

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

FORMULATION PHARMACEUTIQUE COMBINÉE D'ANTIPALUDIQUES À
BASE D'EXTRAITS DE PLANTES: CARACTÉRISATION ET LIBÉRATION
CONTRÔLÉE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
KOUADIO VICTORIEN KONAN

AVRIL 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

À celui par qui et en qui je pus tout, à lui soit toute la gloire et ma gratitude!

Mes remerciements vont à l'endroit du Pr. M.A. Mateescu qui m'a accepté dans son laboratoire, m'a soutenu, conseillé, dirigé et surtout supporté durant ces années. J'ai connu peu de directeurs de recherche, toutefois celui-ci se distingue par son travail, sa rigueur, son attention, sa persévérance et sa quête continuelle de l'excellence.

À sa suite, je tiens à remercier le professeur associé Dr. Le Tien Canh, codirecteur et superviseur de ce travail de recherche, pour sa disponibilité, sa générosité dans ces conseils très avisés, pour sa promptitude à orienter les expériences et même à participer à certaines manipulations par son expertise multidisciplinaire.

Il convient de remercier la professeure Joanne Paquin (*ex*-directrice du programme), le professeur François Ouellette (directrice du programme), le professeur Livain Breau (*ex*-directeur du Département de chimie) et les différents membres du SCAE de l'Été 2012 jusqu'à ce jour (depuis ma demande d'admission jusqu'à l'obtention du Ph.D, en passant par la maîtrise en Biochimie qui a permis le passage accéléré au doctorat).

Je remercie également la professeure Emma Assemand Épse Koffi, Doyen de l'Unité de Formation et de Recherche en Science et Technologie des Aliments à l'Université Nagui Abrogoua (*ex*-Univ. d'Abobo-Adjamé) pour ma recommandation auprès de mon actuel directeur et pour notre collaboration scientifique.

Aussi, voudrais-je remercier tous les autres membres de l'équipe de recherche pour la bonne cohabitation, les fructueux échanges et l'esprit d'équipe qui prévalait en notre

sein, à savoir la professeure associée Dr. Ispas-Szabo, le Dr. Khalil Sakeer, Mariella, Ladan, Armelle, Marc-André, Mireille, Nassim, Akram (Elena), Mirna, Maziar et Giuliano, sans oublier Lindsay Blemur, Mme Akaji Samira Épse Kindo et Siham.

Il me plaît de remercier les organismes qui nous ont soutenus financièrement pour la réalisation de ce projet; ce sont le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) par la subvention Recherche et Développement Coopérative (RDC) durant trois années, la Faculté des sciences de l'UQAM pour les bourses d'exemptions de frais de scolarités supplémentaires et la bourse d'admission au doctorat, le Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIPA) pour les différentes bourses de dépannage et le Département de chimie (UQAM) pour son aide financière.

Je remercie également les enseignants et chercheurs que j'ai pu avoir comme enseignants et/ou évaluateurs lors de mes différents cours et examens. Mes remerciements vont aussi à l'endroit du personnel de soutien technique et administratif de l'UQAM.

Je voudrais remercier ma famille pour son soutien, avec une mention spéciale à mon beau-frère, Yapi Evariste M., sans manquer de rendre hommage à titres posthumes à mon père Konan Emmanuel (*Gbo Konan*) qui m'a inculqué l'essentiel et à son frère aîné K. Antoine (*Padré*). À ma mère N'Zi Cathérine (*Bolé N'Zi*) qui a investi tout son nécessaire pour ses enfants, je ne saurai la remercier assez. Mes oncles Germain NK. et Georges KK., je leur serai toujours reconnaissant.

Je remercie tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Enfin, au désir de mon cœur, ma bien-aimée épouse Bettina Konan, toute ma reconnaissance pour son soutien matériel, financier, moral et surtout affectif qui jamais ne m'a fait défaut.

DÉDICACE

À l'Éternel, celui qui est, qui était et qui sera

À mes aimables parents et à ma famille

À ma précieuse épouse, ma grâce

À mes (futurs) sages enfants

À toute ma postérité

AVANT-PROPOS

Dans la plupart des régions endémiques du paludisme, la récurrence des apparitions de la maladie, la sévérité de celle-ci, son emprise sur les populations, l'accessibilité très limitée ou même l'inaccessibilité aux antipaludiques efficaces ne laissent indifférente toute personne avertie ou instruite de la situation. Cette thèse est le résultat de la contribution du milieu de recherche universitaire, le laboratoire d'enzymologie et des polymères biocompatibles du Pr. M.A. Mateescu de l'Université du Québec à Montréal (UQAM) et du milieu de recherche privé, Karici-Diagnostics Inc., représenté en début de projet par le défunt Dr. Soriba Cissé, natif de l'Afrique de l'Ouest (Guinée Conakry), région où sévit le paludisme, déterminé à contribuer à la formulation d'antipaludiques efficaces et à moindre coût. Aussi originaire de cette région d'Afrique (Côte D'Ivoire), l'auteur de cette thèse n'a ménagé aucun effort pour mener à bien le projet. Titulaire d'une Maîtrise, d'un Diplôme d'Étude Approfondie en Biochimie et Technologie des Aliments (en Côte d'Ivoire) et faisant l'objet d'un passage accéléré au Doctorat en Biochimie (UQAM) suite aux résultats prometteurs de travaux et scolaires de la Maîtrise en Biochimie (UQAM), il était apte à mener à bien le projet de thèse. Avec la direction du Pr. Mateescu, avisé en formulation d'agents bioactifs et la codirection et supervision du Dr. Le Tien Canh, qui avait consacré 10 ans de sa carrière aux soins de populations impaludées (Institut Pasteur à Bangui, République Centrafricaine), l'engouement, l'expertise et les potentialités nécessaires étaient donc réunis autour de ce projet.

Ce projet est passé au travers de plusieurs situations douloureuses, à commencer par le décès du géniteur de l'auteur de la thèse, pendant la première année, et de celui de l'initiateur du projet, Dr. Soriba Cissé, en début de la troisième année du projet.

Toutefois, la réalisation du projet a suivi son cours et a abouti à la formulation d'antipaludique conformément aux recommandations de l'OMS, en associant l'Artémisinine à l'extrait de la *Peschiera fuchsiaefolia*, arbre de la famille des *Apocynaceae*.

Cette thèse est regroupée en deux grandes parties (I et II) subdivisées en différents chapitres. La partie I constituant la Partie Introduction renferme quatre chapitres qui présentent respectivement le paludisme, le stress oxydatif et la formulation d'agents bioactifs en forme de comprimés à administration orale. Chaque chapitre est introduit par un court descriptif des différents axes abordés. La partie II est la Partie Expérimentale; elle rassemble la description du projet de recherche et les 4 chapitres des travaux publiés (3) ou soumis pour publication (1). Un chapitre final (chapitre X) apporte la discussion et les conclusions des résultats des différents travaux réalisés dans ce projet et ouvre une lucarne pour des perspectives envisagées.

TABLES DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	v
LISTE DES FIGURES.....	xv
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xxi
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xxvi
RÉSUMÉ.....	xxvii
CHAPITRE I LE PALUDISME: LE CONTEXTE ET L'ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	1
1.1 Définition	1
1.2 Symptômes.....	2
1.3 Agent pathogène	2
1.4 Vecteur et transmission.....	3
1.5 Cycle de vie du <i>Plasmodium</i>	4
1.6 Mécanisme d'action du <i>Plasmodium</i>	6
1.7 Impact dans le monde	10
1.7.1 État actuel.....	10
1.7.2 Zones endémiques	12
CHAPITRE II LA LUTTE CONTRE LE PALUDISME	14
2.1 Mesures préventives.....	14
2.1.1 Éradication des moustiques <i>anophèles</i>	14

2.1.2	Vaccins contre le paludisme.....	15
2.1.3	Répulsion et/ou évitement des moustiques <i>anophèles</i>	16
2.2	Thérapie médicamenteuse contre le paludisme	16
2.2.1	Dérivés de quinoléine.....	17
2.2.2	Antifolates	21
2.2.3	Dérivés d'Artémisinine	22
2.2.4	Antibactériens.....	23
2.2.5	Chimiorésistance du <i>Plasmodium</i>	24
2.2.6	Recommandation de l'OMS pour le traitement contre le paludisme	27
2.2.7	Antipaludiques actuels	28
2.3	Développement de nouveaux agents antipaludiques : L'extrait de <i>Peschiera fuchsiaefolia</i>	29
2.3.1	Origine botanique.....	30
2.3.2	Composition	30
2.3.3	Activité biologique et propriétés thérapeutiques.....	30
2.3.4	Mécanisme d'action	31
CHAPITRE III LE STRESS OXYDATIF : AMI ET ENNEMI		33
3.1	Stress oxydatif.....	33
3.2	Agents pro-oxydants	34
3.2.1	Les espèces radicalaires	34
3.2.2	Les espèces pro-oxydantes non radicalaires.....	39
3.3	Sources endogènes des espèces réactives d'oxygène	42
3.3.1	Les cellules macrophages et dendritiques	42
3.3.2	Les leucocytes	42

3.4 Des sources exogènes des espèces réactives d'oxygène	43
3.4.1 Des médicaments.....	43
3.4.2 Des xénobiotiques	44
3.4.3 Des pathologies	44
3.5 Les effets des ERO sur les cellules	44
3.5.1 Des effets délétères des espèces réactives d'oxygène	44
3.5.2 Des effets bénéfiques des espèces réactives d'oxygène	45
3.6 Systèmes de défenses de l'organisme contre les espèces réactives: agents bioactifs avec propriétés thérapeutiques antioxydantes	46
3.6.1 Des agents antioxydants "préventifs"	48
3.6.2 Des antioxydants piègeurs («scavengers») de radicaux	51
3.7 Méthodes courantes d'évaluation <i>in vitro</i> des propriétés antioxydantes	52
3.7.1 La méthode ORAC.....	53
3.7.2 La méthode ABTS ou TEAC	54
3.7.3 La Méthode Folin-Ciocalteu	55
3.7.4 La méthode FRAP	57
3.7.5 La méthode DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	57
3.7.6 La méthode CUPRAC	59
 CHAPITRE IV FORMULATION D'AGENTS BIOACTIFS SOUS FORME DE COMPRIMÉS POUR ADMINISTRATION ORALE.....	60
4.1 Définitions : formulation et comprimé	60
4.2 Types de comprimés en forme de dosage à administration orale	61
4.3 Types de formulation sous forme de comprimés pour administration orale.....	63
4.4 Facteurs influençant la formulation de comprimé	64
4.4.1 Le principe actif	64
4.4.2 Excipients	68

4.4.3 La force de compression	73
CHAPITRE V PRÉSENTATION DU PROJET ET CONTRIBUTION À LA RECHERCHE	74
5.1 Problématique	74
5.2 Hypothèses de travail	77
5.3 Objectifs de recherche.....	77
5.4 Principales contributions à la recherche durant le projet doctoral	80
CHAPITRE VI ARTICLE 1: ACTIVATION RAPIDE DE L'ABTS PAR ÉLECTROLYSE POUR L'ÉVALUATION DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE.....	83
6.1 Résumé.....	84
6.2 Abstract	86
6.3 Introduction.....	87
6.4 Results.....	89
6.4.1 ABTS activation by electrolysis.....	89
6.4.2 Stability of activated ABTS ^{•+}	90
6.4.3 The reactivity of activated ABTS ^{•+} reagent versus different concentrations of Trolox	90
6.4.4 Antioxidant capacity evaluation.....	90
6.5 Discussion	91
6.6 Conclusion	94
6.7 Figures, scheme and table	95
6.8 Experimental	101
6.8.1 Materials.....	101

6.8.2	Ceruloplasmin purification.....	101
6.8.3	Enzymatic activities	102
6.8.4	TEAC method based on ABTS ^{•+} generated by potassium persulfate	103
6.8.5	Modified TEAC assay with ABTS fast activation by electrolysis.....	103
6.9	References.....	105
CHAPITRE VII ARTICLE 2 : SOLUBILITÉ AMÉLIORÉE DES ALCALOÏDES POUR UNE FORMULATION DE COMPRIMÉS À LIBÉRATION CONTRÔLÉE: CAS DE LA <i>PESCHIERA FUCHSIAEFOLIA</i>		
7.1	Résumé.....	110
7.2	Abstract	112
7.3	Introduction.....	113
7.4	Materials and methods	116
7.4.1	Synthesis of CMS.....	116
7.4.2	Pf co-processed with Maltodextrin	117
7.4.3	Preparation of CMS-Pf complexes.....	118
7.4.4	Formulation of CMS-Pf complexes as monolithic tablets	119
7.4.5	Characterization of Pf complexes	119
7.4.6	Dissolution assay.....	122
7.5	Results.....	123
7.5.1	Degree of substitution (DS) of synthesized CMS	123
7.5.2	Characterization of MD/Pf and CMS-Pf.....	123
7.5.3	Antioxidant activity of <i>Peschiera fuchsiaefolia</i> (alkaloid) extracts.....	125
7.5.4	Solubility of complexes.....	126
7.5.5	Dissolution assay.....	127
7.6	Discussion	128

7.7 Conclusion	134
7.8 Figures and tables	135
7.9 References.....	142
CHAPITRE VIII MANUSCRIT: FORMULATION ANTIPLASMODIALE: ARTÉMISININE ASSOCIÉE À DES ALCALOÏDES BIS-INDOLIQUES (L'EXTRAIT DE LA <i>PESCHIERA FUCHSIAEFOLIA</i>).....	
8.1 Résumé.....	149
8.2 Abstract.....	151
8.3 Introduction.....	152
8.4 Materials and methods	155
8.4.1 Preparation of polysaccharide complexes with Pf	156
8.4.2 Characterization	157
8.4.3 Stability of CMC-Pf	158
8.4.4 Antioxidant properties.....	159
8.4.5 Solubility assay	159
8.4.6 Dosage methods of Pf and Arte.....	160
8.4.7 <i>In vitro</i> evaluation of Arte and Pf interaction	161
8.4.8 Formulation of Arte combined with CMC-Pf tablets	161
8.4.9 Disintegration test	162
8.4.10 Dissolution assay.....	162
8.4.11 Mechanic properties of the tablets	163
8.4.12 Statistical analysis	164
8.5 Results.....	165
8.5.1 Characterization of MD/Pf and CMC-Pf complexes and stability in SGF and SIF	165
8.5.2 Antioxidant capacity	166

8.5.3	Solubility assay	167
8.5.4	Dosage methods of Pf and Arte.....	167
8.5.5	Interaction study between Arte and CMC-Pf.....	167
8.5.6	<i>In vitro</i> study of release kinetics of Arte combined with CMC-Pf	168
8.5.7	Mechanical properties	168
8.6	Discussion	168
8.7	Conclusion and perspectives.....	173
8.8	Figures and tables	174
8.9	References	182
CHAPITRE IX ARTICLE 3: PRÉCOMPRESSION DE POUDRES SÈCHES D'AGENTS BIOACTIFS DE VÉGÉTAUX POUR OPTIMISER LA DENSITÉ ET LA COMPACITÉ: LE CAS DE LA <i>PESCHIERA FUCHSIAEFOLIA</i>		187
9.1	Résumé.....	188
9.2	Abstract	190
9.4	Introduction.....	191
9.5	Materials and methods	194
9.5.1	Preparation of CMC-Pf complex.....	194
9.5.2	Precompression of CMC-Pf powder	195
9.5.3	Determination of tapped volume: Tap density assay	195
9.5.4	Characterization of CMC-Pf and pCMC-Pf complexes.....	196
9.5.5	Solubility assay	197
9.5.6	Antioxidant properties.....	198
9.5.7	Formulation of monolithic dosage forms and dissolution assay	198
9.5.8	Mechanic properties of the tablets	200
9.5.9	Antioxidant properties.....	201
9.6	Results and discussion	201
9.7	Conclusion	206

