.

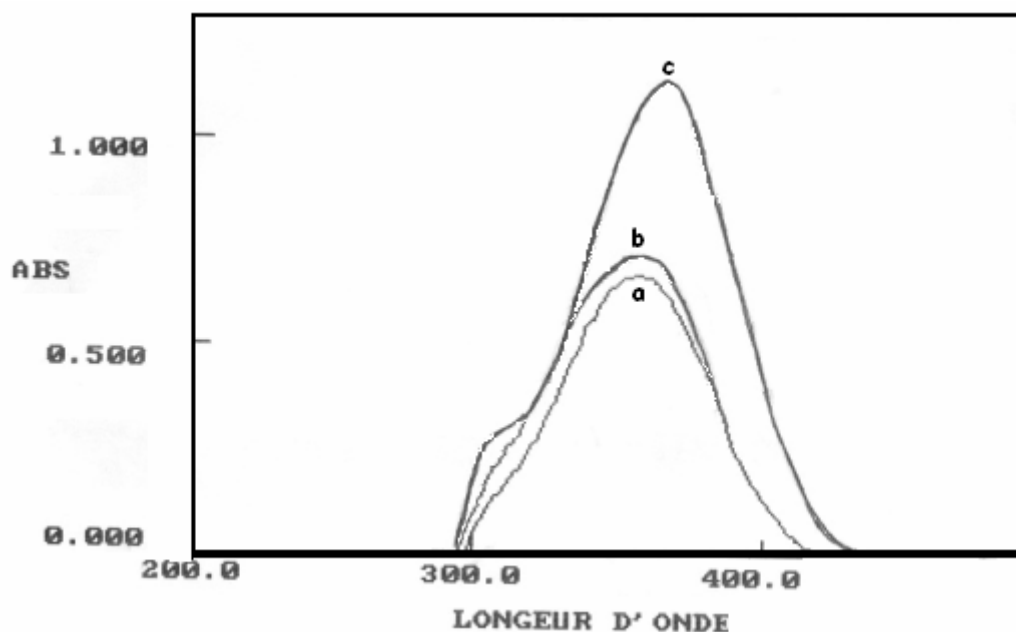


Figure (III-3) : spectres UV : a) ME pur ; b) ME-CD(1 :1) ; c) ME-CD(1 :2)

III.1.3 Analyse par spectroscopie infrarouge

Pour mieux comprendre les modifications qui ont lieu lors de la formation du complexe, des spectres infrarouge des espèces purs (ME, β -CD) et complexée (ME- β -CD (1 :2) et ME- β -CD (1 :1)) ont été enregistrés à partir des échantillons solides (poudre) sous forme de pastille de KBr à 3%.

Les spectres IR sont donnés sur la figure (III-4) et l'attribution de quelques vibrations du ME seul et complexé ainsi que ceux de la β -CD se trouvent dans les tableaux (III-2) et (III-3).

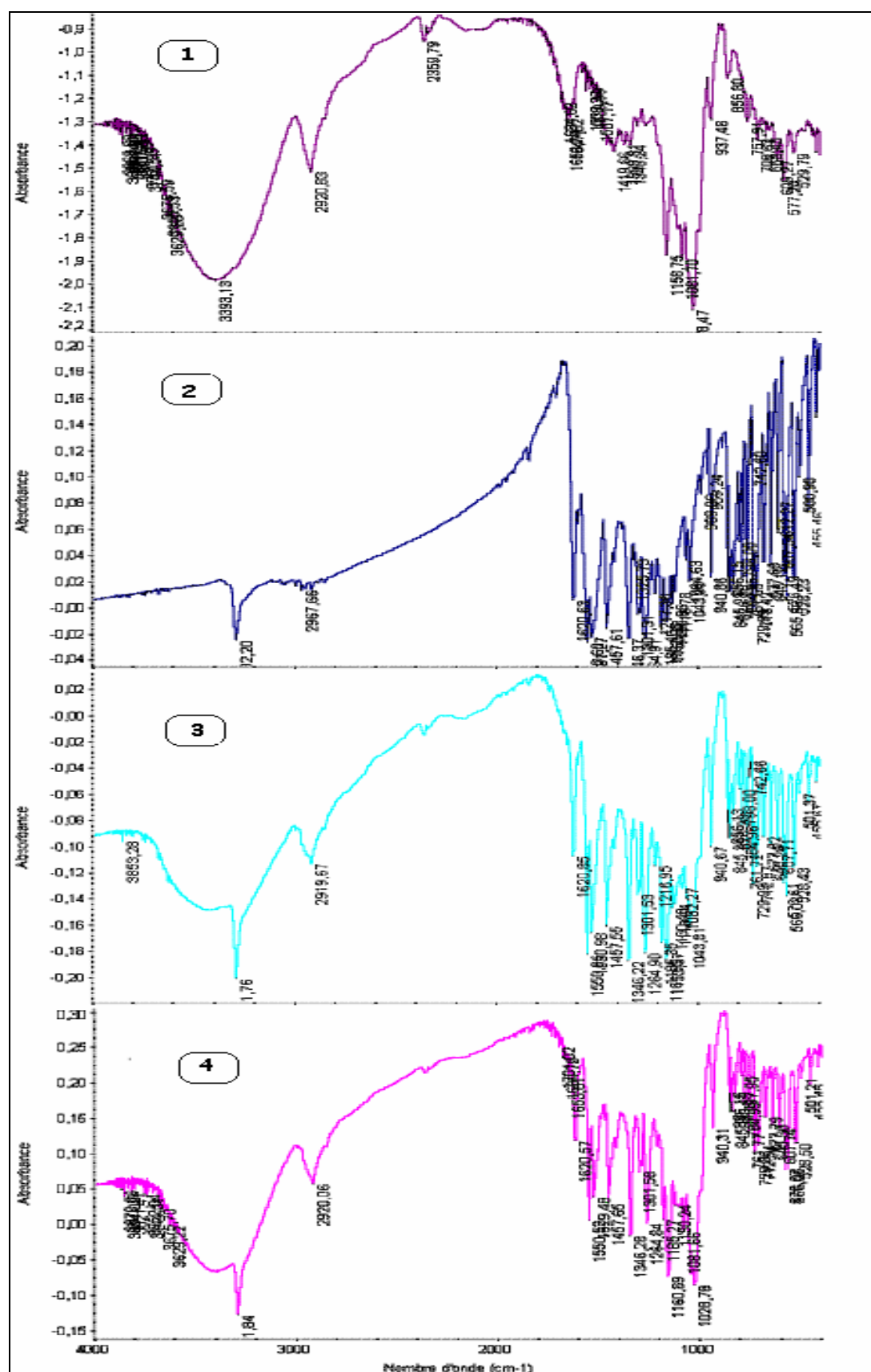


Figure (III-3) : Spectres FTIR 1)-CD ; 2)-Me ; 3)-ME-CD (1 :1)CS ; 4)-ME-CD (1 :2)CS.

Le spectre infrarouge du méloxicam pur présente plusieurs bandes à 3292 cm^{-1} correspondant à la vibration ν (-CONH) (la bande II des amides), 1620 cm^{-1} est associée à l'élongation ν (CO la bande I des amides), 1550 cm^{-1} et 1531 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations de déformation de la liaison (N-H).

Le spectre IR de la β -CD présente un signal large à 3393 cm^{-1} correspondant à des groupements OH participant à des liaisons hydrogène, à 2920 est associée à l'élongation des groupements -CH et les bandes à $1158, 1081, 1028$ sont attribuées aux vibrations (C-O, C-H).

Le spectre IR du couple ME- β -CD présente les bandes caractéristique suivantes : 3397 cm^{-1} (-OH), 3291 cm^{-1} (-CONH bande II), 1620 (-CONH bande I) et des bandes à $1550, 1530, 1346, 1301, 1082, 1161$ correspondent à un mélange du meloxicam et de la CD. Néanmoins ce complexe affiche une valeur nettement inférieure (-OH) 3397 cm^{-1} comparée à celle de la β -CD seule (3393 cm^{-1}) et une diminution de l'intensité du pic de vibration d'élongation caractéristique du meloxicam 3291 cm^{-1} (-NH de l'amide), cet abaissement peut s'expliquer par l'interaction du méloxicam avec la β -CD et probablement la formation d'une faible liaison hydrogène.

Attribution	ME pur (cm^{-1})	ME complexé	Δ (cm^{-1})
ν (-NH) élongation	3292.20	3291.84	0.36
ν (-C=O) élongation	1620.63	1620.57	0.06
ν (-CH) élongation (aliphatique)	2967.66		
ν (S=O)	1346.37	1346.22	0.15

Tableau (III-2) : Attribution des pics IR du ME

Attribution	β -CD (cm^{-1})	β -CD complexé	Δ (cm^{-1})
ν (-OH) élongation (large)	3393.13	3397.26	4.13
ν (-CH) élongation	2920.83	2920.06	0.77

Tableau (III-3) : Attribution des pics IR de la β -CD

III-1-3 Analyse par DSC

L'analyse du complexe d'inclusion a également été réalisée par calorimétrie différentielle (DSC).

Nous avons réalisé les DSC des mélanges (1 :1) et (1 :2) selon les deux méthodes (CS et KD).

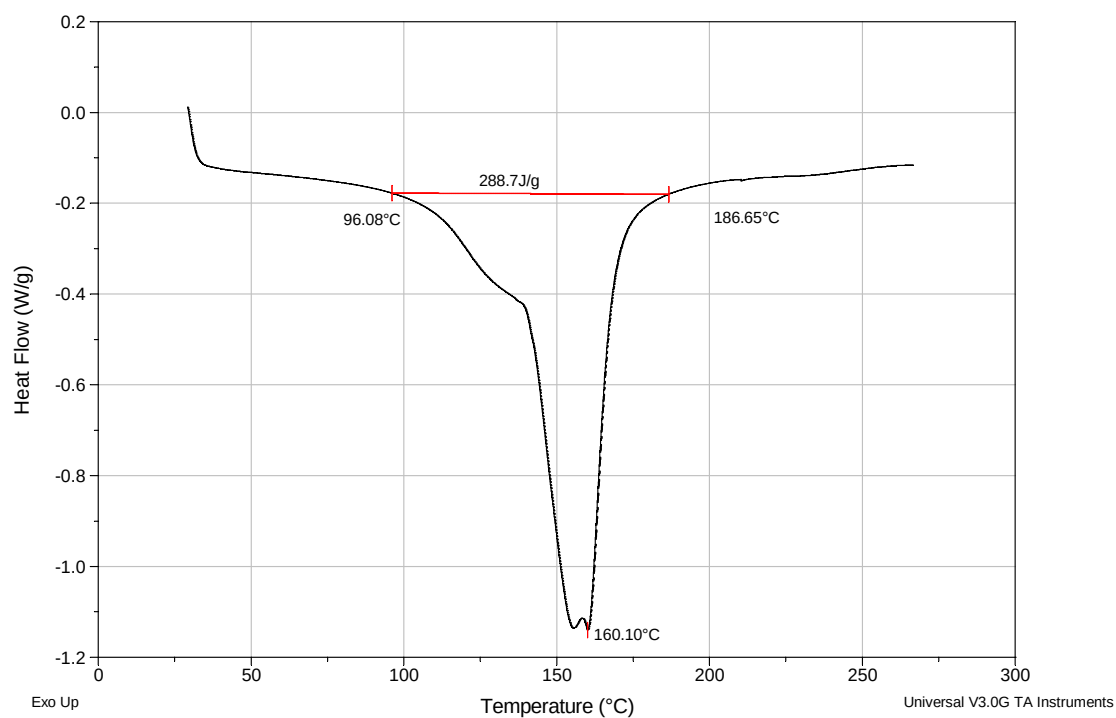
Les thermogrammes correspondants ainsi que ceux des produits purs sont donnés sur les figures (III-3, III-4, III-5, III-6, III-7, III-8). Nous constatons que :

Le ME présente un pic endothermique à (261.83°C) qui correspond à son point de fusion avec une intensité très élevée indiquant un état cristallin net

Le thermogramme de la β -CD montre un large pic endotherme centré sur (160.10°C) correspondant au phénomène de déshydratation

Le pic du ME attendu pour la fusion (261.83°C) est toujours présent dans les couples ME-CD mais il semble être de faible intensité et légèrement déplacé à basse température (256.74°C) pour le mélange ME-CD (1 :2) KD et de (250,360C) pour le couple ME-CD (1 :2) CS.