9.8 Figures.....	207
9.9 References.....	212
CHAPITRE X DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	219
10.1 Activation rapide de l'ABTS par électrolyse sans interférence dans l'évaluation de la capacité antioxydante par la méthode <i>TEAC</i>	221
10.2 Amélioration de la solubilité des alcaloïdes bisindoliques de type Pf et leurs formulations à administration orale	225
10.2.1 Pf facilement quantifié par dosage UV à 280 nm	226
10.2.2 Évaluation de la solubilité au moyen d'une propriété spécifique du composé d'intérêt dans un échantillon	227
10.2.3 L'amélioration de la solubilité des alcaloïdes de Pf par complexation avec le carboxyméthylamidon facilite leur formulation à administration orale pour une libération prolongée.	229
10.3 L'extrait de Pf à solubilité améliorée sous forme de complexe CMC-Pf est priorisé pour la formulation en combinaison à libération contrôlée des deux principes actifs.....	231
10.4 L'extrait de Pf sous forme précompressée (pCMC-Pf) est plus avantageux pour la production des comprimés à plus grande échelle	234
10.5 Conclusion et perspectives	235
ANNEXE A CONTROLLED RELEASE FORMULATION FOR THE TREATMENT OF MALARIA.....	238
ANNEXE B ALCALOÏDES BISINDOLIQUES COMME AGENTS ANTIBACTÉRIENS D'ORIGINE NATURELLE	240
BIBLIOGRAPHIE	242

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Un anophèle <i>albanis</i> se nourrissant de sang sur un bras humain	4
1.2 Cycle de vie du <i>Plasmodium</i>	6
1.3 Structure quaternaire de l'hémoglobine et de l'hème	8
1.4 Diagramme de la dégradation de l'hémoglobine et de formation d'hémozoïne par le <i>Plasmodium</i>	9
1.5 Carte illustrant la distribution du paludisme à travers le monde	13
2.1 Structure chimique des dérivés de quinoléine	18
2.2 Structures chimiques de l'Artémisinine et ses dérivés bioactifs	24
2.3 Structures des alcaloïdes de l'extrait de la <i>Peschiera fuchsiaefolia</i>	32
3.1 La réduction du Fe^{3+} -TPTZ en Fe^{2+} -TPTZ	57
3.2 La réduction du radical DPPH• (2,2-diphényl-1-hydrazyl) en DPPH-H (2,2-diphényl-1-hydrazine) par un antioxydant	58
3.3 La réduction du Cu(II)-néocuproïne en Cu(I)-néocuproïne par un antioxydant	59
4.1 Arbre de décision du concept ou du type de comprimés	62

4.2	Types de comprimés en forme de dosage à administration orale	62
4.3	Schéma illustrant la variation de la concentration de l'ingrédient pharmaceutique actif dans le sang induit par l'administration orale de comprimés issus de formulation à libération immédiate et à libération contrôlée	63
4.4	Profil pharmacocinétique de l'ibuprofène formulé en comprimé monolithique à libération contrôlée avec deux taux de libération (2RR) en utilisant la matrice calcium carboxyméthylamidon	65
4.5	Classes des médicaments selon le Système de Classification Biopharmaceutique des médicaments.....	66
4.6	Structure des composés de l'amidon	70
4.7	Structure de l'unité de base de la cellulose.....	71
5.1	Présentation schématique des principales étapes du projet	82
6.1	Influence of the electrolysis time on the color intensity and the visible spectra of the activated ABTS ^{•+}	95
6.2	Time course of A _{max} 734 nm of ABTS ^{•+} at increasing electrolysis time	96
6.3	Stability of the ABTS ^{•+} reagent obtained by ABTS activation with potassium persulfate (classical assay) and via ELS (20 sec) for the Fast TEAC assay, as showed by A _{max} 734 nm	96
6.4	Time-course and absorbance dependency of the ABTS ^{•+} reagent activated by potassium persulfate classical method and by electrolysis fast method, at different concentrations of Trolox	97
6.5	Maximal absorbance wavelenght shifts of activated ABTS depending on the electrolysis time	99
6.6	Comparison of time courses of absorbency of ABTS ^{•+} reagent in the presence of different concentrations of Trolox.....	99

6.7	Relative absorbency at 280 nm (aromatic rings of ABTS) at increasing electrolysis time	100
6.8	Relative absorbency at 514 nm (ABTS ²⁺ dication formation) at increasing electrolysis time	100
7.1	Chemical structures of principal alkaloids from Pf extract	135
7.2	FTIR spectra of different Carboxymethylstarch and of native starch	135
7.3	FTIR spectra of MD, free Pf, MD/Pf, CMS and CMS-Pf complex	136
7.4	FTIR spectra of CMS-Pf and	136
7.5	X-Ray diffractograms of MD, MD/Pf and of CMS and CMS-Pf complexes. The MD/Pf and CMS-Pf in SGF or in SIF are in tablet dry forms.....	137
7.6	Scanning Electronic Microscopy of Pf, co-processed MD/Pf and CMS-Pf complexes at different magnitudes	137
7.7	Antioxidant capacity of Pf, MD/Pf and CMS-Pf before (0 h) and after incubation (2h) in water, SGF and SIF	138
7.8	Solubility in saturation condition of Pf, MD/Pf and CMS-Pf in different media using drying method	138
7.9	Solubility of Pf, MD/Pf and CMS-Pf using the new approach based on the absorption capacity of Pf at 280 nm in different media at various times of incubation: 5h (a) and 24h (b)	139
7.10	Release profiles (A-C) and release time (D) of <i>Peschiera</i> extracts from tablets.....	140
7.S1	Quantity of Pf complexed to CMS according to DS of the CMS.....	141
7.S2	Release profiles of free Pf and MD/Pf.....	141

7.S3	Color intensities and absorbencies at 280 nm (λ_{max}) of Pf, MD/Pf and CMS-Pf saturated solutions in different media	142
8.1	Chemical structures of Artemisinin and some alkaloids from Pf extract....	174
8.2	Dosage methods of Pf and Arte	174
8.3	FT-IR spectra of: A) MD and CMC free and complexed with Pf; B) MD/Pf and CMC-Pf after incubation in simulated gastric (SGF) and simulated intestinal (SIF) fluids	175
8.4	X-ray diffractograms of MD, CMC and of co-processed MD/Pf and CMC-Pf complexes before and after incubation in SGF and in SIF	175
8.5	Scanning Electron Microscopy of MD/Pf aggregate and CMC-Pf complexes	176
8.6	Thermograms of MD, MD/Pf, CMC and Pf-CMC.....	176
8.7	Antioxidant capacity of MD/Pf and CMC-Pf in nanopure water, SGF and SIF	177
8.8	Solubility (mg/mL) of MD/Pf aggregate and CMC-Pf in nanopure water, SGF and SIF.	177
8.9	UV-Vis absorption spectrum of CMC-Pf complex; Standard curve of Pf by Spectrophotometric and Standard curve of Arte by ABTS reagent	178
8.10	Behavior of Arte (or CMC-Pf) in the presence of CMC-Pf (or Arte)	178
8.11	Pictures of formulated bilayer (A) and monolithic (B) tablets	179
8.12	Kinetic release profiles of combined Artemisinin and CMC-Pf tablet under: A) bilayer and B) monolithic dosage forms	180
8.13	SEM schematic presentation of hydrophobic and hydrophilic zones of CMC-Pf complex.....	180

9.1	Different quantities of CMC-Pf complex powder in the die.	207
9.2	The influence of the precompression forces on volume (A) and tap density (B) of precompressed CMC-Pf powders	207
9.3	Influence of tapping time on volumes of pCMC-Pf precompressed at different forces (25, 50 and 100 Kg/g)	208
9.4	FTIR of CMC-Pf and pCMC-Pf at different precompression forces	208
9.5	X-RD diffractograms of CMC-Pf and of pCMC-Pf complexes precompressed at various forces.....	209
9.6	TGA diagrams and TG parameters of CMC-Pf and of pCMC-Pf submitted at different precompression forces.....	209
9.7	SEM micrographs of CMC-Pf and of pCMC-Pf (CMC-Pf precompressed) at 25 kg/g	210
9.8	Solubility (A) and antioxidant activity (B) of CMC-Pf and of pCMC-Pf precompressed at various forces in aqueous media, simulated gastric (SGF) and intestinal (SIF) fluids	210
9.9	Release profiles of CMC-Pf, pCMC-Pf and Arte from ACT monolithic tablet dosage forms as bitherapeutic agents.....	211
9.10	Mechanical properties: A) Friability and B) Hardness determined taking the length (l) or the width (w) of the tablet as diameter (d_l and d_w).	211

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Nombre de cas de paludisme et de décès associés par an, de 2012-2016	11
2.1 Antipaludiques disponibles et leur mode d'action.....	20
2.2 Chimiorésistance à des antipaludiques	25
2.3 Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine déployées pour leur utilisation clinique	29
3.1 L'oxygène et ses métabolites.....	35
3.2 Les antioxydants chélateurs de cations métalliques	50
6.1 Antioxidant capacity of samples.....	101
7.1 Antioxidant activity of Pf, MD/Pf and CMS-Pf versus the antioxidant activity of equal mass of Trolox	139
7.2 Solubility of various Pf forms in different medias according to the USP ...	140
8.2 Type of tablet and disintegration time	181
8.3 Mechanical properties of the tablets.....	181

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AA	Acide aminé
ABAP	2,2'-azobis-(2-amidinopropane)HCl
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ABTS ^{•+}	ABTS sous forme de cation radicalaire
ACT	<i>Artemisinin-based Combination Therapy</i>
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
A _{max}	Maximal Absorbency
Arte	Artémisinine ou <i>Artemisinin</i>
ATP	Adénosine Triphosphate
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i>
CGR	Globule rouge
CMA	Carboxyméthylamidon
CMS	<i>Carboxymethylstarch</i>
CMC	Carboxyméthylcellulose

CMC-Pf	Complexe CMC-Pf (Extrait de Pf complexé avec le CMC)
CMP	Carboxyméthyl polysaccharide
CMS-Pf	Complexe CMS-Pf (Extrait de Pf complexé avec le CMS)
CP	<i>Ceruloplasmin</i>
CSP	<i>Circumsporozoite proteins</i>
CUPRAC	<i>Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity</i>
DAO	Diamine oxydase or <i>Diamine oxidase</i>
DDT	Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane
DHFR	Dihydrofolate réductase
DHPS	Dihydropteroate synthase
DPPH	2,2-diphényl-1-hydrazyl
DPPH [•]	Radical 2,2-diphényl-1-hydrazyl
DS	<i>Degree of Substitution</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
ELS	Électrolyse ou <i>Electrolysis</i>
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
FDA	<i>(United States) Food and Drug Administration</i>

FGS	Fluide Gastrique Simulé
SGF	<i>Simulated Gastric Fluid</i>
FIS	Fluide Intestinal Simulé
SIF	<i>Simulated Intestinal Fluid</i>
FRAP	Ferric Reducing Antioxydant Power
FTIR	<i>Fourier-Transform InfraRed</i>
GAG	Glycosaminoglycanes
GP	Glutathion peroxydases
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
Hb	Hémoglobine
HC	Hémocyanine
HPC	Hydroxypropyl-cellulose
HPLC	High performance Liquid Chromatography
HPMC	Hydroxypropylméthyl-cellulose
LADMER	Libération, Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Réponse
MC	Méthyl-cellulose
MD	Maltodextrine
MD/Pf	MD/Pf co-processée ou aggrégée (extrait de Pf associé à la maltodextrine)

MRP1	<i>Multidrug Resistance-associated Protein 1</i>
NF-USP	<i>National Formulary-United States Pharmacopeia</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
WHO	<i>World Health Organization</i>
ORAC	Oxygen Reactive Absorption Capacity
PA	Principe Actif
pCMC-Pf	<i>Precompressed CMC-Pf complex</i> (Complexe CMC-Pf pré-compressé)
PEG	Polyéthylène glycol
Pf	<i>Peschiera fuchsiaefolia</i>
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum Chloroquine resistance transporter</i>),
PfDPAP	<i>Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidases</i>
Pfh1	<i>Plasmodium falciparum haplotype 1</i>
Pfmdr1	<i>Plasmodium falciparum multidrug resistance transporter 1</i>
<i>Pfmrp</i>	<i>Plasmodium falciparum multidrug resistance associated protein</i>
PfNHE1	<i>Plasmodium falciparum sodium or proton exchanger 1</i>
P-gp	<i>P-glycoprotein, Permeability-glycoprotein</i>

SCB	Système de Classification Biopharmaceutique
SEM	<i>Scanning Electronic Microscopy</i>
SOD	Superoxyde dismutase
TD	<i>Tap density</i>
TE	<i>Trolox Equivalent</i>
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TGA	Thermogravimetry Analysis
TRAP	<i>Thrombospondin-related anonymous protein</i>
UdeM	Université de Montréal
UQAM	Université du Québec à Montréal
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
VIH	Virus de l'Immuno-Déficience Humaine
XC	Croscarmellose

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C	Degré Celsius
μL	Microlitre
μM	Micromole/Litre
h	Heure
Kp	Kilopond (équivalent à Kg force et à 9.81 Newton)
M	Mole/Litre
mA	Milliampère
min	Minute
mM	Millimole/Litre
sec	Seconde ou <i>second</i>
V	Volt

RÉSUMÉ

Le paludisme, maladie parasitaire la plus répandue et la plus meurtrière, a contourné les nombreuses tentatives de prévention par des vaccins. Cette vieille maladie est à traitement complexe et délicat. Les quelques combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA), encore efficaces contre celle-ci, sont continuellement menacées par des formes de résistances de l'agent pathogène, le *Plasmodium*, en particulier par le *Plasmodium falciparum*. De nombreux extraits de plantes, candidats pour des formulations en CTA comme recommandées par l'OMS, sont désavantagés par leur faible solubilité, leur instabilité et leur faible densité, entraînant un état duveteux et volumineux, difficile à manipuler. Ainsi, ces extraits sont inappropriés pour une utilisation en industrie pharmaceutique. En plus, avec l'absence de méthodes simples de dosage de la plupart de ces extraits, surtout pour les études de la cinétique de libération, leur formulation pour des libérations prolongées est limitée en raison des dépenses encourues (matériaux et équipements). Cependant, de telles formulations sont avantageuses pour un traitement efficace du paludisme sans risque de développement de résistance.