Ce déplacement ainsi que la diminution d'intensité surtout dans le cas du mélange ME-CD(1 :2)CS (la quasi disparition du pic du ME) peuvent être expliqués par le simple fait qu'il y ait déformation ou changement de l'état cristallin du ME. Ce qui est l'une de la caractérisation de l'inclusion du ME dans la β - CD.



Figure(III-3) : thermogramme de la β -CD .

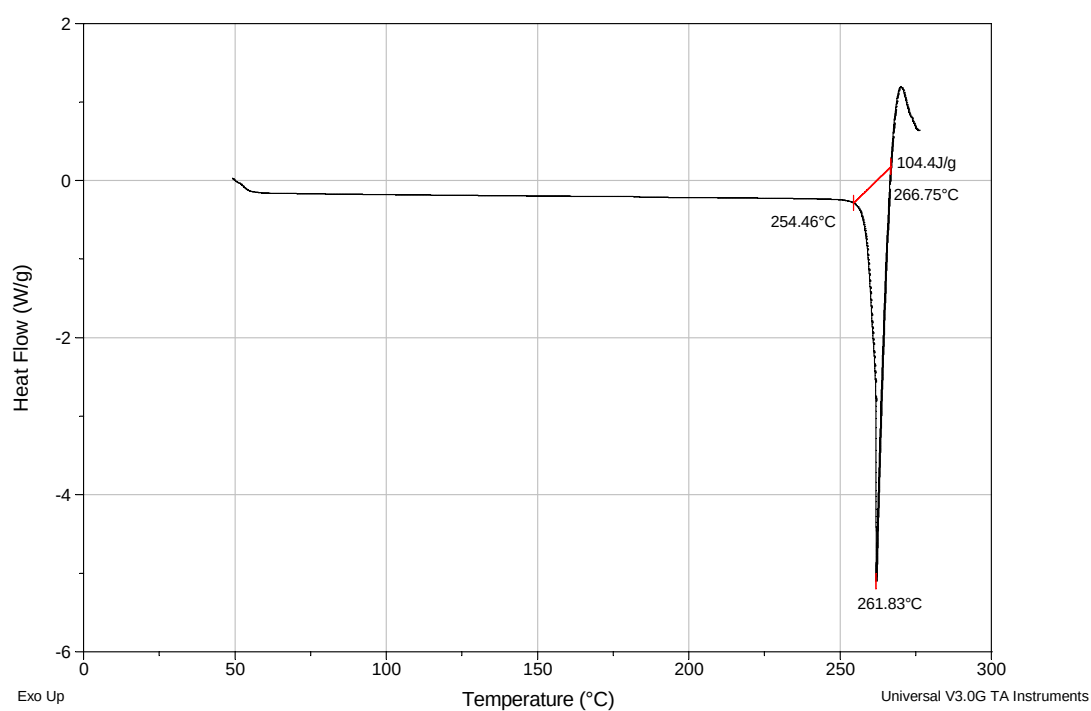
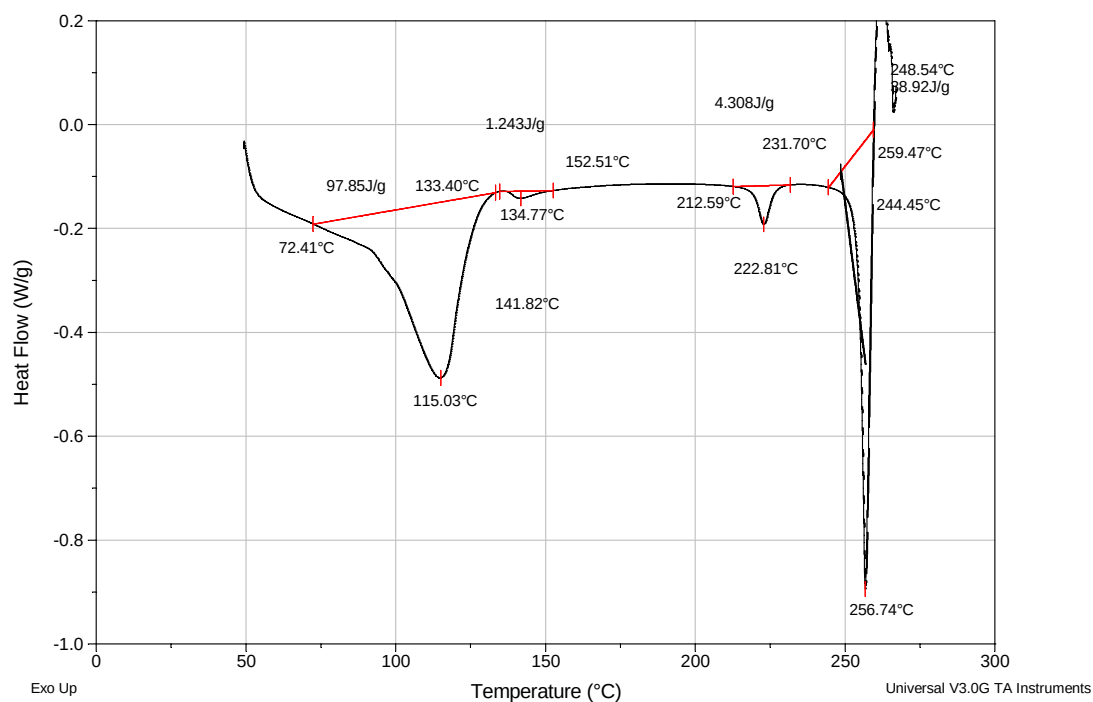
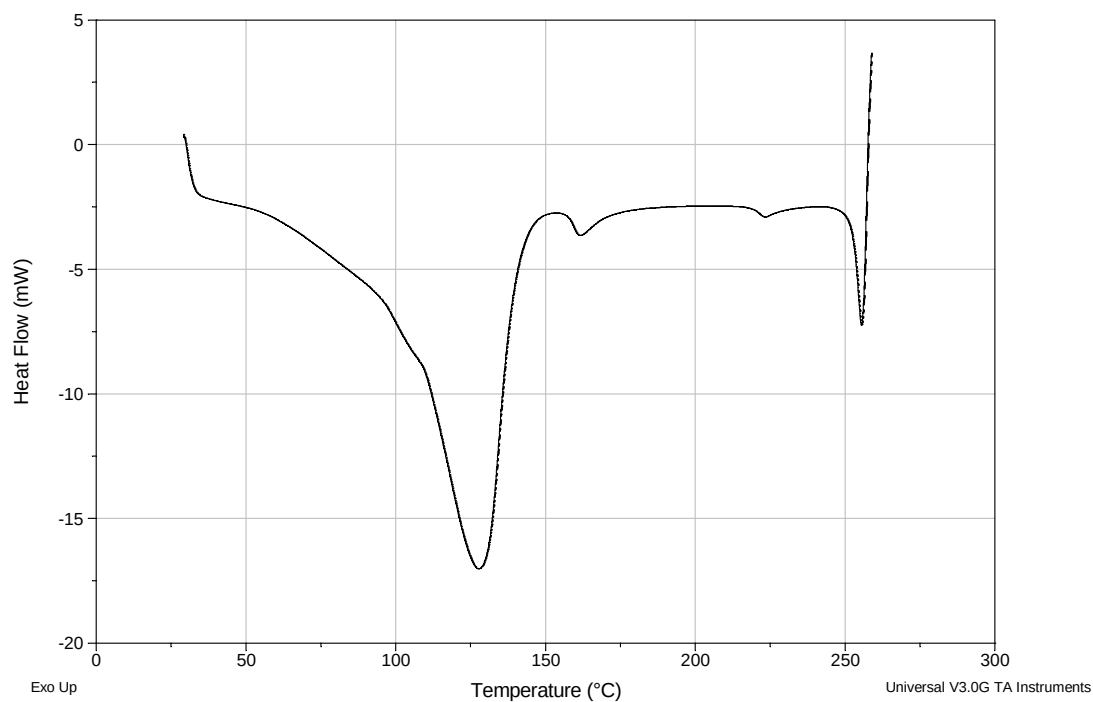


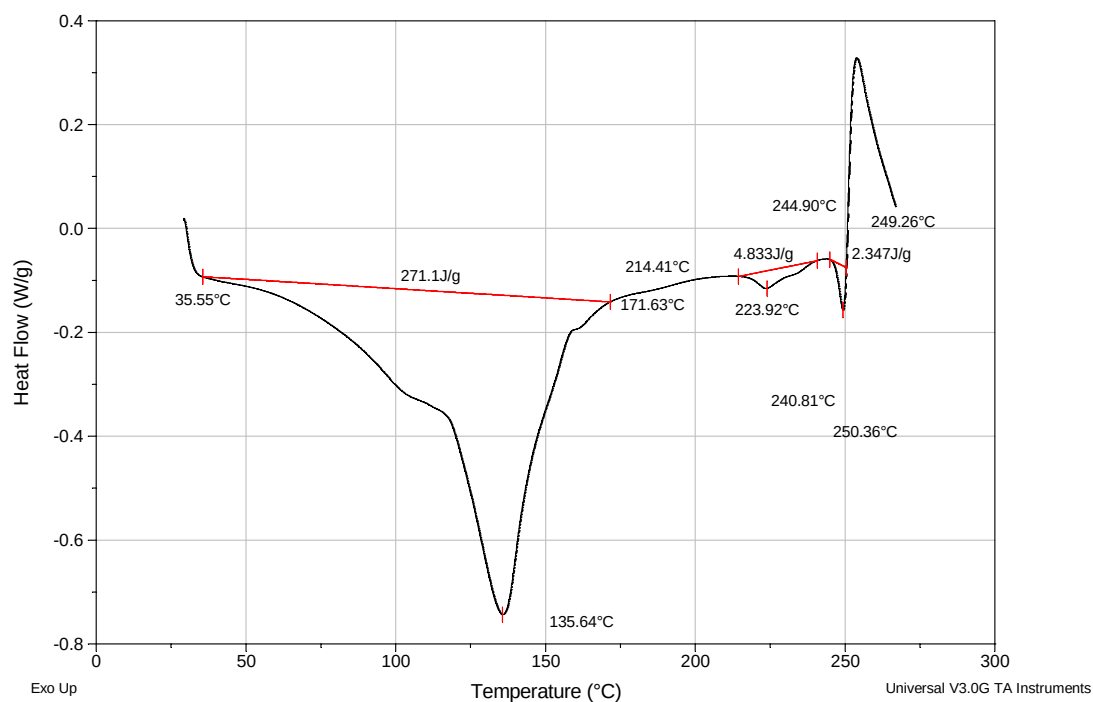
Figure (III-4): thermogramme du ME pur.