L'objectif principal de ce projet de recherche était d'élaborer des formulations à libération prolongée de CTA, contenant l'Artémisinine (Arte) et l'extrait de la *Peschiera fuchsiaefolia* (Pf). Toutefois, cet extrait de plante (Pf) possède les caractéristiques problématiques susmentionnées. Cette association (Arte:Pf) étant nouvelle, il était nécessaire de développer des méthodes de dosage, surtout pour les études de cinétique de libération dans des fluides biologiques.

La solubilité de l'extrait de Pf a été améliorée par sa complexation avec du carboxyméthyl-amidon (*carboxymethyl-starch*, CMS) ou de la carboxyméthylcellulose (CMC), sans altération de la capacité antioxydante de Pf. Les complexes de Pf (CMS-Pf et CMC-Pf) formulés seuls sous forme de comprimés présentaient des profils de libération allant de 10-12 h. Pour les formulations en CTA, les comprimés bicouches contenant l'Arte et le CMC-Pf permettaient une libération séquentielle et prolongée: libération immédiate d'Arte suivie d'une libération prolongée de Pf (10 h), tandis que les comprimés monolithiques assuraient une libération simultanée et prolongée, mais différentielle: Arte (8 h) et Pf (environ 10 h) avec des cinétiques de libérations différentes. CMC-Pf, léger, duveteux et volumineux, a été soumis à une

précompression de 25 Kg/g d'échantillon avant toute utilisation, aboutissant à sa densification. La morphologie de pCMC-Pf a changé (bris des granules de CMC-Pf) sans aucune influence au niveau moléculaire sur les liaisons dans le complexe et encore moins sur les profils de libération des différentes formulations. La méthode TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) pour l'évaluation de la capacité antioxydante a été améliorée en activant la sonde ABTS par électrolyse en 20 sec au lieu de 16 h avec le persulfate de potassium.

Ces travaux ont permis d'améliorer la solubilité et la densité de l'extrait de Pf, favorisant les différentes formulations et la faisabilité au niveau industriel sans affecter les propriétés cinétiques de libération des formulations. De nouvelles approches et méthodes de dosage simples et rapides ont également été proposées pour la détermination de la solubilité, de Pf et de Arte ainsi que de la capacité antioxydante.

Mots clés : Formulation; Libération contrôlée; CTA; Paludisme; Alcaloïdes indoliques.

CHAPITRE I

LE PALUDISME : LE CONTEXTE ET L'ÉTAT DES CONNAISSANCES

Ce chapitre définit le paludisme, décrit ses symptômes, présente le vecteur, son mode de transmission, son cycle de vie au niveau cellulaire et son mécanisme d'action. L'impact de cette maladie dans le monde est également décrit.

1.1 Définition

Dérivé du latin *Paludis* (signifiant marais ou marécage), le paludisme était qualifié de maladie des marais. Bien qu'il soit un facteur de propagation du paludisme, le mauvais air émanant des marécages était tenu (à tort) responsable de la propagation de cette maladie. Ce qui lui valut aussi l'appellation de malaria (mauvais air). C'est en 1897 que Ronald Ross prouva le rôle des moustiques femelles (*anophèles*) dans la transmission de cette maladie (CDC, 2015).

Le paludisme ou la malaria (terme anglo-saxon) est une maladie parasitaire causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Ce protozoaire parasite des globules rouges fait du paludisme une maladie principalement érythrocytaire. Cet agent pathogène est transmis à travers la piqûre des *anophèles* infectés (famille des *culicidae* et sous-famille des *anophelinae*).

1.2 Symptômes

Les personnes atteintes de paludisme éprouvent souvent de la fièvre, des maux de tête, des frissons, des vomissements, des affections pseudo-grippales, des anémies sévères, des acidoses métaboliques et des détresses respiratoires (Miller et *al.*, 2002; CDC, 2015; Pathak et *al.*, 2018). En absence de traitement efficace, ces symptômes peuvent développer des complications graves et entraîner rapidement la mort par des troubles circulatoires (OMS, 2017a et 2018). Il peut aussi avoir des infections asymptomatiques (OMS, 2017a).

1.3 Agent pathogène

Le paludisme humain est causé par cinq espèces de *Plasmodium* ; ce sont *Plasmodium(s) falciparum*, *vivax*, *ovale*, *malariae* et *knowlesi* (Divis et *al.*, 2010; Singh et Daneshvar, 2013; OMS, 2013) dont *P. falciparum* et *P. vivax* sont les plus dangereux (OMS, 2017b). *P. falciparum* est le plus pathogène, le plus dangereux en termes de décès et plus répandu sur le continent africain. Il est responsable d'environ 90 % des décès causés par le paludisme dans le monde. *P. vivax*, prédominant hors d'Afrique, est rarement mortel, mais entraîne des fièvres tous les trois jours et est la principale cause de cas palustres dans une grande partie du monde en co-existence avec *P. falciparum*. Les décès liés à *P. vivax* semblent avoir été sous-estimés ; il aurait entraîné plus de morts que rapporté (Naing et *al.*, 2014). Il constitue avec *P. falciparum* l'agent pathogène de la plupart des infections palustres ou malariques et sont considérés comme les espèces de *Plasmodium* les plus dangereuses (OMS, 2017a).

1.4 Vecteur et transmission

L'anophèle demeure le vecteur de ces parasites. Ainsi, dans la plupart des cas, les différentes espèces de *Plasmodium* sont transmises à l'homme ou à un vertébré par la piquûre d'anophèle infecté (Fig. 1.1) lors d'un repas sanguin pour nourrir leurs œufs. En plus de ce principal vecteur du *Plasmodium* (l'anophèle infecté), l'homme représente l'hôte transitoire. Celui-ci, infecté auparavant par un anophèle, sert de pourvoyeur de *Plasmodium* à un autre anophèle sain pendant son repas sanguin, et qui une fois infecté le transmettra à un autre homme sain. Il n'existe qu'une seule voie de contamination directe entre les humains ; c'est la voie transplacentaire, la transmission par une femme enceinte infectée à son enfant (Nagalo, 2014; OMS, 2017c). En effet, les femmes en grossesse sont beaucoup vulnérables à l'infection au *Plasmodium*. Ceci, du fait que le placenta est le site d'apparition de parasites qui expriment les récepteurs reconnaissant la vascularisation placentaire. Le paludisme durant la grossesse entraîne l'augmentation des risques pour la mère et le fœtus. Cette vulnérabilité accroît également les risques de contamination du fœtus par le *Plasmodium* (McGready et al., 2012; Ataide et al., 2014; Phillips et al., 2017)

La transmission est plus intense aux endroits où les espèces de moustiques ont une durée de vie relativement longue (ce qui permet au parasite d'achever son cycle de développement à l'intérieur du moustique) et piquent plus les êtres humains que les animaux. La longue durée de vie et la forte préférence pour l'homme des espèces africaines d'anophèles expliquent la majorité (90 %) des cas de paludisme en Afrique. La transmission dépend aussi des conditions climatiques qui influenceraient sur l'abondance et la survie des moustiques, tels que le régime des précipitations, la température et l'humidité. À beaucoup d'endroits, la transmission est saisonnière avec un pic pendant ou juste après la saison des pluies (OMS, 2017a).



Fig. 1.1: Un *anophèle albanis* se nourrissant de sang sur un bras humain (Wikipédia, 2018)

1.5 Cycle de vie du *Plasmodium*

Le cycle de vie du *Plasmodium* se déroule par alternance entre le vecteur *anophèle* et l'hôte transitoire humain ou un animal vertébré (Fig. 1.2). Ce cycle comprend deux types de reproduction, une reproduction sexuée et une reproduction asexuée se déroulant respectivement au niveau de l'*anophèle* et au niveau de l'hôte transitoire.

La reproduction asexuée est aussi qualifiée de gamétocytogénèse et se déroule chez l'homme. Elle débute à partir de l'infection du sujet par l'*anophèle* et est subdivisée en deux phases successives, la phase hépatique puis la phase érythrocytaire (Silvie et *al.*, 2003; Chenette, 2017; OMS, 2017c)

Les *Plasmodium*, inoculés à l'homme sous forme de sporozoïtes par le moustique *anophèle*, empruntent la voie de la circulation sanguine puis sont rapidement séquestrés au niveau du foie et infectent les hépatocytes. Cette phase hépatique est aussi appelée phase pré-érythrocytaire. Une seule piqûre d'*anophèle* peut transférer 20-200 sporozoïtes (Itoe et *al.*, 2014; Gomes et *al.*, 2016). Une petite proportion arrive à traverser le système lymphatique par recrutement de macrophages (Amino et *al.*,

2006; Frevert et *al.*, 2006; Aly et *al.*, 2009). Le parcours jusqu'aux hépatocytes est favorisé par l'interaction des protéines majeures à la surface des sporozoïtes, les *circumsporozoite proteins* (CSP) et les *thrombospondin-related anonymous protein*, avec les glycosaminoglycanes (GAG) dans les sinusoides hépatiques (Pradel et *al.*, 2002; Phillips et *al.*, 2017). Une autre voie d'accès aux hépatocytes est par effraction membranaire sans formation de vacuole. Les sporozoïtes migrent à travers plusieurs cellules avant de finalement atteindre un hépatocyte et l'infecter par formation d'une vacuole parasitophore (Mota et *al.*, 2001). Une fois dans les hépatocytes, les sporozoïtes subissent plusieurs divisions nucléaires pendant 2 à 7 jours (selon l'espèce de *Plasmodium*), se différencient en schizontes hépatiques, puis à maturation, ces schizontes s'éclatent et libèrent des mérozoïtes dans la circulation sanguine. Un sporozoïte accédant au foie peut produire de 10000 à 30000 mérozoïtes dans un hépatocyte en 5 à 6 jours. *P. vivax* et *P. ovale* peuvent demeurer dormants dans le foie sous forme d'hypnozoïtes pendant des mois et même des années avant de poursuivre leurs cycles pour la libération de mérozoïtes dans la circulation sanguine (Felger et *al.*, 2012; OMS, 2017c; Phillips et *al.*, 2017).

Les mérozoïtes infectent ensuite les globules rouges aussi par formation de vacuole parasitophore : c'est le début de la phase érythrocytaire. Chaque mérozoïte se multiplie par plusieurs divisions nucléaires successives pour former un schizonte érythrocytaire d'environ 30 mérozoïtes en 48 h pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, 72 h pour *P. malariae* et 24 h pour *P. knowlesi* (White et *al.*, 2014). À maturation, ces schizontes entraînent la rupture de l'érythrocyte et la dissémination des mérozoïtes, ce qui va occasionner l'invasion, l'infection et la lyse d'érythrocytes additionnels, entraînant une nouvelle libération de mérozoïtes et le cycle reprend. À ce stade apparaissent les symptômes du paludisme. À l'intérieur des vacuoles érythrocytaires, certains mérozoïtes se différencient en forme sexuée, les gamétocytes mâle et femelle, qui peuvent être ingérés par un autre *anophèle* lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté. Ainsi commence la reproduction sexuée dans le

moustique. Les gamétocytes (mâle et femelle) fusionnent dans l'intestin du moustique, formant des zygotes diploïdes qui se transformeront en ookinetes, puis en oocytes et en fin en sporozoïtes (Muirhead-Thomson et *al.*, 1954; Bousema et *al.*, 2014). Ces derniers migrent vers la glande salivaire du moustique où ils sont prêts à être injectés à un nouvel hôte (Stone et *al.*, 2013), pour la reprise du cycle mortel, la reproduction asexuée. Le cycle complet de multiplication sexuée nécessite environ 10 à 14 jours selon les espèces de *Plasmodium* (Silvie et *al.*, 2003; White et *al.*, 2014).

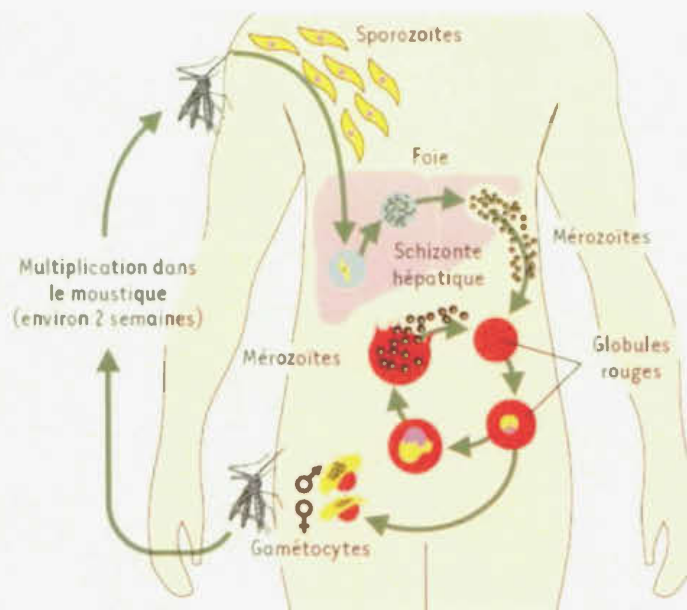


Fig. 1.2: Cycle de vie du *Plasmodium* (Silvie et *al.*, 2003)

1.6 Mécanisme d'action du *Plasmodium*

Au niveau de l'infection au *Plasmodium*, la reproduction asexuée (gamétocytogénèse) en général, et spécifiquement la phase érythrocytaire, est la phase critique. Durant cette phase, les globules rouges de l'hôte sont dégradés par la forme mérozoïte du *Plasmodium* (Dluzewski et *al.*, 2008; Wunderlich et *al.*, 2012). De manière spécifique, il s'agit du catabolisme de l'hémoglobine (Fig. 1.3 et 1.4), qui est utilisée comme

source essentielle de nutriments et d'énergie (Francis et *al.*, 1997; Sigala et *al.*, 2014) et de la biocristallisation de l'hème (Ginsburg, 1999; Wunderlich et *al.*, 2012). L'hydrolyse de l'hémoglobine (Hb), ainsi que la détoxification des sous-produits (hème et l'hématine), sont primordiales pour la survie du parasite dans l'érythrocyte hôte (Liu et *al.*, 2006; Kumar et *al.*, 2007).

L'Hb joue donc un rôle clé dans la croissance et la maturation du *Plasmodium*. Elle sert de réservoir d'acides aminés (AA), d'où l'anémie qui survient lors de la multiplication du *Plasmodium* dans les globules rouges (Bannister et *al.*, 2003; Fivelman et *al.*, 2004; Pathak et *al.*, 2018).

Indépendamment du stade de développement (sporozoïte, schizonte ou mérozoïte), le *Plasmodium* a besoin d'acides aminés pour sa croissance (Divo et *al.*, 1985a). Il s'en procure via l'hémoglobine de l'hôte, après l'avoir dégradé. Pour ses besoins en AA non fournis par l'Hb de son hôte, le *Plasmodium* synthétise *de novo*, en utilisant les AA disponibles comme source d'énergie et comme précurseurs ou comme composants de base pour la biosynthèse (Krauth-Siegel et *al.*, 1996). L'Hb étant une protéine abondante dans l'érythrocyte, elle est la source majeure pourvoyeuse d'AA pour le *Plasmodium*. L'Hb est donc décomposé en peptides, puis en AA dans la vacuole digestive du parasite (Dluzewski et *al.*, 2008; Wunderlich et *al.*, 2012).