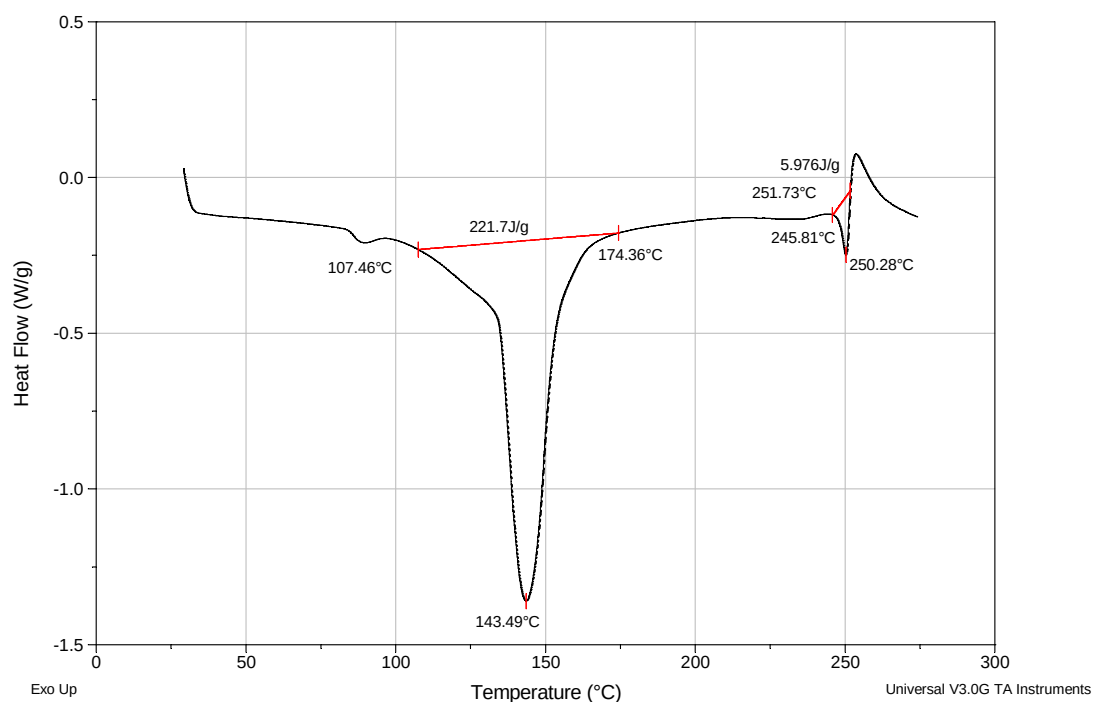
Figure(III-5) : thermogramme du ME/CD(1 :2)KD.



Figure(III-6) : thermogramme du ME/CD(1 :1)KD.



Figure(III-7) : thermogramme du ME/CD(1 :1)CS.



Figure(III-8) : thermogramme du ME/CD(1 :2)CS.

	T fusion (�C)	ΔH (J/g)
ME pur	261.83	104,4
ME-CD (1 :2) KD	256.74	37.05
ME-CD(1 :1) CS	250.36	2.347
ME-CD(1 :2) CS	250.28	5.976

Tableau(III-4) :Résultats de l'analyse calorimétrique différentielle.

III-1-4 Analyse par DRX

La cristallinité du complexe ME/ β -CD solide a été déterminée par diffraction des rayons X.

On donne ci-dessous les spectres obtenus (figure III-9).

Nous constatons que :

Le diagramme du ME présente un état cristallin net vu la multitude des pics existant sous les différentes intensités.

Le diagramme de la β -CD montre une faible cristallinité (Annexe I).

Les diagrammes du mélange physique (PM) et celui préparé par la méthode (KD) sont approximativement superposables à celui du ME avec une réduction de l'intensité des pics.

Cette réduction est probablement dû aux interactions qui se produit entre le méloxicam et la β -CD.

Pour le mélange ME-CD(1 :2) CS une diminution importante de la cristallinité par rapport au produit de départ a été remarqué puisque seulement quelque pics sont observables. Ce caractère amorphe est probablement attribuable à la formation d'un complexe d'inclusion entre le ME et la β -CD. Ces résultats vient de confirmer ceux obtenus par DSC.

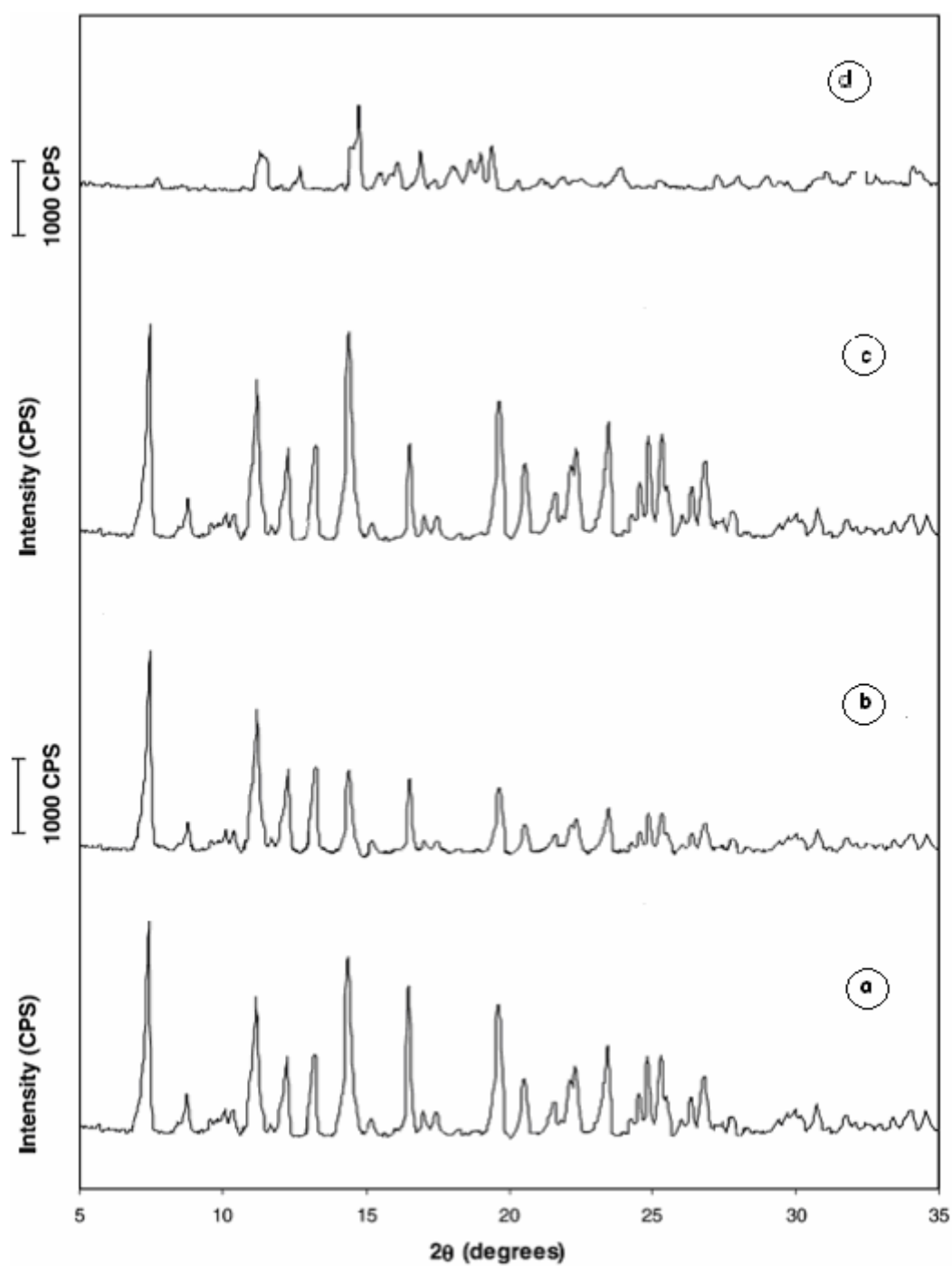


Figure (III-9) : Spectres RDX :a) M-CD(1 :2) PM ; b) M-CD(1 :2)KD ; c)M ; d)M-CD(1 :2)CS.

III-1-5 Etude par RMN ^1H et ^{13}C du complexe ME/CD

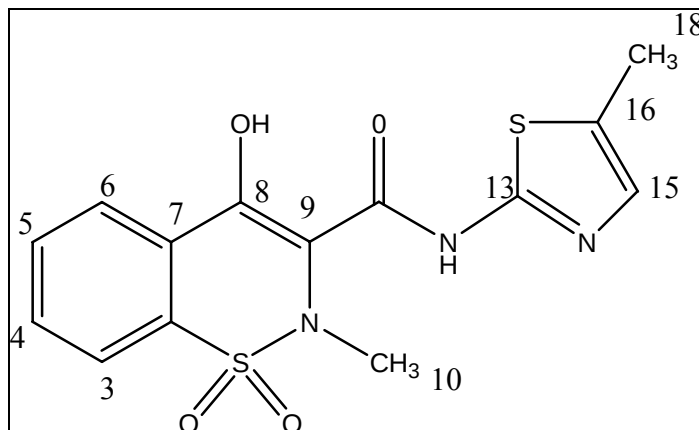
Cette étude permet de mettre en évidence le phénomène d'inclusion entre le méloxica et la β -CD. En comparant les spectres RMN ^1H et ^{13}C du méloxica seul dans le DMSO (figure III-10), et en présence de la β -CD (figure III-11) dans des proportions équimolaires, on observe des variations de déplacement chimique des protons H-2 ($\Delta\delta=0.009$) et H-1 ($\Delta\delta=0.0085$), de la β -CD. De la même manière, l'enregistrement des spectres RMN ^1H et ^{13}C de la β -CD seul dans le DMSO (figure III-12), et en présence du méloxica, montre les variations de déplacement chimique que subissent les protons aromatiques de la molécule invitée.

On observe une variation de déplacement chimique importante du proton H-4 ($\Delta\delta=-0.285\text{ppm}$), H-15 ($\Delta\delta=-0.2646$) et H-3 ($\Delta\delta=-0.202$) vers les champs forts lorsque le méloxica se trouve en présence de la β -CD (figure 11).

Ce phénomène est dû à la formation du complexe d'inclusion entre le méloxica et la β -CD.

N° de pic	Déplacement (ppm) β -CD		Déplacement (ppm) β -CD+ME		Multiplicité	$\Delta\delta(^1\text{H})$ (ppm)	$\Delta\delta(^{13}\text{C})$ (ppm)
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C			
1	4.822	101.979	4.8305	102.401	1H,d	0.0085	0.422
2	3.299	81.581	3.308	82.604	1H,dd	0.009	1.023
3	3.574	73.090	3.577	73.518	1H,t	0.003	0.428
4	3.343	72.446	3.350	72.866	1H,dd	0.007	0.42
5	3.542	72.078	3.549	72.501	1H,dt	0.007	0.423
6	3.625	59.968	3.634	60.395	1H,d	0.009	0.427

Tableau (III-5) : Attribution des signaux RMN ^1H et ^{13}C de la β -CD.



N° de pic	Déplacement (ppm) ME		Déplacement (ppm) ME + β -CD		Multiplicité	$\Delta\delta(^1\text{H})$ (ppm)	$\Delta\delta(^{13}\text{C})$ (ppm)
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C			
2	-	134.8721	-	135.7139	-	-	0.8418
3	7.862	123.7193	7.66	123.1054	1H,td	-0.202	-0.6139
4	7.822	129.7574	7.537	130.9237	1H,td	-0.285	1.1663
5	7.884	132.5626	7.734	132.6223	1H,dd	-0.15	0.0597
6	8.005	126.5611	8.012	127.2887	1H,dd	0.007	0.7276
7	-	156.2269	-	159.3991	-	-	3.1722
8	-	168.9129	-	164.7098	-	-	-4.2031
9	-	114.7350	-	109.4262	-	-	-5.3088
10	2.867	38.4425	2.759	39.2056	3H,s	-	-0.108
13	-	165.2804	-	164.4893	-	-	-0.7911
15	7.307	133.3760	7.0424	135.0447	1H,q	-0.2646	1.6687
16	-	124.7193	-	124.3283	-		-0.391
18	2.322	12.2798	2.3003	11.8245	3H,d	-0.0217	-0.4548

Tableau (III-6): Attribution des signaux RMN ^1H et ^{13}C du Méloxicam

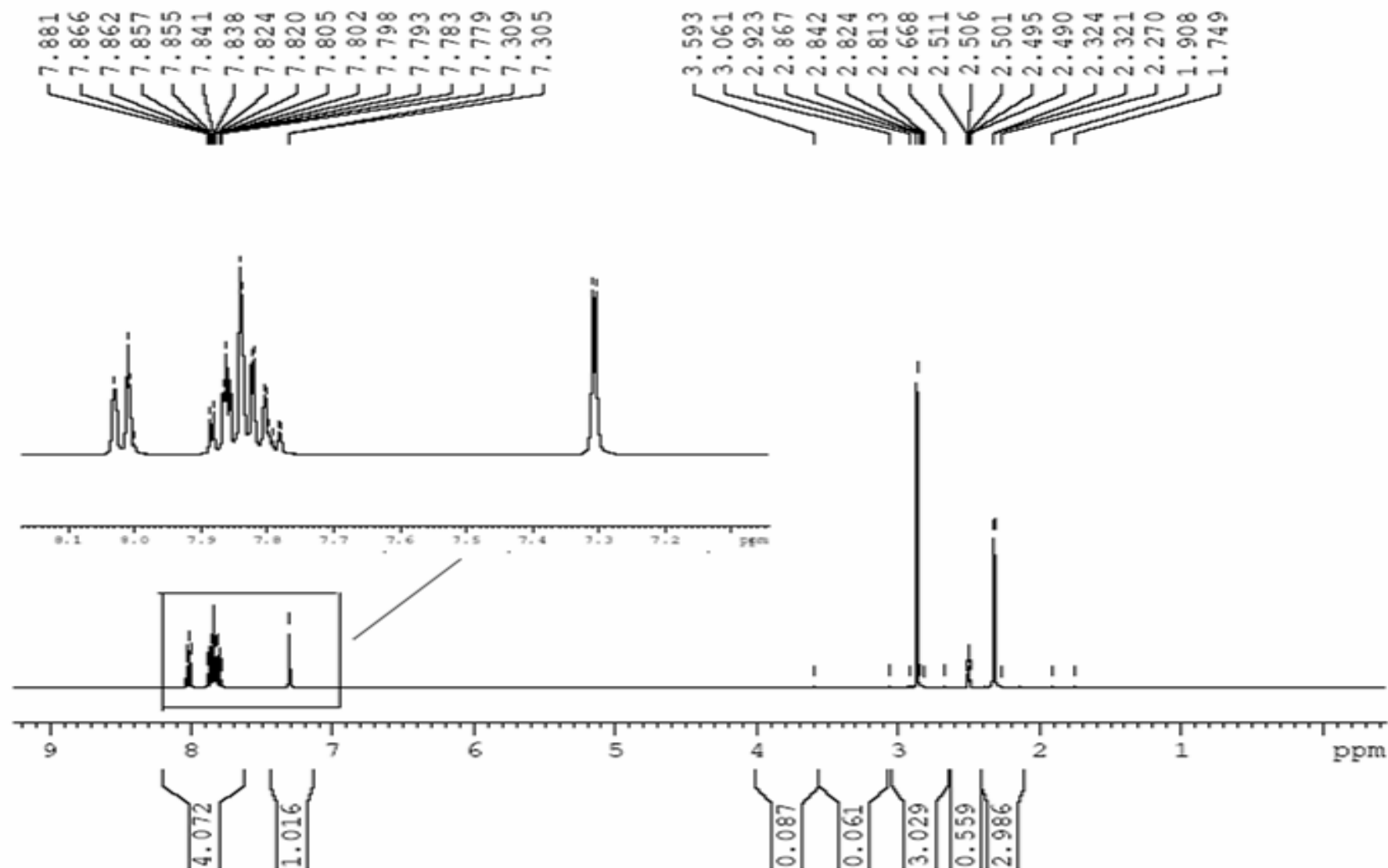
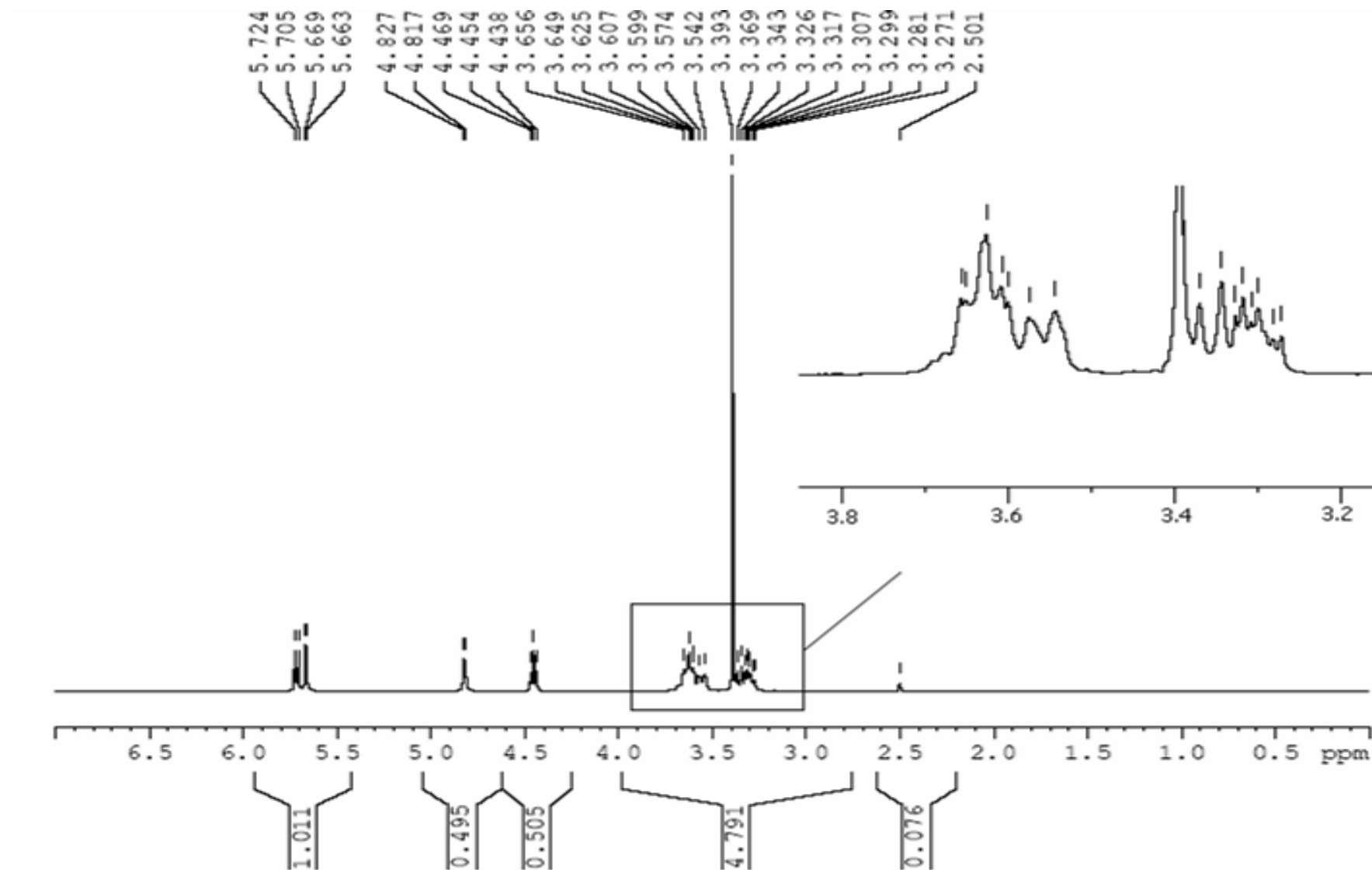