En effet, pendant la phase asexuée de son cycle de vie, le parasite du paludisme réside dans les globules rouges de l'hôte. Pour supporter sa croissance et sa réplication, il absorbe de grandes quantités de cytosol érythrocytaire et digère son principal constituant qui est l'hémoglobine (Fig. 1.3), dans un organite spécialisé à cet effet (Bannister et *al.*, 2003; Fivelman et *al.*, 2004). Cet organite est la vacuole digestive (Banerjee et Golberg, 2001; Golberg, 2005). La fonction première de cette vacuole est

la dégradation de l'Hb (Goldberg et *al.*, 1990; Goldberg, 2013). Elle contient alors les enzymes nécessaires à la tâche (Klemba et *al.*, 2004a).

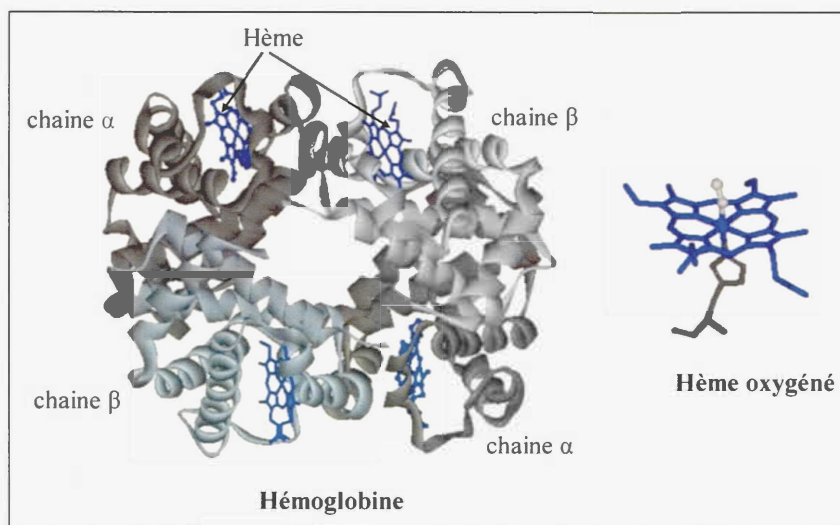


Fig. 1.3: Structure quaternaire de l'hémoglobine (gauche) et de l'hème dans son état oxygéné (droite). À gauche : molécule d'hémoglobine, montrant les quatre sous unités polypeptidiques en forme d'hélice (chaines α et β), identiques deux à deux, avec chacune une molécule d'hème. À droite: molécule d'hème couplée au dioxygène, correspondant à l'état oxygéné de l'hème qui est l'hématine (Scurtu, et *al.*, 2013).

L'hydrolyse de l'Hb dans la vacuole digestive du *Plasmodium* est un processus ordonné et catalysé par une série de protéases, des protéases aspartiques, des protéases à cystéine, des métalloprotéases (Goldberg et *al.*, 1990) et des dipeptidyl aminopeptidase (Klemba et *al.*, 2004b; Dalal et *al.*, 2007); Ce sont respectivement les plasmepsines (incluant *PfAPP*; *P. falciparum* Aspartic signal Peptide Peptidase), les falcipaïnes, les falcilysines et les *PfDPAP* : *Plasmodium falciparum* Dipeptidyl Amino-Peptidase (Fig. 1.4).

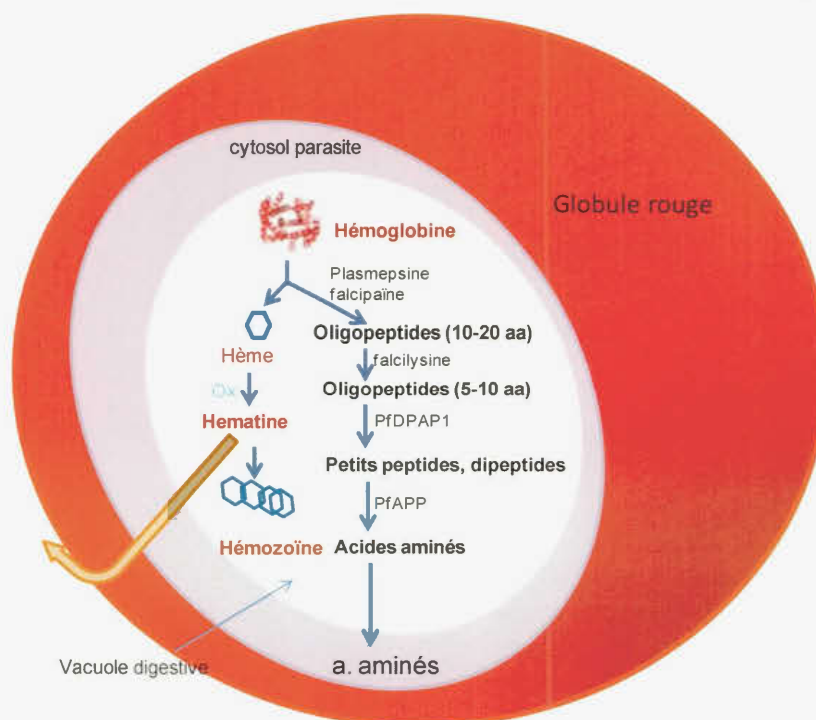


Fig. 1.4: Diagramme de la dégradation de l'hémoglobine et de formation d'hémozoïne par le *Plasmodium*. L'hémoglobine est dégradée en acides aminés et la partie hème (convertie en hématine en présence d'oxygène), toxique pour le parasite est convertie en hémozoïne inoffensive ou excrétée de sa vacuole digestive. Le clivage initial de l'Hb par les plasmepsines et falcipaines en fragments de globine, puis digérées en des oligopeptides peptides de 5-10 AA par les falcilysines. Les dipeptidyl aminopeptidases (*PfDPAP*) libèrent les dipeptides des extrémités N-terminales de cet oligopeptide. Le clivage en AA est assuré par les aminopeptidases. Figure basée sur Anderle et *al.* 1998 ; Wunderlich et *al.* 2012.

Cependant, au cours de cette voie protéolytique, de grandes quantités d'hèmes libres sont aussi générées. Ces molécules peuvent se coupler à l'oxygène pour être sous forme oxygénée, c'est l'hématine. Les sous-produits (hème libre et hématine) sont très toxiques pour les parasites. Ils sont capables de déstabiliser et de rompre les membranes, d'inhiber plusieurs enzymes ou processus enzymatiques et de causer des dommages oxydatifs (Skinner-Adams et *al.*, 2007; Banerjee et *al.*, 2001). Ce qui est un obstacle ou une opposition au développement, à la multiplication, à la réplication et à la survie

du parasite, d'où la nécessité de s'en préserver. Pour ce faire, les parasites les excrètent hors de leur vacuole digestive (Slavic et *al.*, 2016) via des homologues de P-glycoprotéine (Iqbal et *al.*, 2012; Gupta et *al.*, 2017) ou les détachent en les agrégeant en un polymère cristallin inerte et insoluble, l'hémozoin (Slater et *al.*, 1991; Ginsburg, 1999; Wunderlich et *al.*, 2012).

1.7 Impact dans le monde

1.7.1 État actuel

L'épidémiologie du paludisme demeure un véritable problème de santé publique (OMS, 2016 et 2017b). Depuis des décennies, cette maladie est une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde, surtout dans les zones endémiques. Près de la moitié de la population mondiale est exposée au risque de cette maladie (OMS, 2017c). Au niveau mondial, l'incidence du paludisme a baissé de 18 %, mais il continue de ravager les populations avec 63 cas de paludisme pour 1000 habitants exposés au risque de cette maladie en 2016 (OMS, 2017d).

Les pays touchés par le paludisme payent un tribut social (OMS, 2017d) et économique (Banque Mondiale, 2017) extrêmement lourd. Malgré le fort recul des décès liés au paludisme les cinq dernières années (Tableau 1.1), l'incidence reste grande et la malaria reste une des maladies les plus répandues et mortelles du siècle (OMS, 2013-2017). En termes de perte d'année de vie due à l'incapacité, il se classe au 8ème rang (Bremner et *al.*, 2006). C'est un véritable problème de santé mondiale, affectant annuellement des centaines de millions de personnes, avec des centaines de milliers de décès à son actif (OMS, 2017d). Plus précisément, la mortalité liée au paludisme a subi une baisse de 2010 à 2014, puis une hausse en 2015 et 2016 (OMS, 2017d). C'est au moins plus de 210 millions de cas de paludisme par an, occasionnant plus de 430 mille décès chaque année, ce qui fait de lui la maladie parasitaire la plus meurtrière.

Dans les régions où la transmission du paludisme est intense, les enfants de moins de 5 ans risquent tout particulièrement de contracter l'infection, de tomber malades et de mourir ; plus des deux tiers (70%) des décès dus au paludisme surviennent dans cette tranche d'âge, la plupart issus de l'Afrique Sub-Saharienne (OMS, 2015 et 2017d). Le nombre de décès enregistrés chez des enfants de moins de 5 ans a fortement diminué, passant de 440 000 en 2010 à 285 000 en 2016. Toutefois, le paludisme demeure un facteur majeur de mortalité chez ces enfants de moins de cinq ans et un enfant en meurt toutes les deux minutes (OMS, 2017d). Il est la première cause de mortalité infantile en Afrique. Du fait des nombreux décès engendrés, soutenus par la détérioration sévère et récurrente de l'état de santé de la population, le paludisme s'est aussi érigé en un facteur de déstabilisation sociale individuel et collectif (OMS, 2017d, CDC, 2017a). Dans ces pays endémiques, les dépenses imputables au paludisme représenteraient une grande partie des dépenses de santé publique, des admissions hospitalières et des consultations externes (Diallo et *al.*, 2017). Cause majeure d'absentéisme au travail, le paludisme fait perdre au PIB africain 12 milliards de dollars US par an. En plus, en 2016, le financement de la lutte contre le paludisme s'élevait à 2,7 milliards de US \$.

Tableau 1.1: Nombre de cas de paludisme et de décès associés par an, de 2012-2016
Source : rapport annuel OMS, 2013-2017.

Année	Cas de paludisme (millions)	Décès associés (milliers)
2016	216	445
2015	211	446
2014	214	438
2013	198	584
2012	207	627

1.7.2 Zones endémiques

Cette maladie se propage aisément dans les zones, où les moustiques *anophèles* peuvent survivre, se multiplier et où les *Plasmodiums* peuvent compléter leur cycle de croissance chez les moustiques. Ainsi, le paludisme sévit principalement dans les zones tropicales et subtropicales, où les températures sont au-dessus de 20 °C (Fig. 1.5). Ces zones, favorables au développement des espèces palustres de *Plasmodium*, sont les champs de prédilection de celui-ci (OMS, 2015 et 2017d, Kushitor et Boatemaa, 2018). Le paludisme se répartit alors sur presque tous les continents. Cependant, des pays d'Afrique sont sévèrement touchés, ainsi que des pays de l'Amérique latine, une partie de l'Asie et le Moyen-Orient. L'Afrique en général et particulièrement l'Afrique Sub-Saharienne est beaucoup plus atteinte (OMS, 2017d). En 2016, 91 pays étaient confrontés à une transmission continue du paludisme, avec un niveau plus élevé en Afrique. Des Régions OMS de l'Asie du Sud-Est, de l'Amérique latine et du Moyen-Orient et une partie de l'Europe de l'Est sont aussi affectées, mais à un degré moindre (Akinosoglou et *al.*, 2012, OMS, 2017d). Selon le dernier *Rapport sur le paludisme dans le monde* (OMS, 2017d), la région OMS de l'Afrique supporte une partie disproportionnée de la charge mondiale du paludisme. Au niveau mondial (en 2016), 90% des cas de paludisme et 91% de décès associés sont survenus en Afrique. La région Asie du Sud-est suit loin derrière avec 7 % de cas de paludisme et 6 % de décès associés, puis le Moyen-Orient avec 2 % de cas de paludisme.

Dans ces zones endémiques, les nourrissons, les enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes, les personnes porteuses du VIH ou atteintes du sida, les migrants non immunisés, les populations itinérantes et les voyageurs sont plus susceptibles de contracter le paludisme et d'être gravement atteints.

Dès lors, la population mondiale n'est pas épargnée par cette maladie. Face à l'interdépendance croissante des pays, les frontières des nations ne constituent plus de véritable barrière à l'expansion du paludisme. Il se contracterait lors des voyages et des

séjours dans les zones endémiques : il s'agit du paludisme d'importation (Semmani, 2018). Des pays non endémiques enregistrent alors des cas de paludisme importé (Romi et *al.*, 2001; Calderaro et *al.*, 2008 et 2012) : ce sont en grande partie des pays européens, incluant la France, l'Angleterre, l'Italie et l'Allemagne (Cathcart et *al.*, 2010; Askling et *al.*, 2012). Les pays d'Amérique du Nord ne sont toutefois pas exemptés par l'importation de cette maladie (CDC, 2017b). La majorité des cas dans ces pays implique les voyageurs et immigrants revenant d'un séjour dans des pays où la transmission du paludisme a lieu.

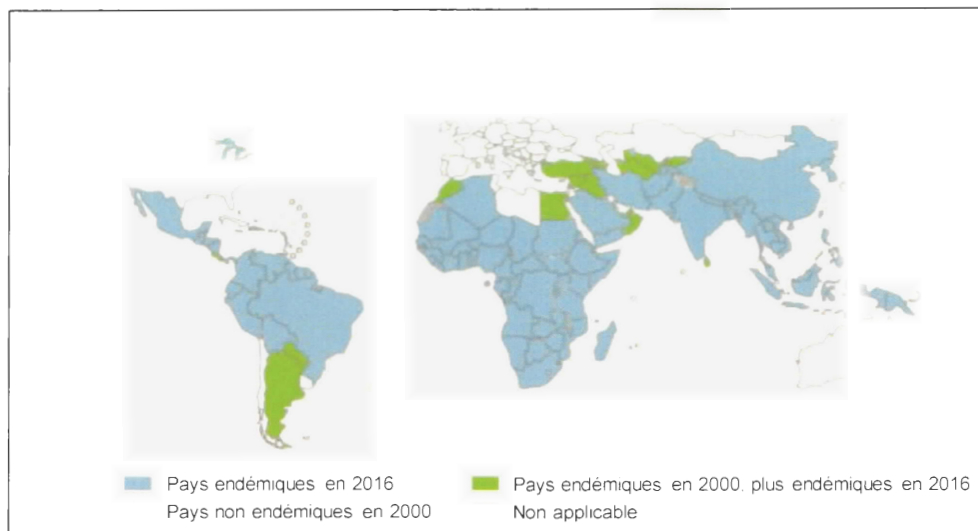


Fig. 1.5: Carte illustrant la distribution du paludisme à travers le monde (CDC, 2017b).