Figure (III-10) : spectre RMN ^1H du meloxicam


 Figure (III-12) spectre RMN ^1H de la β -CD

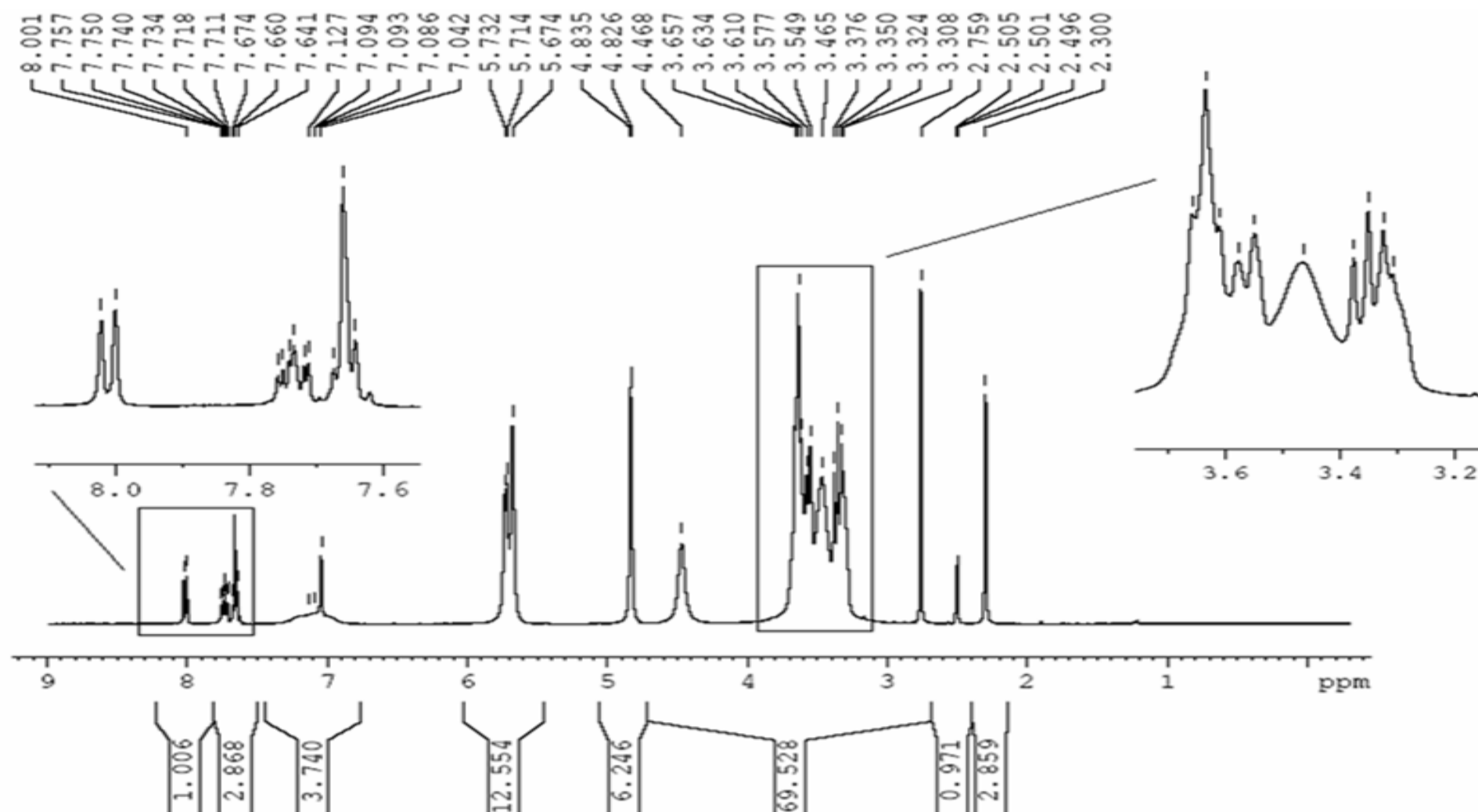


Figure (III-11): spectre RMN¹H du M-CD(1:1)CS

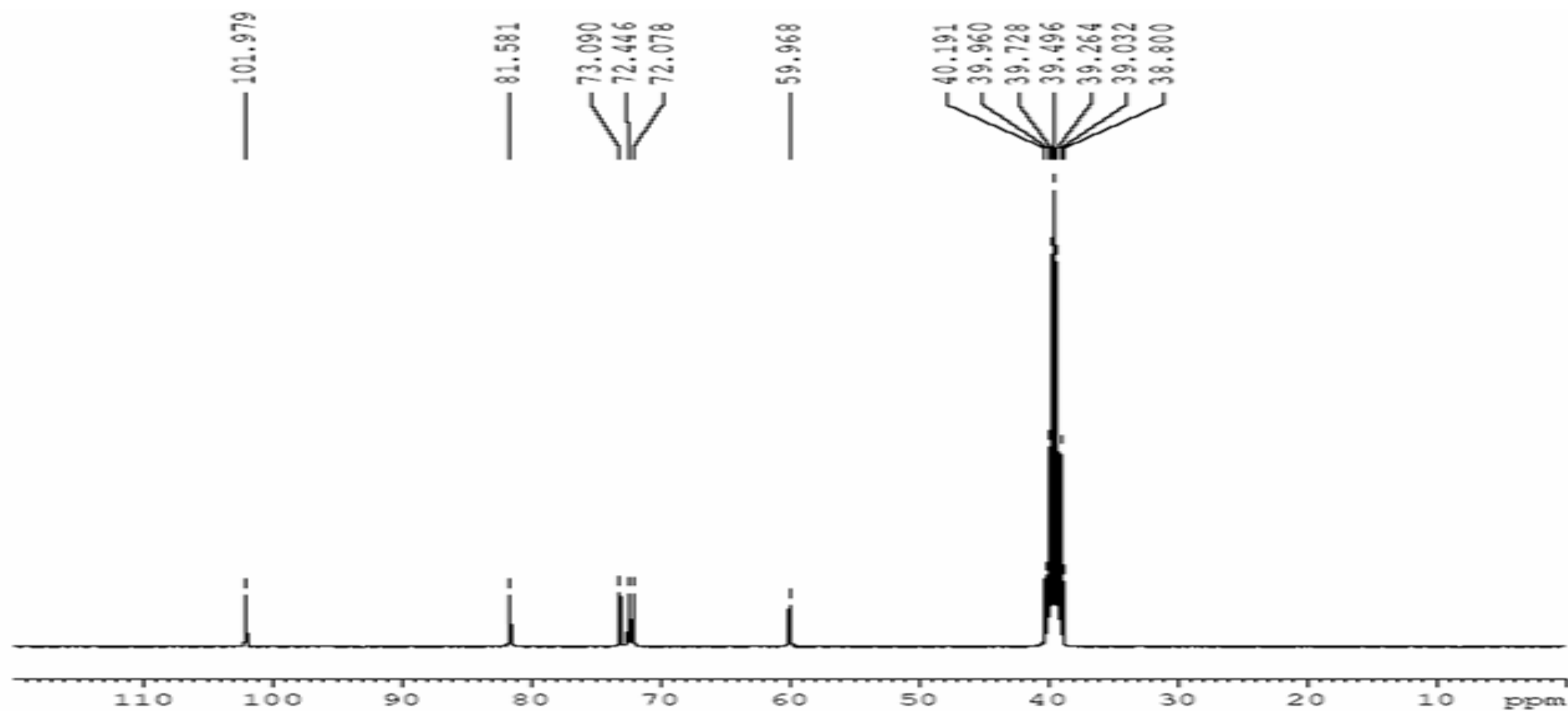


Figure (III-13): spectre RMN ^{13}C de la β -CD

Figure (III-13): spectre RMN ^{13}C de la β -CD

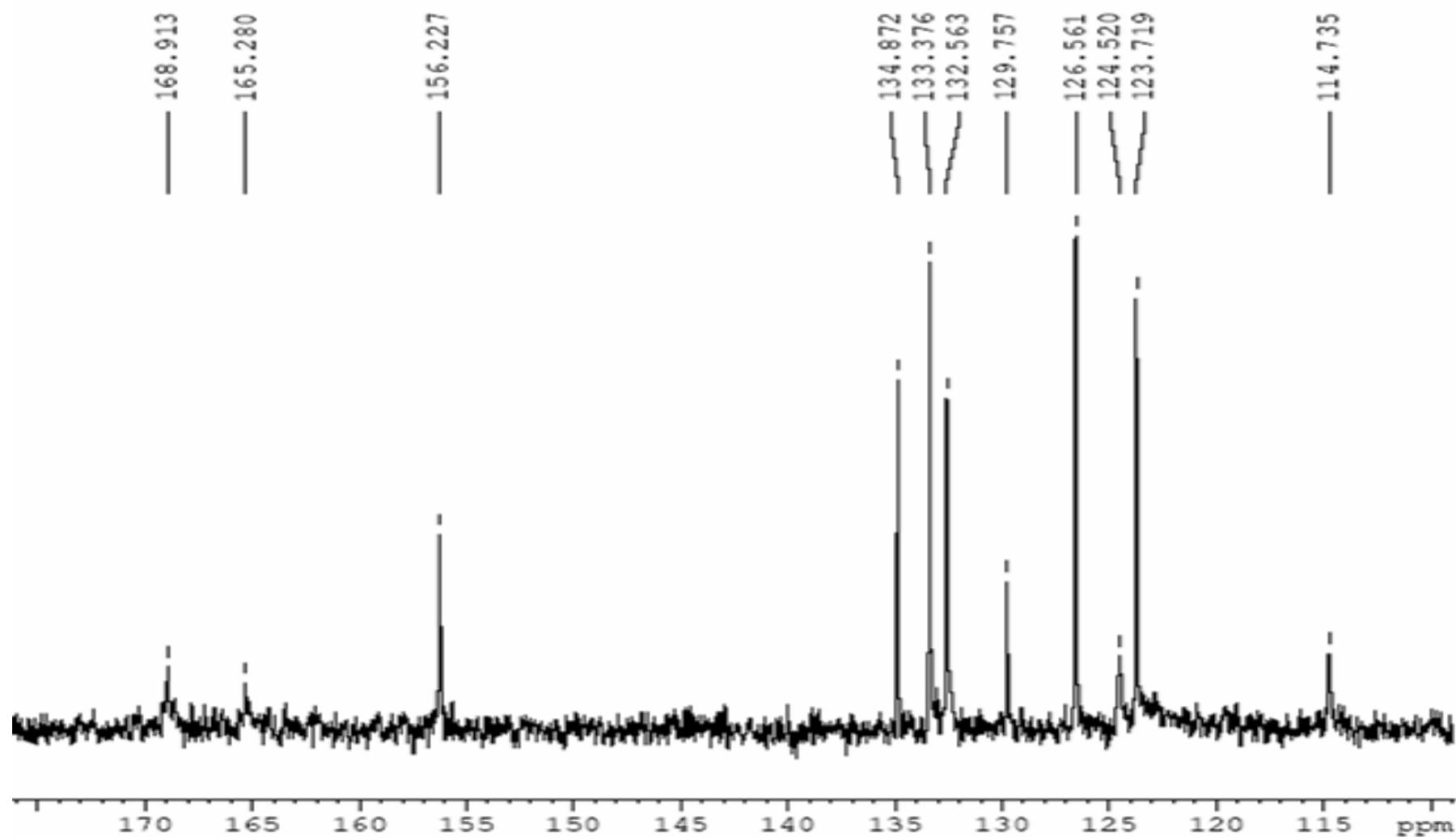


Figure (III- 14): spectre RMN ^{13}C du Meloxicam.

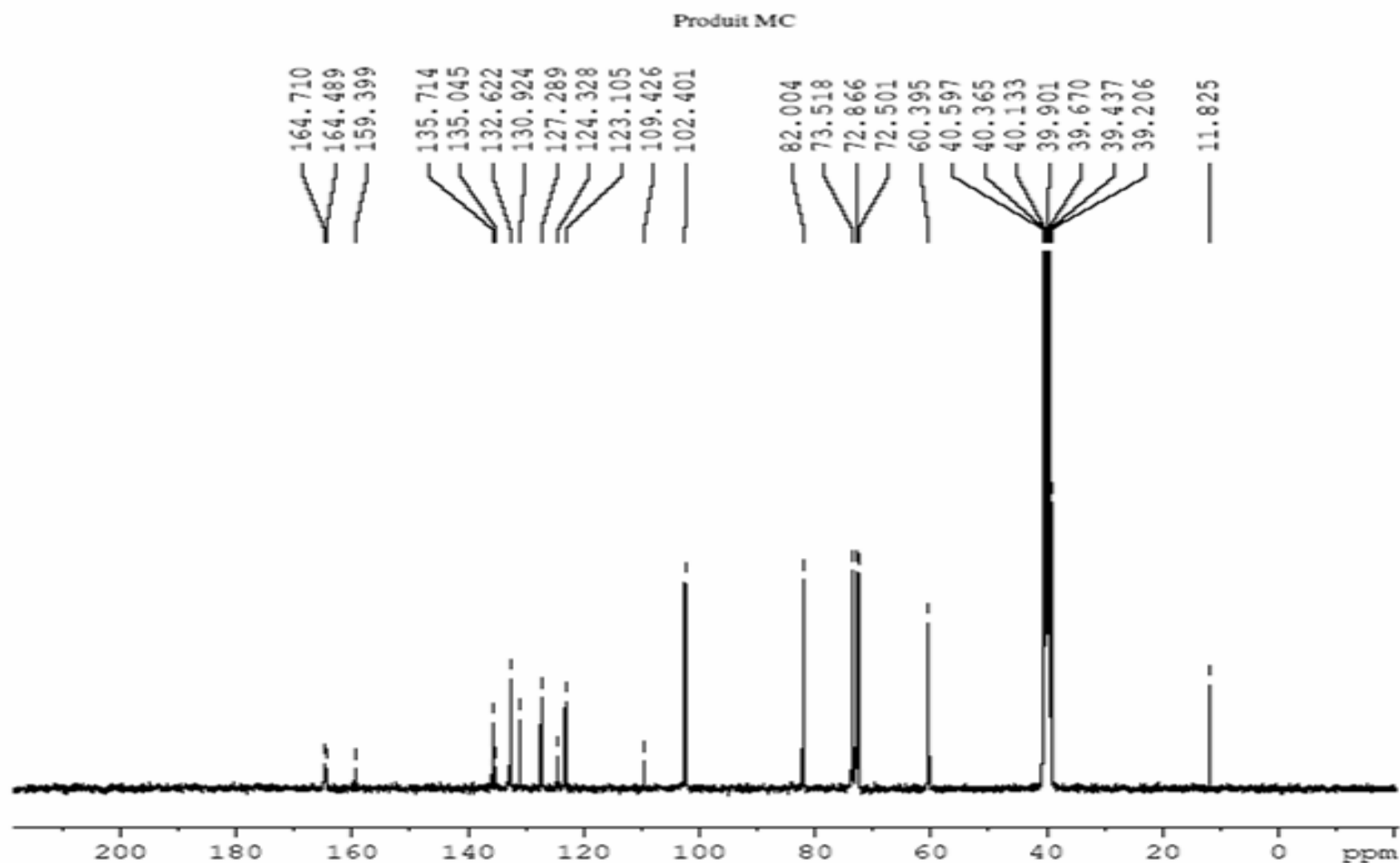


Figure (III-15) : spectre RMN ^{13}C du M-CD(1 :1)CS

IV. Analyse chromatographique :

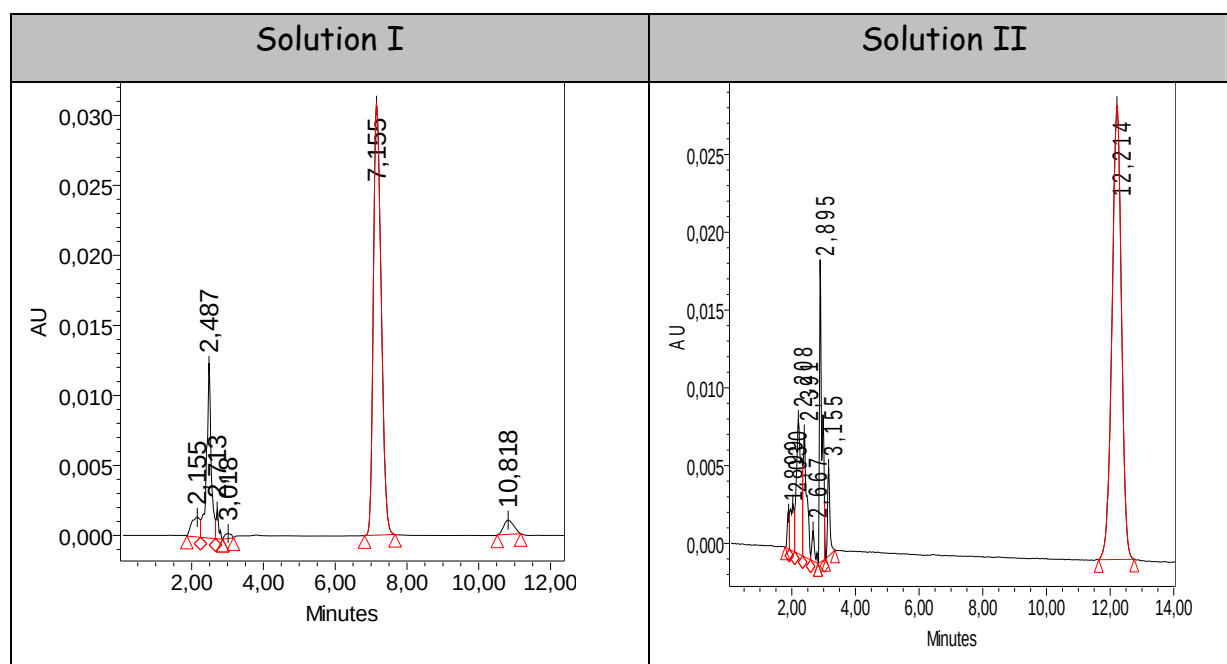
IV.1. Courbes d'étalonnage :

a) Courbe d'étalonnage en absence du sérum :

Dans les conditions opératoires retenues, les temps de rétention du meloxicam et de son étalon interne (piroxicam) sont respectivement de 8 et 11 minutes environ. La figure(III-16) représente le chromatogramme obtenu après injection d'un point de la gamme d'étalonnage.

Les équations des courbes d'étalonnage exprimant le rapport des surfaces des pics (meloxicam/piroxicam) (dans le cas d'un étalonnage interne) et les surfaces du pic du meloxicam (dans le cas d'un étalonnage externe) à 365nm en fonction de la concentration de meloxicam sont indiquées sur les figures (III-17, III-18).

Les coefficients de corrélation voisins de l'unité suggèrent une bonne linéarité dans le domaine de concentrations choisi.



Tableau(III-16) :Chromatogrammes représentatifs :

- I) d'une solution contenant 0.2mg.L^{-1} du meloxicam et (10mg.L^{-1}) du piroxicam ;
- II) d'une solution contenant (10mg.L^{-1}) du méloxicam.

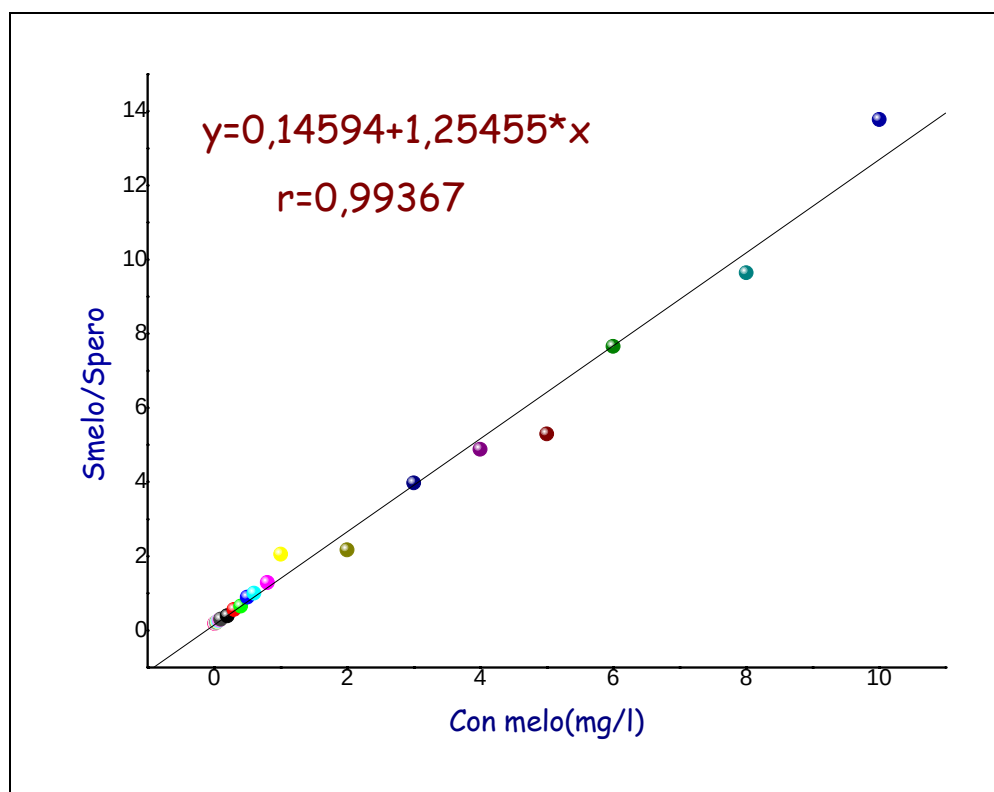


Figure (III-17) : Courbe d'étalonnage en absence du sérum (avec étalon interne)

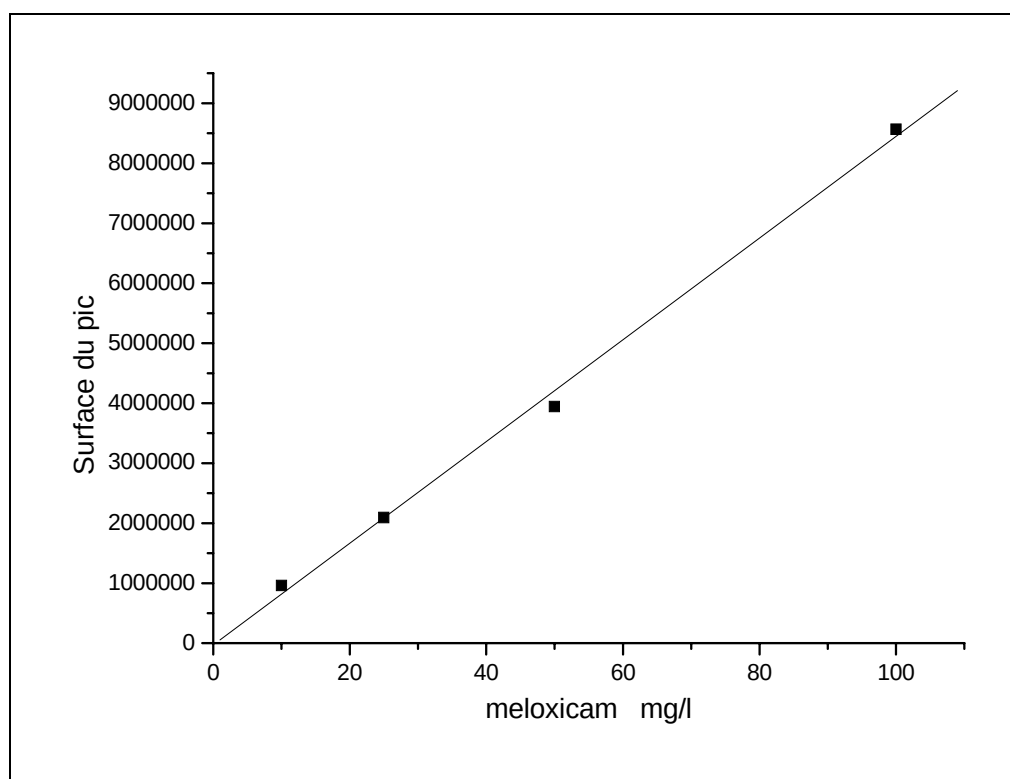


Figure (III-18) : Courbe d'étalonnage en absence du sérum (sans étalon interne)

b) Courbe d'étalonnage en présence du sérum :

La courbe d'étalonnage du dosage du méloxicam dans le plasma exprimant le rapport des surfaces des pics (méloxicam/piroxicam) à 365nm en fonction de la concentration de méloxicam est représentée sur la figure .

Le coefficient de corrélation voisin de l'unité suggère une bonne linéarité dans le domaine de concentration choisi.

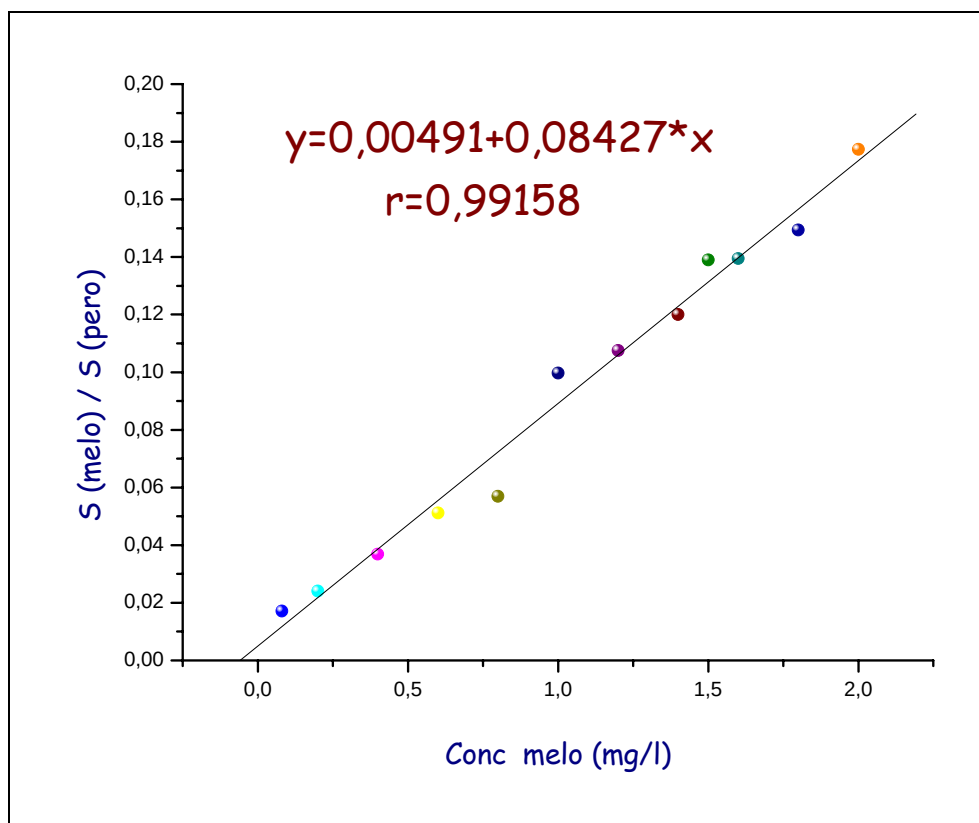


Figure (III-19) : Courbe d'étalonnage en présence du sérum.

b-1) Sélectivité :

Sur base du chromatogramme de l'échantillon de plasma contenant le meloxicam et le piroxicam (Figure III-8), les temps de rétention respectifs sont de 7 et 12 min.