CHAPITRE II

LA LUTTE CONTRE LE PALUDISME

Ce chapitre regroupe les approches de lutte contre le paludisme, qui sont les mesures préventives, la thérapie médicamenteuse et le développement de nouveaux agents antipaludiques

2.1 Mesures préventives

2.1.1 Éradication des moustiques *anophèles*

Depuis la découverte de l'origine du paludisme (1897), l'OMS proposa, pendant sa huitième assemblée en 1955 (Résolution WHA 8.30), l'éradication de son vecteur, le moustique *anophèle* (CDC, 2017c). Dès lors, un grand nombre de nations, autrefois endémique, avait accentué les moyens à cette fin. C'est ainsi que des nations se sont libérés des moustiques anophèles, vecteur du paludisme par la pulvérisation d'insecticides. Ce fut le cas dans la plupart des pays d'Europe, d'Asie centrale (OMS, 2016b) et aux USA où la plus importante transmission se déroulait au sud du pays (CDC, 2012). Cette opération consistait à la pulvérisation de DDT (Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane) à l'intérieur des maisons, des locaux et dans les localités où prévalait le paludisme, occasionnellement au moyen d'aéronefs (Wagle, 1953; Beard, 2006; CDC, 2012). À cette application, s'ajoutaient le drainage et l'enlèvement des sites de reproduction des moustiques. La transmission du paludisme fut progressivement

éliminée dans ces pays, malgré des réapparitions sporadiques. Les transmissions de cas indigènes de paludisme y sont rendues à zéro (CDC, 2017c; OMS, 2016b). Certains autres pays n'ont certes pas encore pu réduire à néant ces moustiques, mais ils ont pu réduire considérablement le taux de transmission. Dans ces pays, la proportion élevée de cas se retrouve parmi les populations migrantes et mobiles vivant dans des zones difficiles d'accès, souvent à proximité des frontières internationales (OMS, 2018b). Cependant, une grande partie du globe se trouve toujours sous l'emprise de moustiques *anophèles*, occasionnant des centaines de millions de nouveaux cas palustres chaque année (OMS, 2017c).

2.1.2 Vaccins contre le paludisme

La voie de l'acquisition de l'immunité contre l'agent pathogène via les vaccins est beaucoup explorée (Mata et *al.*, 2013; OMS, 2016b). Malheureusement, en dépit des nombreuses tentatives (Olugbile et *al.*, 2009; Mata et *al.*, 2013), des décennies de recherches intensives (Deirdre et *al.*, 1987; Alonso et *al.*, 1994; Feng et *al.*, 2018) et d'efforts de développement (Pierce et *al.*, 2010; Coelho et *al.*, 2017), aucun vaccin antipaludique à usage clinique n'est actuellement disponible sur le marché. Cependant, de nombreux projets de vaccins sont en cours d'évaluations à différentes phases d'essais cliniques (Hoffman et *al.*, 2010; Reyes-Sandoval et *al.*, 2010; Agnandji et *al.*, 2015; OMS, 2016b; Sirima et *al.*, 2017; Gbedande et *al.*, 2017). Parmi les différents candidats, le vaccin RTS,S/ AS01 est le plus avancé dans son développement (OMS, 2016b). C'est une protéine recombinante avec un adjuvant visant le *Plasmodium falciparum* au stade pré-érythrocytaire de son cycle de vie. Ce vaccin candidat a pu atteindre la phase clinique 3 des essais cliniques (RTS,S, 2015; OMS, 2017d; Han et *al.*, 2017). Toutefois, il ne protège que les jeunes enfants (5-17 mois) et a une efficacité limitée (30%) contre le *Plasmodium falciparum* (RTS,S 2011 et 2012; Olotu et *al.*, 2013), la forme la plus mortelle du paludisme chez l'homme. Ce vaccin candidat, distribué sous la marque *Mosquirix*, a été autorisé pour un projet pilote de vaccination

en cours depuis 2016, dans des pays de l'Afrique Subsaharienne dont le Ghana, le Kenya et le Malawi (OMS, 2016b).

2.1.3 Répulsion et/ou évitement des moustiques *anophèles*

Dans les zones endémiques, l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide longue durée (MII) et la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent (PID) parviennent à réduire considérablement la transmission du paludisme (OMS, 2017e ; Yang, D et *al.*, 2018; Zawadi et *al.*, 2018). De nos jours, dormir sous une MII est la manière la plus répandue et la plus efficace de prévenir l'infection (OMS, 2017e). La PID, bien qu'étant aussi efficace pour prévenir la transmission du paludisme, sa pratique a remarquablement chuté dans les régions d'Afrique (OMS, 2017e), en partie due au prix et à l'apparition de forme de résistance *d'anophèles* (Blayneh and Mohammed-Awel, 2014; Cheung et *al.*, 2018).

2.2 Thérapie médicamenteuse contre le paludisme

L'objectif premier du traitement est d'obtenir une guérison complète, c'est-à-dire l'élimination rapide et totale des plasmodies dans le sang du patient, pour éviter qu'un paludisme non compliqué n'évolue vers une forme grave potentiellement mortelle ou vers une infection chronique provoquant une anémie (OMS, 2018c). Du point de vue de la santé publique, ce traitement a pour but de réduire la transmission de l'infection en diminuant le réservoir infectieux, et d'éviter l'apparition et la propagation d'une résistance aux antipaludiques (OMS, 2018c).

Les médicaments utilisés contre cette maladie sont regroupés sous les termes d'antipaludique, antipaludéen, antimalarique ou antiplasmodique. Ils ont des effets curatifs contre le paludisme (Daher et *al.*, 2018; Vallone et *al.*, 2018), et/ou des effets préventifs comme des agents prophylactiques et préventifs (Overbosh et *al.*, 2001; Kolifarhood et *al.*, 2017). Jusqu'à présent, la lutte médicamenteuse contre le paludisme

s'est largement appuyée sur un nombre restreint de médicaments chimiquement apparentés et au mode d'action similaire. En se basant sur leurs structure et mode d'action, ces médicaments antipaludiques à usage clinique actuel sont répartis en 4 grandes classes (Tableau 2.1 et Fig. 2.1): les dérivés de quinoléines, les antifolates, les dérivés d'Artémisinine et les antimicrobiens (Foye et *al.*, 2008; Schlitzer, 2008; Mishra et *al.*, 2017). Utilisés en monothérapie, les dérivés d'Artémisinine traitent plus rapidement et plus efficacement le paludisme que les autres classes d'antipaludiques (Hien et White, 1993). Toutefois, aucun antipaludique (seul) n'est capable d'éliminer toutes les souches de parasites du paludisme. Ainsi, pour lutter efficacement contre cette infection, une ou plusieurs combinaisons de ces médicaments sont souvent administrées par traitement (Nakato et *al.*, 2007; Davlantes et *al.*, 2018), lequel dépend de la localisation géographique de l'infection, des espèces de *Plasmodium* les plus probables et de la gravité de la maladie (OMS, 2013, 2017b, 2018f; Blasco et *al.*, 2017).

2.2.1 Dérivés de quinoléine

Au niveau structural, ce sont des arylamino-alcools regroupant Quinine, Méfloquine, Halofantrine, Luméfantrine, Chloroquine, Amodiaquine, Piperaquine et Primaquine (Fig. 2.1). Cette classe d'antipaludiques cible le *Plasmodium* au stade érythrocytaire de son cycle de vie. Ce sont des schizonticides érythrocytaires et/ou gamétocytocides.

Les éléments de la classe des antipaludiques dérivés de quinoléine ont pour origine la quinine (4-methanol quinoléine), elle-même isolée premièrement de l'arbre *Cinchona*, en 1820 (Pelletier and Caventou.,1820) et sa première synthèse eu lieu en 1944 (Woodward and Doering, 1944; Greenwood, 1992).

Avec une demi-vie d'environ 12 h, la quinine agit rapidement en ciblant toutes les espèces de *Plasmodium* au stade érythrocytaire. Elle est disponible en préparation orale et injectable. Ainsi, la quinine demeure un médicament de référence pour le traitement du paludisme sévère dans tous les groupes d'âge, du paludisme non compliqué chez

les femmes enceintes et pour le paludisme résistant à plusieurs médicaments (Achan et *al.*, 2011). Elle est souvent associée à des antipaludiques de la classe des antibiotiques (Miller et *al.*, 2006).

Actuellement, la quinine est utilisée comme médicament de seconde ligne dans le traitement de cas sévères de paludisme, ou est associée à des antipaludiques de la classe des antibiotiques pour traiter le paludisme persistant (WHO, 2015).

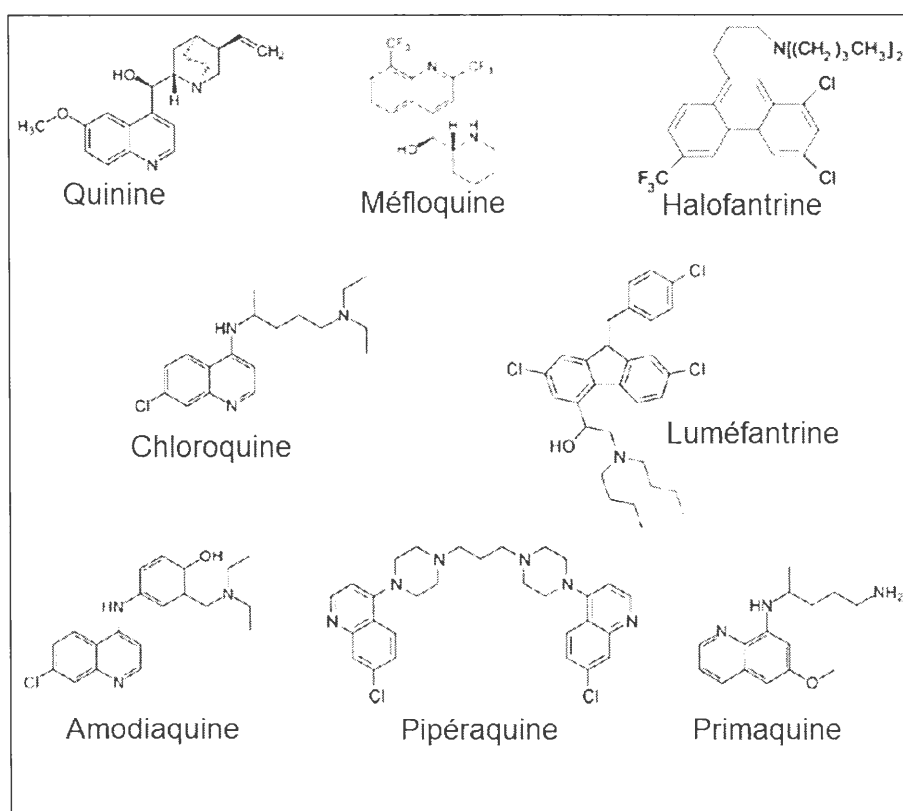


Fig. 2.1: Structures chimiques des dérivés de quinoléine

La Méfloquine est une quinoléine synthétique dérivé de la quinine, utilisée comme antipaludique de traitement et comme prophylaxie dans la plupart des régions exposées au paludisme résistant à plusieurs médicaments (Faye et *al.*, 2010; Schlagenhauf et *al.*,

2011). Elle a un profil pharmacocinétique avec une longue demi-vie plasmatique humaine de 14-18 jours (Harinasuta et *al.*, 1983). L'émergence de résistance et les effets secondaires neuropsychiatriques associés ont limité son utilisation en un partenaire médicamenteux dans une association avec les dérivés d'Artémisinine (WHO, 2015).

La Luméfantrine (quinoléine) est un autre dérivé synthétique de la quinine souvent combiné avec un dérivé d'Artémisinine pour traiter différentes souches de paludisme non compliqué par son action contre le *Plasmodium*, y compris *P. falciparum* et des espèces de *Plasmodium* inconnues, au stade érythrocytaire (Kuhlmann et Fleckenstein, 2017; Drugbank, 2018).

L'Halofantrine est dérivé du 4-methanol-quinoléine, efficace contre les souches de *Plasmodium* résistant à plusieurs médicaments et spécialement utilisée dans les régions où sévit le paludisme à *P. falciparum* résistant à de multiples médicaments (Ter Kuile et *al.*, 1993; Karbwang et Bangchang, 1994). Cet agent thérapeutique est efficace contre les souches de *Plasmodium* résistantes à la chloroquine, à la quinine et à d'autres antipaludiques (Schmidt et *al.*, 1972; Karbwang et Bangchang, 1994) et était considéré comme sans danger jusqu'à la découverte de sa cardiotoxicité (Ter Kuile et *al.*, 1993) en 1993.

Les quinoléines (Chloroquine, Amodiaquine et Pipéraquine) agissent comme des schizonticides et gamétocytocides au stade érythrocytaire du *Plasmodium* pour prévenir la polymérisation de l'hémozoïne (Sullivan et *al.*, 1996; Combrinck et *al.*, 2013).

Tableau 2.1 : Antipaludiques disponibles et leur mode d'action (Foye et al., 2008; Schlitzer 2008; Mashra et al., 2017)

Classes	Catégories	Médicaments	Modes d'action
Dérivés de quinine (Arylamino-alcools)	4-méthanol-quinoléine	Quinine Méfloquine Halofantrine Luméfántrine	Inhibition de la détoxification de l'hème (empêche sa dimérisation par le <i>Plasmodium</i>). Accumulation dans la vacuole digestive du parasite et formation de complexe avec l'hème, empêchant sa cristallisation. L'activité de l'hème polymérase est inhibée, entraînant une accumulation de l'hème libre qui est cytotoxique pour le <i>Plasmodium</i> (Schlesinger et al., 1988; Sullivan, 2017).
	4-amino-quinoléine	Chloroquine Amodiaquine Piperaquine	
	8-amino-quinoléine	Primaquine	
Antifolates	Combinaisons Naphthoquinone; combinaison d'antagonistes de folates	Pyriméthamine /sulfadoxine Atovaquone /Proguanil	Agissent comme des inhibiteurs compétitifs de substrats naturels. Les antagonistes des folates ciblent l'activité de la dihydrofolate réductase (DHFR) de la protéine DHFR-thymidylate synthétase (TS) du parasite, alors que les sulfamides agissent sur l'activité dihydroptéroate synthétase (DHPS) de la protéine hydroxyméthylpterine pyrophosphokinase (HPPK)-DHPS (Warhurst, 1986; Aubouy et al., 2003).
Dérivés d'artémisinine	Lactones sesquiterpéniques à endoperoxydes	Artémisinine, Artéether Artéméthér, Artesunate, Dihydro-artémisinine	Interaction de l'endopéroxyde avec le fer hémique dans la vacuole digestive du parasite, générant des radicaux libres d'oxygène, qui agissent sélectivement sur des protéines membranaires, provoquent la peroxydation des lipides, endommagent le réticulum endoplasmique, inhibent la synthèse des protéines et entraîne finalement la lyse du parasite (O'Neill et al., 2010).
Antibactériens		Tetracycline, Doxycycline Clindamycine , Azithromycine	Activité antiparasitaire de ces agents se produit en agissant contre les ribosomes dans la mitochondrie du parasite (Geary et al., 1983; Divo et al.,1985b; Yeo et al., 1992)

La Chloroquine, une 4-aminoquinoléine synthétique, dérivée de la quinine, était le médicament historique de choix pour le traitement du paludisme non sévère et pour la prévention de la maladie chez les voyageurs (IOM, 2004 ; Seifu et *al.*, 2017, OMS 2018c). Ce médicament est de plus en plus délaissé en raison de l'accroissement des souches de résistance (Ursos and Roepe, 2002 ; Bijker et *al.*, 2013).

L'Amodiaquine, un antipaludique puissant, étroitement lié à la Chloroquine est tombé en disgrâce en raison de son hépatotoxicité (Nheftel et *al.*, 1986), mais a été réévaluée comme un médicament partenaire des dérivés d'Artémisinine pour le traitement de l'accès palustre (Sirima and Gansané, 2007; Pilar et *al.*, 2013; Grigg et *al.*, 2016).

La Pipéraquine est un autre dérivé de la Chloroquine ; elle est actuellement utilisée en combinaison avec des dérivés de l'Artémisinine pour traiter le paludisme non compliqué et comme médicament de seconde ligne pour les cas sévères (McManus et *al.*, 2016; Poespoprodjo et *al.*, 2018).

La Primaquine est une quinoléine avec une demi-vie de 6 h, utilisée en monothérapie depuis les années 1950 contre les formes hypnozoïtes (dormants) de *P. vivax* et *P. ovale* (John et *al.*, 2012; Dalvantes et *al.*, 2017;) et utilisée comme gamétocytocide par son action efficace et rapide sur les gamétocytes matures en réduisant leur transmissibilité à d'autres *anophèles* (Eziefula et *al.*, 2014; Gonzalez-Ceron et *al.*, 2015). Elle est de même efficace lorsqu'elle est utilisée pour la prophylaxie (Baird et *al.*, 1995). Actuellement, la Primaquine est le seul médicament autorisé pour prévenir les rechutes.

2.2.2 Antifolates

Les antifolates à visée antipaludique (Pyriméthamine, Proguanil, sulfadoxine, Atovaquone) sont des schizonticides érythrocytaires et tissulaires. La Pyriméthamine et le proguanil sont de la catégorie des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (DHFR)

et les deux autres inhibent la dihydroptéroate synthase (DHPS) du parasite, empêchant son développement (Warhurst, 1986; Aubouy et al., 2003).

2.2.3 Dérivés d'Artémisinine

L'Artémisinine (Arte), isolé de la plante *Artemisia annua* (Hsu, 2006 ; White, 2008), et ses dérivés synthétiques (Dihydro Artémisinine, Artééther, Arteméther, Artesunate) sont des lactones sesquiterpéniques (Fig. 2.2) caractérisées par un endoperoxyde requis pour son activité antiplasmodiale (Krishna et al., 2004; Tilley et al., 2016). L'Arte est activée après la dégradation de l'hémoglobine avec la libération de l'hème dans la vacuole digestive du parasite. Le fer contenu dans l'hème est capable de cliver les ponts endoperoxydes; cette interaction avec l'ion Fe^{2+} donne des radicaux libres (Klonis et al., 2011 et 2013). Ceux-ci provoquent un blocage de la réplication de l'ADN et donc de la synthèse de protéines, ainsi que la rupture des membranes par alkylation des protéines parasites (Robert et al, 2005; Antoine et al., 2014; Hartwig et al 2009).

L'Artémisinine et ses dérivés sont des schizonticides (hépatiques et érythrocytaires) et des gamétocytocides érythrocytaires. Ces composés ont la capacité de réduire rapidement la parasitémie et la fièvre due au paludisme. Grâce à leur action rapide et leur efficacité contre tous les stades du *Plasmodium* à ses différentes phases (hépatique et érythrocytaire), leur introduction (depuis 1970) et leur mise en œuvre plus large dans la médication contre le paludisme a permis de sauver des millions de vies ; ce qui a été possible notamment grâce au travail de Nicholas White et de ses collègues (Hien and White, 1993; White et Olhano, 1996; White et al., 2015 et 1999), ainsi qu'à la majeure contribution de Tu Youyou qui lui a valu le prix Nobel 2015 en Médecine (Su et Miller, 2015).

L'Artééther, l'Arteméther, l'Artesunate et la Dihydro-Artémisinine sont des dérivés de synthèse de l'Artémisinine (Paddon et al., 2013; Szychowski et al., 2014; Konstat-Korzenny et al., 2018). L'Artééther et l'Arteméther sont des éthers solubles en milieu aqueux, permettant leur injection ou leur administration par voie rectale (Barnes et al.,

2004), tandis que l'Artésunate est un ester semi-succinate injectable par voie intraveineuse. Ces composés (Artéether, l'Artémether et l'Artésunate) sont des prodrogues ou promédicaments de la dihydro-Artémisinine, qui est le médicament actif (Ridley, 2002).

À l'exception des antipaludiques disponibles, l'Artémisinine et ses dérivés sont très efficaces pour éliminer la majorité des parasites au stade asexué, allant des anneaux de taille moyenne aux schizontes précoces (Xie et *al.*, 2016), y compris les trophozoïtes dans lesquels le catabolisme de l'hémoglobine atteint son pic (Klonis et *al.*, 2013) ; ils produisent également les réponses thérapeutiques les plus rapides en accélérant la clairance des parasites (Ter kuile et *al.*, 1993). Cette classe d'antipaludique est encore efficace contre toutes les formes de *Plasmodium*, mais utilisées en monothérapie, il y a une apparition de plus en plus récurrente des formes de résistance (Taylor and White 2004 ; OMS, 2005; Shanks, 2006) en raison de son élimination rapide avec une demi-vie d'environ 2 heures (Gordi et *al.*, 2002); des résistances ont été observées aux abords de la Thaïlande et du Cambodge (Dondorp et *al.*, 2009; Leang et *al.*, 2015).

Combinés avec d'autres médicaments antipaludiques, l'Artémisinine et ses dérivés constituent, de nos jours, la base du traitement contre le paludisme, surtout du paludisme à *falciparum*, la forme la plus mortelle (OMS, 2018d; Ballard et *al.*, 2018 ; Dalvantes et *al.*, 2018; Sugiarto et *al.*, 2018).

2.2.4 Antibactériens

Un nombre élevé d'antibactériens comme l'azithromycine, la clindamycine, la tétracycline et son dérivé synthétique la doxycycline ont aussi une activité antiplasmodiale (WHO, 2015; Tan et *al.*, 2011). Pour une meilleure efficacité, ils sont utilisés en combinaison avec d'autres agents antipaludiques pour le traitement du paludisme (Lalloo et *al.*, 2016; Obonyo et Juma, 2012). Ainsi, ils sont couramment

associés à la quinine ou à l'Artémisinine ou à un de ses dérivés pour des traitements prophylactiques (phase hépatique) et curatifs (phase érythrocytaire) du paludisme (WHO, 2015; Gaillard, et al., 2016).

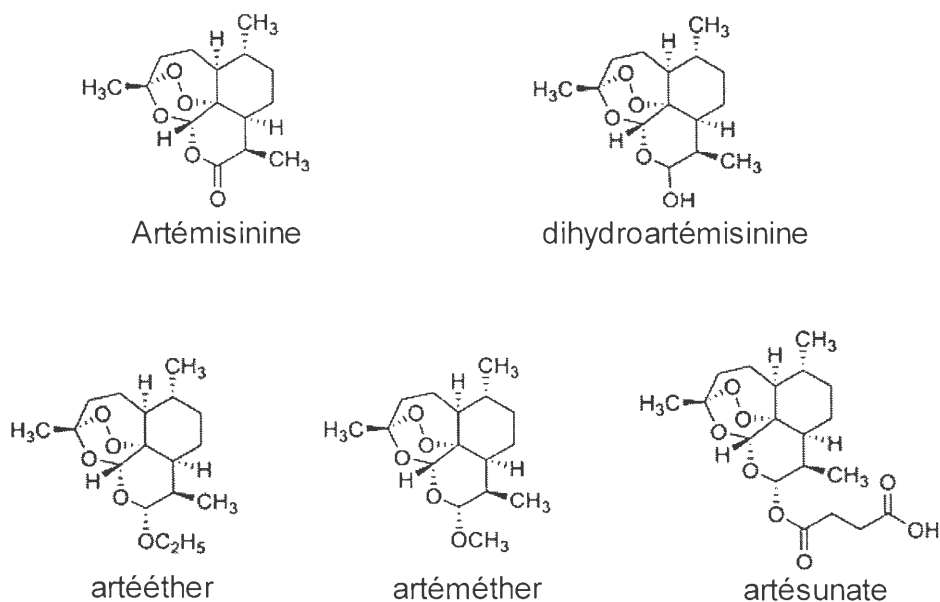


Fig. 2.2: Structures chimiques de l'Artémisinine et ses dérivés bioactifs

2.2.5 Chimiorésistance du *Plasmodium*

Malgré les efforts et investissements pour la recherche et le développement d'antipaludiques efficaces, le paludisme continue d'endeuiller des centaines de milliers de familles par an (OMS, 2018a). Ce fait est principalement dû à la résistance du *Plasmodium* à la plupart des antipaludiques, dépendamment des régions. Cette résistance est définie comme étant l'habilité de la souche parasitique de survivre et/ou de se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un médicament donné en des doses égales ou supérieures à celles communément recommandées, mais dans le seuil de tolérance du sujet (OMS, 2017f).

Trois des 5 espèces de *Plasmodium* ont développé des résistances à un grand nombre d'antipaludiques (Tableau 2.2). La résistance de ces parasites (*P. falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae*) entraîne leur élimination tardive ou incomplète chez l'impaludé traité aux antipaludiques. Cependant, la résistance du *Plasmodium*, surtout de *P. falciparum* aux antipaludiques est plus accrue et plus rapide face à la chloroquine (Zhou et *al.*, 2016; Haldar et *al.*, 2018). Cette résistance est amoindrie ou neutralisée lorsque le traitement est une combinaison d'antipaludiques et encore mieux lorsqu'un antipaludique de la classe des dérivés d'Artémisinine y est impliqué (Zhou et *al.*, 2016).

Tableau 2.2: Chimiorésistance à des antipaludiques (WHO, 2003)

Antipaludiques	Année d'introduction	Résistance (1 ^{er} cas)
Quinine	1632	1910
Chloroquine	1945	1957
Proguanil	1948	1957
Sulfadoxine-Pyriméthamine	1967	1967
Méfloquine	1977	1982
Atovaquone	1996	1996

Le problème de la résistance aux médicaments antipaludiques est la résistance croisée, le fait que la résistance à un médicament rende le parasite résistant à d'autres médicaments de la même famille chimique ou ayant un mode d'action comparable (Rojas-Rivero et *al.*, 1992). Ainsi, des résistances ont déjà été développées à toutes les classes d'antipaludiques, excepté l'Artémisinine et ses dérivés où seulement de mineures résistances avaient été observées au Cambodge lorsqu'ils étaient utilisés en monothérapie (Noedl et *al.*, 2008; Dondorp et *al.*, 2009). En effet, dans cette région, chez certaines personnes infectées par *P. falciparum*, le taux de clairance s'était étendu à 5 h au lieu de 1-3 h comme dans les autres régions. Les causes de ces résistances sont

multiples; ce sont entre autres la mutation de certains gènes au niveau des parasites (Plowe, 2003; Akhoun et al., 2014), le polymorphisme de gènes ou de transporteurs (Cowman et al., 1994; Valderramos et al., 2006), et/ou l'efflux des antipaludiques par des homologues de la P-glycoprotéine au niveau du parasite (Reed et al., 2000; Veiga et al., 2017). De nombreux cas de résistance sont essentiellement dus à la mutation des gènes codants pour les protéines transporteurs comme le *PfCRT* (*P. falciparum* *Chloroquine resistance transporters*), le *PfMDR1* (*P. falciparum* *multidrug resistance transporter 1*) et le *PfNHE1* (*P. falciparum* *sodium/proton exchanger 1*) (Gama et al., 2011; Anthony et al., 2016). Les transporteurs type P-glycoprotéines sont des transporteurs ABC (transporteur ATP dépendant) qui pompent les xénobiotiques hors du cytosol (Anderson et al., 2005; Andrianantoanirina et al., 2010), rendant ainsi les antipaludiques non létaux pour le parasite. Quatre protéines transporteuses ABC ont été identifiées chez *P. falciparum* ; ce sont *Pfmdr1* (Rohrbach et al., 2006; Von Seidlein et al., 1997), *Pfmdr2* (Wilson et al., 1989), *Pfmrp* (*Plasmodium falciparum* *multidrug resistance-associated protein*) (Raj et al., 2009) et les protéines à cassette ATP dépendant *PfGCN20* et *PfA0590W* (Bozdech et al., 1998) qui sont des *multidrug resistance-associated protein 1* (MRP1). La résistance à la chloroquine et aux autres arylamino alcools dans le paludisme à *P. falciparum* provient de l'amplification (duplication) du gène de *Pfmdr* (*P. falciparum* *multidrug resistance*), qui code pour la protéine *Pfh1* (*P. falciparum* *haplotype 1*), un homologue de la P-glycoprotéine (Price et al., 2004; Sanchez et al., 2010), une pompe d'efflux ATP dépendant des xénobiotiques, localisée dans la vacuole digestive du parasite. Cette résistance est aussi liée à la mutation du gène du *Pfmdr*, codant pour les transporteurs *PfRCT* (Plowe, 2003 ; Akhoun et al., 2014). Avec les antifolates, la résistance de *P. vivax* et *P. falciparum* résulte de l'acquisition séquentielle de mutation dans le gène codant pour le *dhfr*, le *dihydrofolate reductase* (Plowe, 2003). Les mutations confèrent aux protéines transporteuses la capacité d'évacuer les médicaments de la vacuole digestive

intracellulaire qui est le site d'action de certains médicaments antipaludiques (Ecker et *al.*, 2012) et altèrent les sensibilités aux médicaments (Pulcini et *al.*, 2015).

Plusieurs facteurs, dont le nombre de parasites exposés au médicament, la concentration du médicament à laquelle le parasite est exposé, la non-conformité d'observance du régime thérapeutique influencent la propagation des souches de *Plasmodium* résistantes aux antipaludiques (Stepniewska and White, 2008; OMS, 2017f).

2.2.6 Recommandation de l'OMS pour le traitement contre le paludisme

Afin d'éviter l'acquisition de résistance des espèces de *Plasmodium* aux médicaments antipaludiques encore efficaces contre ces parasites, l'OMS recommande l'utilisation de Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) au détriment de toutes monothérapies orales dont leur utilisation accélérerait le développement de la résistance des parasites (OMS, 2010b, 2018f).

L'OMS recommande de retirer du marché la monothérapie orale à base d'Artémisinine, car son utilisation accélère le développement de la résistance des parasites (OMS, 2010b, 2018f). La CTA consiste à formuler des antipaludiques en forme de dosage oral contenant un antipaludique dérivé d'Artémisinine et un autre antipaludique partenaire avec une mode d'action différent (Nosten et Brasseur, 2002). Dans cette association, le dérivé d'Artémisinine a pour mission de débarrasser rapidement la plupart des parasites et l'antipaludique associé devra agir plus longtemps afin d'éliminer les parasites restants et limiter leur résistance à l'Artémisinine (Nosten et White, 2007), unique molécule encore efficace contre toutes les formes de *Plasmodium* et à différent stade de leur cycle de vie. Les formulations basées sur des combinaisons à dose fixe sont privilégiées et recommandées par rapport aux associations de médicaments sous un même blister (co-emballés) ou en vrac, en raison de l'avantage à la bonne

observance du traitement par le patient et de la réduction du risque de prendre des médicaments en monothérapie, ce qui contribue fortement à la propagation de la résistance.