Le chromatogramme de l'échantillon témoin de plasma ne montre, après extraction, aucune interférence des produits utilisés étant donné l'absence de pics aux temps de rétention des deux substances. Aussi, le chromatogramme du plasma prélevé après administration de la dose montre deux pics bien distincts correspondant au meloxicam et son étalon interne. Ainsi, remarque-t-on que la méthode utilisée est bien sélective pour la détermination quantitative de meloxicam dans le plasma.

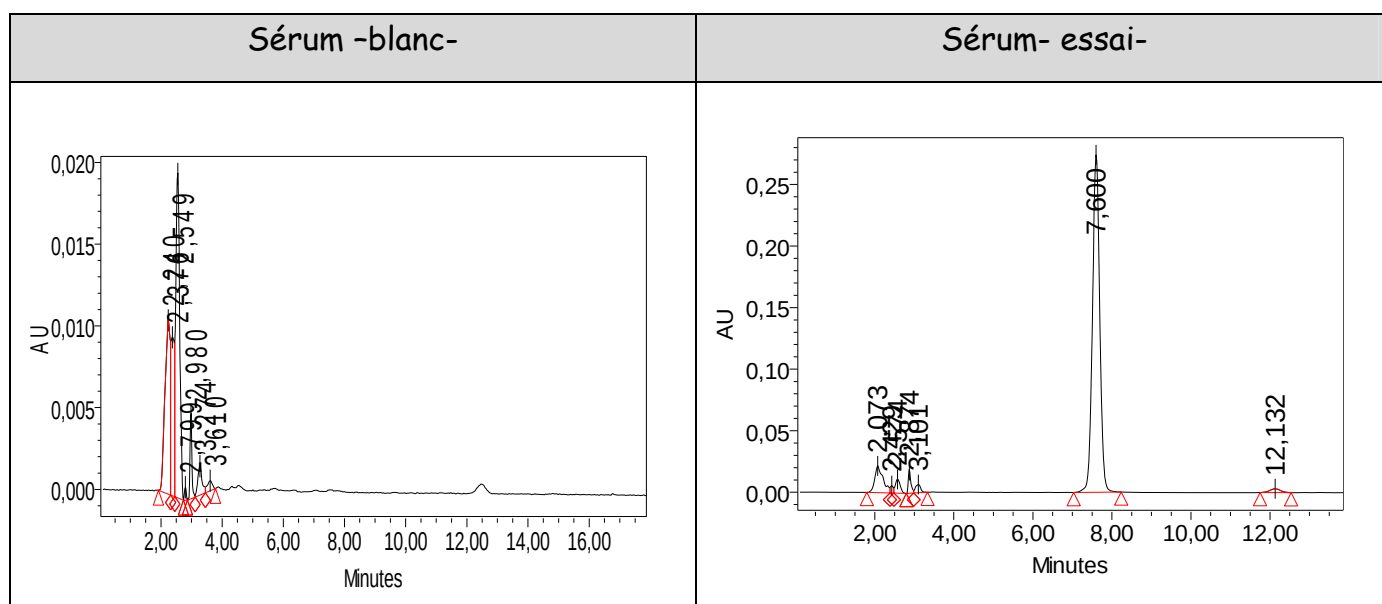


Tableau (III-8):chromatogrammes représentatifs d'un sérum blanc et d'un sérum chargé .

V.Biodisponibilité du méloxicam

V.1.Dissolution in vitro

Les profils de libération in vitro du meloxicam complexé en comparaison au meloxicam standard sont représentés dans la figure (III-20) .

Manifestement, la libération du meloxicam sous sa forme complexée semble être plus rapide comparativement au méloxicam standard. D'après les résultats obtenus, le méloxicam sous forme complexe permettait une augmentation significative de la quantité du meloxicam retrouvée dans le liquide gastro-intestinale : la vitesse de dissolution est augmentée de 5% après 10min. Cette libération semble devenir constante après 10 minutes, elle continue à progresser en fonction du temps dans le cas du méloxicam standard.

L'amélioration de la dissolution du méloxicam complexé préparé par la méthode(CS) peut être expliqué par le fait que le complexe formé est plus hydrophile par rapport à celui du méloxicam pur et donc plus soluble , car la surface de contact entre ce dernier avec la solution aqueuse est minimale d'où le caractère amorphe indiqué par la DSC et RX.

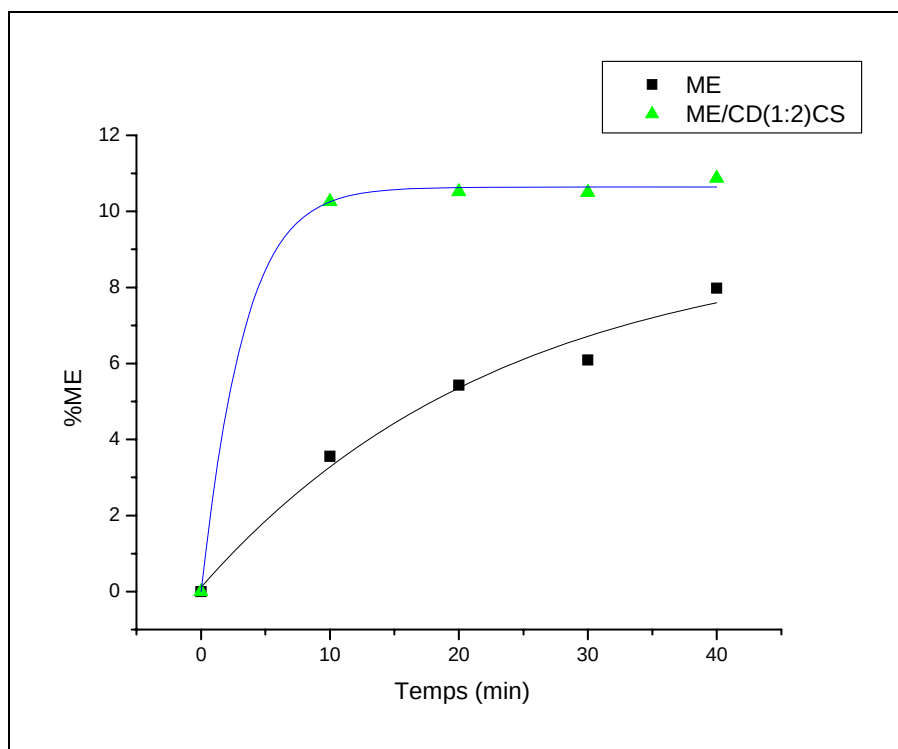
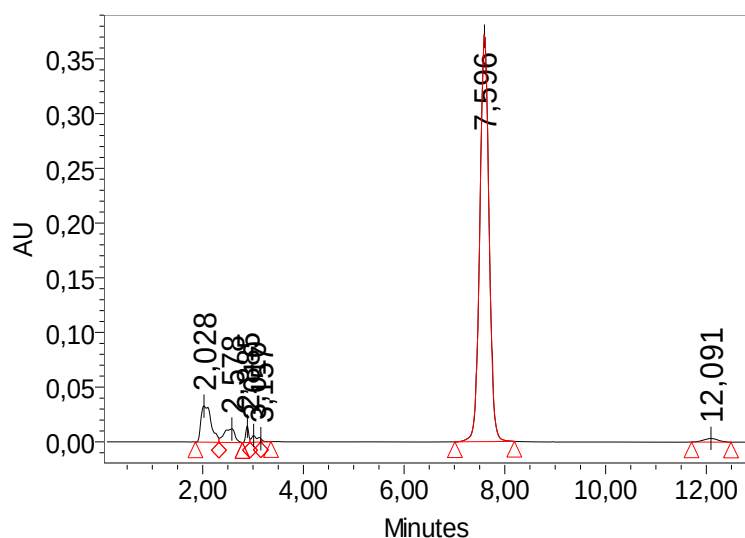


Figure (III-20) : profil de dissolution in vitro du méloxicam pur et complexé.

V.2. Analyse du méloxicam dans le sérum :

Les conditions chromatographiques décrites ont été appliquées pour déterminer le taux du méloxicam dans le sérum de rat. La figure (III-21) illustre un chromatogramme représentatif d'un extrait sérique. Le tableau (III-9) et la figure (III-22) résument les résultats obtenus.

La biodisponibilité du méloxicam chez le rat sous forme complexe administré par voie orale (1mg/kg), a été évaluée en comparaison aux résultats obtenus dans la littérature. Les résultats apparaissant dans le tableau III-9 font apparaître des paramètres pharmacocinétiques voisins entre le méloxicam complexé de ce travail et celui trouvé dans la littérature. Lorsqu'on compare les paramètres du méloxicam pur et celui inclus dans la cyclodextrine, des différences conséquentes entre les t_{max} et les C_{max} sont observées traduisant que l'inclusion du MX dans la β -CD accroît sa bioéquivalence et son apparition dans le sérum est plus rapide.



Figure(III-21) :chromatogramme représentatif d'un extrait sérique.

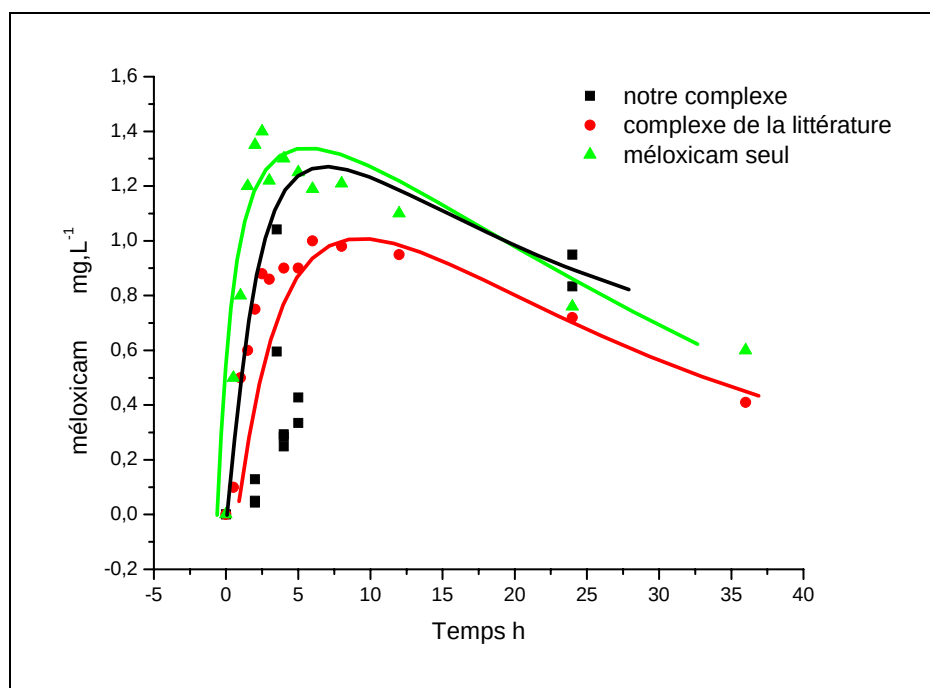


Figure (III-22) : Courbes pharmacocinétiques du méloxicam seul et complexé.

	Me pur	Me-CD(1 :1) littérature	Me-CD(1 :1)CS
$C_{\max}$ (mg/l)	1.0 ± 0.24	1.25 ± 0.44	1.34 ± 0.28
$T_{\max}$ (heure)	8.00 ± 3.2	4.5 ± 0.8	5.51 ± 0.7

Tableau(III-9) :paramètres pharmacocinétiques du méloxicam seul et complexé.

Conclusion

Générale

Ce travail est consacré à l'inclusion du méloxicam dans la cyclodextrine.

Au préalable à la réalisation de l'inclusion du méloxicam, il fallait tout d'abord montrer que cette inclusion est possible.

Une étude de la solubilité aqueuse du méloxicam en présence de cyclodextrine a été effectuée. Elle a clairement montré la croissance linéaire de cette solubilité en fonction de la quantité de cyclodextrine ajoutée. Les 3 températures utilisées ont permis d'avoir la constante de solubilité. Les valeurs positives de l'enthalpie et de l'entropie suggèrent que les interactions hydrophobes sont prédominantes alors que les valeurs négatives de l'enthalpie libre indiquent une réaction spontanée de complexation.

La suite logique a été de procéder expérimentalement à l'inclusion du méloxicam.

L'inclusion du méloxicam dans la β -cyclodextrine a été réalisée de 3 façons différentes :

- mélange physique consistant à mélanger physiquement 1 mole du Meloxicam avec 1 ou 2 mole de la β -CD pris à l'état solide.

- pétrissage en phase solide (KD) en ajoutant un mélange eau-méthanol (1:1) au mélange physique suivi d'un séchage à 45°C

- une troisième méthode (CS) où la préparation se fait en mélangeant le ME dissous dans l'ammoniaque à une solution aqueuse de la β -CD. L'équilibre est atteint par agitation intense et refroidissement lent pendant une heure. Pour obtenir le complexe en phase solide, après que l'équilibre est atteint, l'ammoniaque est enlevée par évaporation en utilisant l'étuve réglée à 45°C.

Différentes méthodes de caractérisation ont permis de conforter la présence d'un complexe en utilisant la 3^{ème} méthode.

L'analyse enthalpique différentielle a montré que le méloxicam perd son pic endothermique de fusion par complexation.

La diffraction X met en valeur la nature amorphe du complexe par rapport à la structure cristalline du complexe.

La spectroscopie UV montre bien que l'intensité des bandes d'absorption UV du ME est augmentée et légèrement déplacée dans le cas du complexe.

La spectroscopie FT-IR fait apparaître des disparitions et des déplacements de bandes spécifiques du méloxicam dans le cas du complexe.

La résonance magnétique nucléaire du proton et du ^{13}C fait remarquer des déplacements chimiques du complexe décalés par rapport à ceux observés dans le cas du méloxicam ou de la cyclodextrine pure.

Il fallait ensuite prouver que le complexe obtenu engendre une plus grande disponibilité du méloxicam.

In vitro, le test de dissolution normalisé selon la pharmacopée Américaine a clairement montré une plus grande concentration du méloxicam complexé par la cyclodextrine par rapport au méloxicam pur.

In vivo, l'essai sur animaux est essentiel, il fait apparaître ainsi que l'inclusion du MX dans la β -CD accroît sa bioéquivalence et son apparition dans le sérum est plus rapide.

Toutes ces mesures de solubilité et de biodisponibilité ont été réalisées par HPLC selon une méthode validée au laboratoire.

Références

Bibliographiques

Bibliographie

- [1] Villiers, A.C.R.Acad.Sci ; 112 (1891) 536.
- [2] Schardinger, F.Wien.Klin. Wochenschar; 17 (1904) 207.
- [3] K. Freudenberg, Meyer-Delius, M.Ber; Dtsch. Chem. Ges. 71 (1938) 1596.
- [4] K.Freudenberg, F.Z.Cramer, Naturforsch ; B.3 (1948) 464.
- [5] D .French, M.L.Levine, J.H.Pazur, E.J .Norberg. Am. Chem. Soc; 71 (1949) 353
- [6] F .Cramer, F.M. Henglein, Chem. Ber; 90 (1957) 2561.
- [7] K.Freudenberg, F.Cramer ; H.Plieninger . German Patent 895769 (1953).
- [8] J .Szejtli,. Cyclodextrins and their inclusions complexes, Akadémiai Kiado, Budapest 1982.
- [9] J .Szejtli,“Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry”. Chem. Rev. 98; (1998) 1743-1753.
- [10] J.Jacob, K .Geßler, D .Hoffmann, H.Sanbe, K.Koizumi, S.M.Smith, T.Takaha, Saenger, W. Angew, Chem. Int. Ed; 37 (1998) 606.
- [11] W .Saenger, J .Jacob, K.Geßler, T.Steiner, D .Hoffmann, H .Sanbe, K. Koizumi, S. M Smith, T .Takaha, Chem. Rev; 98 (1998)1787.
- [12] R.I.Gelb,L.M.Schwartz,J.J.Bradshaw, D.A.Laufer,Bioorg.Chem;9(1980)299.
- [13] R.I.Gelb,L.M.Schwartz, J.J.Bradshaw, D.a.Laufer, Bioorg.Chem;11(1982)274.
- [14] M.J.Jozwiakowski, K.A.Connors, Carbohydra.Res; 143(1985)51.
I.Tabushi, K .Yamamura, K .Fujita, H.J .Kawakubo, J.Am. Chem. Soc; 101 (1979) 1019.
- [15] R.L.Van Etten, J.F.Sebastain, G.A.Glowes, M.L.Bender, J.Am.Chem.Soc;89(1967)3242.
- [16] I.Tabushi, K.Yamamura, K.Fujita, H.J.Kawakuba,J.AM.Chem.Soc;89(1967)14.
- [17] F .Cramer, W .Saenger, H .Spatz, J.Am. Chem. Soc; 89 (1967) 14.
- [18] H .Kondo, H .Nakatani, K.J .Hiromi, Biochem; 79 (1976) 393.
- [19] A .Ueno, H .Yoshimura, K.J .Hiromi, Biochem; 79 (1976) 393.
- [20] J.L.Atwood, L.J.Barbour, C.L.Raston, I.B.N. Sudria, Angew.Chem.,Int.Ed; 37 (1998) 981.
- [21] Hamai, S. Recent , Res. Devel. Photochem. Photobiol; 3 (1999) 1.
- [22] K.W.J .Street , J.Liq.Chromatog; 10 (1987) 655
- [23] K.J.Naido, J.Chen, J.L.M.Jansson, G.Widmalm, A.Maliak, J.Phys.Chem.B, 108 (2004) 4236-4238
- [24] W.Saenger.Angew. Chem.Int; 19 (1980) 344-362
- [25] J.Szejtli, Cyclodextrins technology ; Kluwer.Acad, Dordrecht, Chap 2 (1988) 79.

- [26] I .Tabushi, Y .Kuroda, T .Mizutani, J. Am. Chem. Soc., 108 (1986) 4514-4518.
- [27] R. L .Van Etten, G. A. Clowes , J. F .Sebastian., M. L .Bender, J. Am. Chem. Soc., 89 (1967) 3253-3262.
- [28] J .Watson., Molecular Biology of the Gene 4th ed., 1987, Benjamin Cummings, Menlo Park, Calif.
- [29] J. H.Park , T. H., Nah , J. Chem. Soc., Perkin .Trans.2; 52 (1994) 1359-1362.
- [30] S.Shimpi, B.Chauhan, P. Shimpi, Acta .Pharm. 55 (2005) 139–156
- [31] H. KHALIL, Thèse de doctorat (Ecole doctorale: Chimie de Lyon), 2004.
- [32] Rajeswari Challa, Alka Ahuja. «*Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review*», N°43, Department of Pharmaceutics, Hamdard, University, New Delhi 110062, India. 2005
- [33] P. BONNET, Thèse de doctorat (Université Orleans), 2001.
- [34] E.Redenti et al, J.Pharm.Sci ; 89 (2000) 1-8
- [35] Buvâri-Barcza et al, J.incl .Phenom & Macro.Chem ; 42 (2002) 209-212
- [36] Mura et al, J. incl . Phenom & Macro. Chem; 39 (2001) 131-138
- [37] Mura et al, J. incl . Phenom & Macro. Chem; 260 (2003) 293-302
- [38] Piel et al, J. Pharm. Sci; 86-4 (1997) 475-480
- [39] Fenivesy et al, Proceeding of the 7th international cyclodextrins symposium (1994) 414-418
- [40] Van Hees et al, J. incl . Phenom & Macro. Chem; 44 (2002) 271-274
- [41] M .Ohashi, K.Kasatani., H .Shinohara, H .Sato, J. Am. Chem. Soc., 112 (1990) 5824-583
- [42] R.Rajewski, V.J.Stella, J.Pharm.Sci; 85 (1996) 1142-1168
- [40] M.Allegre, A.Deratani, Agro-Food -Industry .Hi-Tech; 5, (1-2) , 9-18(1994)
- [43] Dictionnaire “LARROUSSE MÉDICAL”
- [44] G.Engelhardt, D.Homma, K.Schlegel, C.Schmitzelzr, R.Utzmann, inflamm. Res; 44 (1995) 423-433
- [45] P.Luger, K.Daneck, W.Engel, G.Trummlitz, K.Wagner, Eur.J.Pharm.Sci; 4 (1996) 175-187
- [46] <http://www.vidal.fr/recherch substance.asp>
- [47] T .Higuchi & K. A.Connors, Phase solubility techniques. Adv. Anal. Chem. Instr. 4 (1965)117-121.
- [48] M.Masson, B.V.Sigurdardottir, K.Matthiasson and T.Loftsson, Chem.Pharm.Bull; 53 (8) (2005) 958-964
- [49] H .Gunther, La spectroscopie de RMN, Masson, Paris(1993)..

- [50] B .Perly,. & F. Djedaïni-Pilard,. (1991). Nuclear magnetic resonance of cyclodextrins, derivatives and inclusion complexes. In New trends in cyclodextrins (Duchêne, D., ed.), pp.215-246. Edition de santé, Paris.
- [51] Frömmling, K. H. & Szejtli, J. (1994). Cyclodextrins in pharmacy. Topics in inclusion science(Davies, J. E. D., Ed.), 5, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- [52] Saenger, W. (1984). In Inclusion compounds (Atwood, J. L., Davies, J. E. D. & MacNichol, D. D., eds.), Vol. 2, pp. 231-259. Academic. Press, London.
- [53] M.Suzuki, Y.Sazaki, Chem.Pharm.Bull; 27 (1979) 609-619
- [54] M.Henry, J.Chromatog. 544 (1991) 413
- [55] F.Chapuis, V.Pichon , M.Hennion , Oil et Gaz Science and Technology-Rev.IFP,Vol ,60 (2005), N°6 PP 899-912
- [56] Le Hir. A, «*Pharmacie galénique, bonne pratique de fabrication d'un médicament*», 8^{ème} édition Masson, Paris, 1997.
- [57] N.Buchi.Naidu, K.P.R.Chowdary, K.V.R.Murthy, V.Satyanarayan, A.R.Hayman, G.Becket , J.Pharm.Biom.Anal ; 35 (2004) 75-86
- [58] P.Irwin, P.Pteffer, L.Doner, G.Sapers, J.Brewster, K.Hicks , Carbohdrate.Sesearch ; 256 (1994) 13-27
- [59] R.Challa, A.Ahuja, J.Ali, R.K.Khar, AAPS.Pharm.Sci.Tech ; 6 (2005) E329-E357
- [60] C.Gazpio, M.Sanchez, A.Zornoza, C.Martin, C.Martinez-Oharriz, I.Vélaz, Talata ; 60 (2003) 477.