Les CTAs sont donc actuellement les formes antipaludiques de première ligne surtout contre *P. falciparum*. Une des principales priorités de santé publique mondiale actuelle consiste à protéger l'efficacité des CTA. Les combinaisons des autres antipaludiques ne sont utilisées que dans les régions sans résistance à celles-ci. En cas de résistances, elles sont relayées en deuxième ligne du traitement après les CTAs qui ne sont toutefois pas faciles à co-formuler et à fabriquer.

2.2.7 Antipaludiques actuels

Les médicaments antipaludiques, principalement les CTAs sont les outils clés pour le contrôle et l'élimination du paludisme. Ils ont probablement contribué en partie aux récentes diminutions du taux de mortalité lié au paludisme (OMS, 2015-2018d). Ce sont actuellement, les antipaludiques les plus efficaces dont 6 sont largement déployés (Tableau 2.3) pour le traitement du paludisme (Blasco et *al.*, 2017; OMS, 2018d). Toutes ces combinaisons sont thérapeutiquement indiquées pour le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* ou *P. vivax* et l'artésunate est recommandé pour le traitement du paludisme sévère (White et *al.*, 2014; OMS, 2018d).

Tableau 2.3 : Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine déployées pour leur utilisation clinique (Blasco et *al.*, 2017; OMS, 2018c).

CTAs	Utilisation géographique
Artéméther + luméfantrine	Largement utilisé en Afrique
Artésunate + amodiaquine	Largement utilisé en Afrique de l'ouest
Dihydroartémisinine + pipéraquine	1 ^{ère} ligne en Asie du Sud-Est
Artésunate + méfloquine	Asie du Sud-Est, Afrique
Artésunate + sulfadoxine-pyriméthamine	Inde, Moyen-Orient et Afrique australe
Artésunate + pyronaridine	Largement utilisé en Asie du Sud-Est

2.3 Développement de nouveaux agents antipaludiques : L'extrait de *Peschiera fuchsiaefolia*

Face au nombre restreint d'antipaludiques encore efficaces et exempts de favoriser ou d'amplifier la résistance des souches de *Plasmodium* (Blasco et *al.*, 2017; OMS, 2018d), les tentatives d'amélioration des médicaments existants, l'exploration de nouvelles molécules et la formulation d'antipaludiques en CTAs deviennent des nécessités.

Au nombre des nouvelles molécules convoitées et exploitées pour le traitement du paludisme, figure l'extrait de la *Peschiera fuchsiaefolia* (Federici et *al.*, 2000; Meschini et *al.*, 2007), dont le développement et la formulation pour une action plus efficace contre le paludisme sont en cours.

2.3.1 Origine botanique

L'extrait de *Peschiera fuchsiaefolia* provient de l'écorce de la plante de la famille des *Apocynaceae* portant le même nom (*Peschiera fuchsiaefolia*). Cette plante pourrait avoir les synonymes de *Peschiera hndii*, *P. granulosa*, *P. solandri*, *Tabernaemontana fuchsiaefolia*, *T. hystri*, *T. hndii*, *T. collina*, *T. gaudichaudi*, *T. gracilis* et de *T. bracteolaris* (Leeuwenberg, 1994). Aussi connue sous le nom de « *leitera* », cette plante lactifère est aisément cultivée dans les pâturages des états de Sao Paulo et de Parana au Brésil, où elle revêt d'une grande importance (Correa et *al.*, 1984; Lorenzi, 1998). Toutefois, diverses espèces sont disséminées dans les zones tropicales et subtropicales; c'est environ 43 espèces d'*Apocynaceae* qui sont distribuées à travers l'Afrique, l'Amérique centrale, la Chine et à travers l'Asie du Sud-Est et du Pacifique.

2.3.2 Composition

L'extrait de *Peschiera fuchsiaefolia* est essentiellement composé d'alcaloïdes indoliques, principalement d'alcaloïdes bisindoliques dont une quinzaine ont déjà été identifiées (Zocoler et *al.*, 2005) ; ce sont majoritairement la voacamine, la voacamidine, l'affinisine, la tabernamine, la coronaridine et la voacangine (Fig. 2.3).

2.3.3 Activité biologique et propriétés thérapeutiques

L'extrait de *Peschiera fuchsiaefolia* s'est avéré posséder différentes activités biologiques à vertus thérapeutiques. Il a une bonne activité contre les souches résistantes de *Plasmodium*, principalement de *P. falciparum* responsable de la plupart des cas sévères de paludisme (Frederich et *al.*, 2008; Chowdhury et *al.*, 2017). Cette activité antiplasmodiale est attribuée à ses composants alcaloïdes bisindoliques, particulièrement à la voacamine et probablement à l'action commutative avec un ou d'autres alcaloïdes indoliques (Federici et *al.*, 2000; Frederich et *al.*, 2008) comme la voacamidine, l'affinisine et la tabernamine contenus dans l'extrait. Il agit contre le *Plasmodium* aux deux phases de son cycle de vie, la phase hépatique et la phase

érythrocytaire (Ramanitahasimbola et *al.*, 2001). Une préparation phytothérapeutique en forme de dosage monolithique contenant l'extrait de *Peschiera fuchsiaefolia* était utilisée dans plus de 13 pays d'Afrique et dans les Caraïbes, sous les noms *MMH Malarex* et *MMH 18*, contre le paludisme (Stella et Cissé, 2007; Condello et *al.*, 2014). Au Brésil, l'extrait de *Peschiera fuchsiaefolia* est communément utilisé dans les états de Sao Paulo et du Parana pour le traitement traditionnel du paludisme (Ramanitahasimbola et *al.*, 2001; Zocoler et *al.*, 2005), sans aucune toxicité révélée.

La voacamine, un des composants de cet extrait, s'est montrée comme un inhibiteur compétitif de la P-glycoprotéine (Meschini et *al.*, 2003, 2005; Chowdhury et *al.*, 2017), pompe à cassette ABC souvent responsable de l'apparition de résistance aux médicaments. Elle induit une augmentation significative de la rétention des médicaments. Cette action de la voacamine améliore l'efficacité de traitement des infections protégées par l'expression de pompe d'efflux des xénobiotiques telle que la P-glycoprotéine ou un de ses analogues. Outre le *Plasmodium*, cette molécule est aussi efficace contre d'autres protozoaires, notamment les *Leishmanias donovani* et *amazonensis*, ainsi que le *Trypanosoma cruzi* (Chowdhury et *al.*, 2017).

2.3.4 Mécanisme d'action

Comme mécanisme d'action, la *Peschiera fuchsiaefolia* (avec ses composantes: la voacamine et les autres alcaloïdes indoliques) agit par alkylation. Elles bloquent l'expression et la synthèse des protéines et la réplication de l'ADN des parasites (Federici et *al.*, 2000; Meschini et *al.*, 2003). Son action au niveau du paludisme empêche la détoxification de l'hème libre et/ou de l'hématine, toxiques pour le *Plasmodium* (Federici et *al.*, 2000; Meschini et *al.*, 2003).

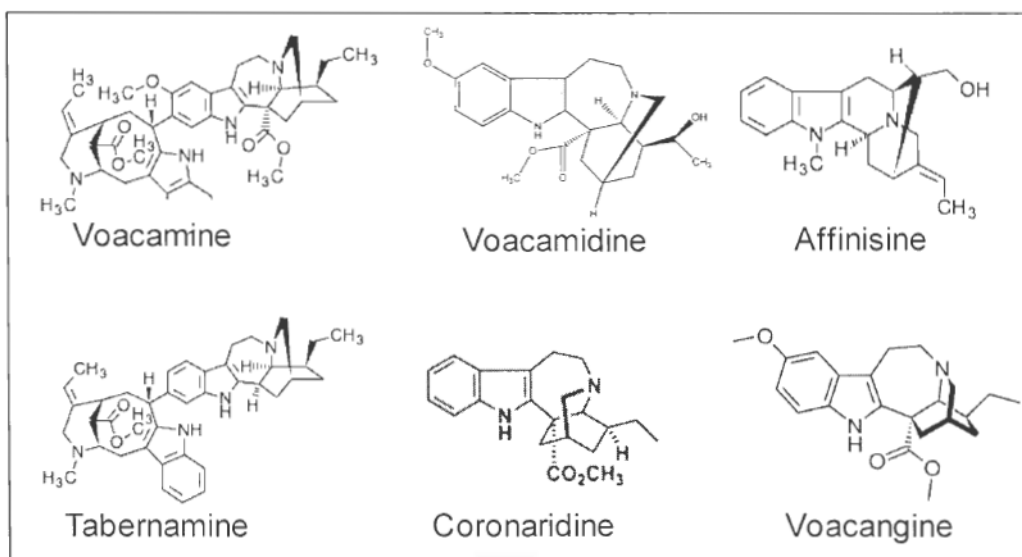


Fig. 2.3: Structures des alcaloïdes de l'extrait de la *Peschiera fuchsiaefolia*

CHAPITRE III

LE STRESS OXYDATIF : AMI ET ENNEMI

Dans ce chapitre, le stress oxydatif, les agents prooxydants (à l'origine du stress oxydatif) et les mécanismes de défense de l'organisme (agents antioxydants) sont traités. Leurs effets sur l'organisme et les modalités d'évaluer l'action antioxydante ont aussi été revus.

3.1 Stress oxydatif

En effet, le métabolisme aérobie a pour conséquence la formation d'espèces réactives d'oxygène et d'azote, collectivement appelées espèces réactives d'oxygène et d'azote (Klaunig et Kamendulis, 2004; Forester et *al.*, 2018). Le déséquilibre entre la production de ces espèces réactives et les mécanismes de défense antioxydante conduit à un stress oxydatif ou stress oxydant, pouvant entraîner des altérations moléculaires et cellulaires. Cet état est dû, soit à une défense antioxydante défaillante, soit à un état pro-oxydatif accru et provoque des effets délétères (Biesalski, 1997). Les lipides et l'ADN sont particulièrement sensibles à l'action de ces espèces réactives d'oxygène et d'azote, des agents hautement pro-oxydants (Goudable et Favier, 1997). Le stress oxydatif est associé à de nombreuses pathologies humaines (Gutteridge et Halliwell, 1993; Lehucher-Michel et *al.*, 2001). Entre autres, il est impliqué dans des maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications dans l'évolution (Favier, 2008; Lakhdar et *al.*, 2012). En faisant apparaître des molécules biologiques anormales

et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant pourrait être la principale cause initiale de plusieurs maladies (cancer, cataracte, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré). Les radicaux libres intervenant dans l'activation des procarcinogènes en carcinogènes, créent les lésions de l'ADN, amplifient les signaux de prolifération et inhibent des gènes suppresseurs de tumeur comme le p53 (Favier, 2008). Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles (diabète, maladie d'Alzheimer, rhumatisme, maladies cardiovasculaires) et est impliqué dans l'étiologie de nombreuses autres maladies, telles que le vieillissement, le cancer, l'athérosclérose, les maladies coronariennes, l'asthme et la rhinite (Barnham et *al.*, 2004; Finkel et Holbrook, 2000; Montagnier et *al.*, 1998). Les agents pro-oxydants à la base du stress oxydatif sont aussi nombreux que variés (Devasagayam et *al.*, 2004).

3.2 Agents pro-oxydants

Les agents dits espèces réactives d'azote sont tous des espèces réactives d'oxygène (contenant au moins un atome d'oxygène); c'est alors qu'elles sont incluses dans l'appellation d'espèces réactives d'oxygène (Squadrito et Pryor, 1998; Koppenol, 1998). Ces divers agents pro-oxydants (Halliwell, 2007; Devasagayam et *al.*, 2004) peuvent être classifiés en deux groupes, les espèces radicalaires et non radicalaires (Tableau 3.1). Chaque espèce a des actions spécifiques et peut jouer multiples rôles dans les systèmes biologiques, soit par des actions bénéfiques ou nuisibles dépendamment du site de production, de la cible biologique et de la concentration locale (Valko, 2004).

3.2.1 Les espèces radicalaires

Le groupe des radicaux, souvent appelé radicaux libres, rassemble l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ($\text{HO}^\bullet$), les radicaux peroxy ($\text{ROO}^\bullet$) et alcoxy ($\text{RO}^\bullet$) et

l'oxyde nitrique ($\text{NO}^\bullet$) comme montrés dans le Tableau 3.1 (Halliwell et Gutteridge, 2015 et 1999; Halliwell, 2007; Rice-Evans et Burdon, 1994). Ces espèces sont dites radicalaires, car elles possèdent au moins un électron non apparié autour du noyau et sont capables d'exister indépendamment, mais avec de courtes demi-vies et une haute réactivité (Halliwell et Gutteridge, 1999; Rice-Evans et Burdon, 1994).

Tableau 3.1: L'oxygène et ses métabolites (adapté d'après Halliwell, 2007)

Nom	Symbôle
Oxygène	O_2
Agents radicalaires	
Anion superoxyde	$\bullet\text{O}_2^-$
Radical hydroxyle	$\text{HO}^\bullet$
Radical peroxyde	$\text{ROO}^\bullet$
Radical alcoxyle	$\text{RO}^\bullet$
Oxyde nitrique	$\text{NO}^\bullet$
Agents non radicalaires	
Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Peroxyde organique	ROOH
Acide hypochloreux	HOCl
Peroxynitrite	ONOOH

3.2.1.1 L'Oxygène (O_2)

L'oxygène étant un élément indispensable à la vie des organismes aérobies, pendant la respiration, plus de 4 % de celui-ci est converti en espèces réactives d'oxygène (Klaunig et Kamendulis, 2004). Dans la phosphorylation oxydative mitochondriale normale, l'oxygène est réduit par 4 électrons pour former de l'eau (H_2O). Cependant, une réduction incomplète de celui-ci conduit à la génération du $\bullet\text{O}_2^-$, l'anion superoxyde (Hammond et *al*, 1985; Zweier et *al*, 2003); c'est alors que suivra la formation d'autres espèces réactives d'oxygène (H_2O_2 , $\text{HO}^\bullet$, HOCl , etc.) à partir du superoxyde. En plus, la xanthine oxydase convertit l'oxygène en anion superoxyde puis en peroxyde

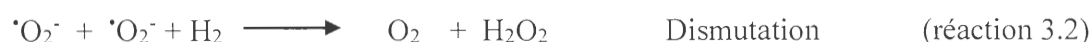
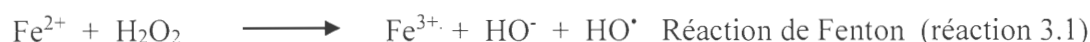
d'hydrogène durant la transformation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique (Valko *et al.*, 2004).

3.2.1.2 L'anion superoxyde (O_2^-)

L'anion superoxyde est produit soit à travers les processus métaboliques, soit suite à l'activation de l'oxygène par irradiation physique (Klaunig et Kamendulis, 2004), et est considéré comme l'espèce réactive primaire d'oxygène (Fridovich, 1986). Il peut par la suite, interagir avec d'autres molécules pour générer des espèces réactives secondaires, soit directement ou en plus grande partie, à travers des processus catalysés par des enzymes ou des cations de métaux (Fridovich, 1986).

L'anion superoxyde possède différentes propriétés en fonction de l'environnement et du pH. Son pKa de 4.8 lui permet d'exister soit sous la forme superoxyde (O_2^-) ou à faible pH, sous forme d'hydroperoxyde ($\text{HOO}^\bullet$) (Halliwell et Gutteridge, 2015 et 1999; Schafer et Buettner, 2001). La forme $\text{HOO}^\bullet$ pénètre mieux et plus facilement les membranes biologiques que la forme chargée (O_2^-). Toutefois, en conditions de pH physiologique, cette forme (O_2^-) se retrouve en plus grand nombre. Dans les environnements hydrophiles, les deux formes, fonctionnant comme des agents réducteurs, coopèrent pour réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}), réactif pour la réaction de Fenton (réaction 3.1), qui génère une autre espèce radicalaire, le radical hydroxyle (Fenton, 1894). Aussi, dans les solvants organiques, le superoxyde (O_2^-) agit comme un puissant agent oxydant qui réagit avec les composés capables de céder un proton (H^+), tels que l'ascorbate et l' α -tocophérol. Leur plus importante réaction est la dismutation (réaction 3.2); pendant cette réaction, le radical superoxyde réagit avec un autre radical superoxyde; un d'eux est oxydé en oxygène, et l'autre est réduit en peroxyde d'oxygène (Desideri et Falconi, 2003). Cette réaction, un peu lente, peut devenir très rapide en milieu acide où le radical hydroperoxyde est la forme en action. En plus, dans des conditions de stress, l' O_2^- oxyde les composés contenant du fer et facilite la production de radical hydroxyle ($\text{HO}^\bullet$) à partir du peroxyde

d'hydrogène, en rendant disponible le Fe(II) pour la réaction de Fenton (Leonard et *al.*, 2004; Liochev et Fridovich, 2002). Le radical superoxyde participe aussi à la réaction de Haber-Weiss (réaction 3.3) qui produit le HO[•]. Cette réaction est la somme de la réaction de Fenton et de la réaction de réduction du Fe(III) par le superoxyde (réaction 3.4) (Liochev et Fridovich, 2002).



ou

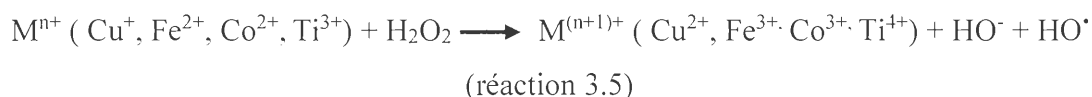


3.2.1.3 Le radical hydroxyle (HO[•])

Le radical hydroxyle est un puissant pro-oxydant capable de réagir à haute vitesse avec la plupart des molécules organiques et inorganiques des cellules, dont l'ADN, les protéines, les lipides, les acides aminés, les sucres et les métaux. Il a une demi-vie en solution aqueuse très courte (1 ns), possède une grande affinité pour les autres molécules, est hautement toxique et extrêmement réactif avec les composants biologiques; ainsi, il est considéré comme le radical des systèmes biologiques le plus réactif (Pastor et *al.*, 2000; Halliwell et Gutteridge, 1999).

De par sa haute réactivité et son affinité pour une multitude de molécules, il interagit dès sa production avec les molécules dans son entourage immédiat et même avec ses sites de formation. Plusieurs effets délétères lui sont attribués, surtout de par sa production en continu via la réaction de Haber-Weiss (réaction 3.3). Le radical hydroxyle est aussi produit par les irradiations ionisantes et en majorité par la

décomposition du peroxyde d'hydrogène par les ions métalliques (M^{n+}), suivant la réaction de Fenton (Liochev et Fridovich, 2002; Pastor et *al.*, 2000). Sa production à partir des cations métalliques est plus réaliste *in vivo* lorsque le catalyseur cationique est celui du fer (II), du cuivre (I), du chromium ou du cobalt (réaction 3.5).



3.2.1.4 Les radicaux peroxyde ($ROO^\bullet$)

Les radicaux peroxyde ($ROO^\bullet$) sont des espèces très énergétiques (Burcham, 1998). La nature du groupe R, l'environnement local et les concentrations d'oxygène et des autres réactants conditionnent la variation de la chimie de ces radicaux peroxydes dont le plus simple est le radical dioxyle ou hydroperoxyde ($HOO^\bullet$), l'acide conjugué de l'anion superoxyde (Porter et *al.*, 1995).

Les radicaux peroxydes, avec leurs capacités oxydantes bien élevées, sont aussi à l'origine de plusieurs pathologies humaines (Cadenas et Sies, 1998; Gutteridge, 1995). Ils sont impliqués dans la modification du squelette des protéines, dans le clivage et les dommages de l'ADN.

3.2.1.5 Le radical alcoxyle ($RO^\bullet$)

Le radical alcoxyle est formé à la suite des alkylperoxydes ($ROO^\bullet$), eux-mêmes obtenus par oxydation par le radical hydroxyle et l'oxygène. Dans des conditions de stress, l'oxydation des protéines est initiée par le radical hydroxyle, mais le radical alcoxyle est à l'origine de la fragmentation de la chaîne polypeptidique (Berlett et Stadtman, 1997).

3.2.1.6 L'oxyde nitrique ($NO^\bullet$)

L'oxyde nitrique ou le monoxyde d'azote est généré dans les tissus biologiques par l'oxyde nitrique synthétase (NOS, EC 1.14.13.39). Celle-ci métabolise (oxydation) la

L-arginine en L-citrulline avec la formation d'oxyde nitrique (Ghafourifar et Cadenas, 2005). L'oxyde nitrique est abondant et agit comme une molécule de signalisation biologique dans une large variété de processus physiologiques, y compris la régulation immunitaire, la régulation de la pression artérielle, la relaxation des muscles et les mécanismes de défense (Alderton et *al.*, 2001; Bergendi et *al.*, 1999). Toutefois, il est cytotoxique et agit souvent avec une multitude de radicaux et de substances pour produire des molécules aussi cytotoxiques (Freeman, 1994; Valdez et *al.*, 2000). Il réagit avec le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux, l'anion nitroxyde ($\text{NO}^\cdot$) ou l'anion superoxyde pour engendrer une ligne de dérivées telles que le radical nitrate ($\text{NO}_3^\cdot$), le dioxyde d'azote (NO_2), le trioxyde d'azote (N_2O_3), le radical hydroxyle ($\text{HO}^\cdot$), le dioxyde d'azote et/ou l'anion peroxynitrite ($\text{ONOO}^\cdot$) qui sont hautement oxydants. L'oxyde nitrique, avec sa demi-vie étroitement liée à sa concentration, peut être surproduit et entraîner un stress qualifié de stress nitrosatif (Klatt et Lamas, 2000). Ceci survient lorsque leur quantité excède la capacité du système à les neutraliser et à les éliminer, ce qui peut conduire à des réactions de nitrosylation et aboutir à l'altération de la structure des protéines et à l'inhibition de leur fonction normale (Halliwell et Gutteridge, 2015 et 1999; Halliwell et *al.*, 2000; Patel et *al.*, 2000).

3.2.2 Les espèces pro-oxydantes non radicalaires

Les espèces non radicalaires regroupent une variété de composés. Leur réactivité est aussi différente d'une substance à l'autre. Les espèces réactives régulièrement rencontrées dans les cellules vivantes en concentrations élevées sont l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les peroxydes organiques (ROOH), l'acide hypochloreux (HOCl) et peroxyde nitrique (ONOOH) comme montré dans le tableau 3.1.

3.2.2.1 L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

L'oxygène singulet est produit suite à la peroxydation des lipides. Il est très réactif et peut interagir avec les membranes cellulaires pour produire d'autres espèces radicalaires réactives qui peuvent être cytotoxiques et réagir avec des lipides (Bocking et *al.*, 2001), des protéines (Kim et *al.*, 2001) et avec l'ADN (Ravanat et *al.*, 2000), entraînant des lésions mutagéniques (Cavalcante et *al.*, 2002), l'induction du cancer et l'apoptose (Kochevar et *al.*, 2000).

3.2.2.2 Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène est un des produits de la dismutation des anions superoxydes, réaction 3.2 (Desideri et Falconi, 2003). Il est aussi le produit majeur (70-95 %) des xanthine oxydases (Kelley et *al.*, 2010). Cette voie est utilisée pour la production d'espèces réactives (principalement H_2O_2) dans les études de stress oxydatif (Rieger et *al.*, 2002; Fatokun et *al.*, 2007). Le peroxyde d'hydrogène est nocif. Il se dissout librement dans les solutions aqueuses et pénètre facilement les membranes biologiques. Il peut agir directement au moyen de sa propriété oxydante ou indirectement en servant de source à d'autres espèces réactives, tel le radical hydroxyle ou l'acide hypochloreux (Harber et Weiss 1934). Ces actions ont pour résultat l'oxydation de l'ADN, des lipides, des groupes thiols et la dégradation des protéines (Halliwell et Gutteridge 1999; Halliwell et *al.*, 2000).

3.2.2.3 Les peroxydes organiques (ROOH)

En dehors du peroxyde d'oxygène qui est produit en grande quantité, d'autres peroxydes organiques (ROOH) sont continuellement générés dans les cellules consommant de l'oxygène. Ils sont donc des produits du métabolisme cellulaire. L'atmosphère en contient un ratio de 0,1-1 ppb (Grossmann et *al.*, 2003; Guo et *al.*, 2014). Parmi ceux-ci, l'on trouve l'hydroxyméthylhydroperoxyde (HMHP), le méthylhydroperoxyde et l'acide peroxyacétique (Lind et *al.*, 1987; Zhou et Lee, 1992;

Zhang et *al.*, 2012). Les dommages qu'ils infligent aux cellules sont dus soit à leur activité oxydative intrinsèque ou à la production de radicaux hydroxyles (Fry et *al.*, 2006).

3.2.2.4 Acide hypochloreux (HOCl)

L'acide hypochloreux est une espèce réactive d'oxygène possédant un fort potentiel oxydant. Il est produit par les cellules neutrophiles à partir du peroxyde d'hydrogène via les myéloperoxydases (médiateurs inflammatoires) et possède une facilité de pénétration dans les membranes cellulaires (Klebanoff, 2005). Cet acide, produit excessivement dans des conditions pathologiques, a des effets toxiques. Il réagit rapidement avec les macromolécules cellulaires et les protéines contenant des résidus de cystéine (Cys) et de méthionine (Met) dans leur séquence (Winterbourn et Brennan, 1997; Drazic et *al.*, 2013). Cette réaction conduit au dépliement (Winter et *al.*, 2008) et à l'oxydation des protéines, endommageant ainsi les cellules (Rosen et *al.*, 2009; Ghesquière et *al.*, 2011). L'acide hypochloreux peut aussi contribuer à l'inflammation chronique, au cancer et à l'artériosclérose (Cook et *al.*, 2012; Gungor et *al.*, 2009).

3.2.2.5 Le peroxynitrite (ONOOH)

Le peroxynitrite (ONOOH) est la forme protonnée de l'anion peroxynitrite (ONOO⁻). Ces peroxynitrites sont des molécules oxydantes, très actives, produites lors des processus inflammatoires par l'interaction rapide entre l'oxyde nitrique et l'anion superoxyde (Valdez et *al.*, 2000). La forme ONOOH a la capacité de réagir avec plusieurs composés pour former d'autres espèces nuisibles et les dégâts sont similaires à ceux causés par le radical hydroxyle (Beckman et Koppenol, 1996; Patel et *al.*, 2000). Ils peuvent aussi entraîner la fragmentation de l'ADN et l'oxydation des lipides (Beckman et Ames, 1997).

3.3 Sources endogènes des espèces réactives d'oxygène

3.3.1 Les cellules macrophages et dendritiques

Parmi les sources endogènes d'espèces réactives d'oxygène sont les cellules macrophages et dendritiques. Ces cellules libèrent abondamment des espèces réactives en réponse à des stimuli inflammatoires. Une fois activées, elles accroissent la consommation de l'oxygène qui aboutit à la libération d'anion superoxyde, de peroxyde d'hydrogène, d'acide hypochloreux et d'oxyde nitrique (Conner et Grisham, 1996; Hussain et *al.*, 2003).

3.3.2 Les leucocytes

Les leucocytes, regroupant les neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes et lymphocytes, sont des principaux éléments du système de défense contre les bactéries et d'autres envahisseurs. Ils produisent des ERO par leur mécanisme de protection de l'organisme (Ginsburg, 1998; Ginsburg et Kohen, 1995). Une fois stimulées, ces cellules augmentent fortement (20 fois) leur consommation d'oxygène qui va entraîner une aussi grande utilisation de glucose et la forte production de la forme réduite de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) par la voie des pentoses phosphates (Babior et *al.*, 2002). Le NADPH généré à partir de ces cellules est l'initiateur de la cascade de production d'ERO en servant de donneur d'électrons au complexe enzymatique NADPH oxydase, ce qui entraîne la production de l'anion superoxyde à partir de l'oxygène moléculaire. C'est à sa suite qu'interviennent les SOD pour produire du peroxyde d'hydrogène lors de la neutralisation de l'anion superoxyde, puis en présence des cations métalliques médiateurs, la formation de radical hydroxyle (réaction de Haber-Weiss). Cette cascade de transformation ou de renouvellement ou encore de production d'ERO se poursuit avec la formation d'une nouvelle espèce, l'acide hypochloreux, par l'interaction entre le radical hydroxyle précédemment

produit et l'ion chlorure en présence de la myéloperoxydase, un médiateur inflammatoire, (Hawkins et *al.*, 2001; Rodrigues et *al.*, 2002).

En dehors de ces hôtes endogènes, d'autres sources exogènes favorisent la génération des ERO.

3.4 Des sources exogènes des espèces réactives d'oxygène

La génération des ERO a aussi des sources exogènes ; ce sont certains agents thérapeutiques (médicaments), des xénobiotiques (pesticides, herbicides, toxines), certaines pathologies (Aikawa et *al.*, 2001; Giasson et *al.*, 2002; Yulia et *al.*, 2011), les irradiations, les polluants environnementaux (fumée de cigarette, échappement de voiture, polluants industriels) et certains aliments (Kohen et Gati, 2000; Ebadi, 2001).

3.4.1 Des médicaments

Certains médicaments constituent une autre source potentielle d'espèces réactives d'oxygène. Ces médicaments sont pour la plupart des anticancéreux (Sawyer et *al.*, 2010; Raschi et *al.*, 2010), des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Hickey et *al.*, 2001; Boelsterli, 2003) des agents antirétroviraux (Kline et *al.*, 2009; Kohler et *al.*, 2009), des antipsychotiques (Onoue et *al.*, 2008) et des analgésiques (Stirnemann et *al.*, 2010). Ils provoquent directement ou indirectement l'augmentation de la génération des espèces réactives d'oxygène dans leur mécanisme d'action. Plusieurs agents thérapeutiques couramment utilisés pour le traitement du cancer causent la génération d'ERO cellulaires; ce sont les agents comme les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine), la mitomycine C, la bléomycine, le trioxyde d'arsenic et la cisplatine (Niu et *al.*, 1999; Miller, 2002). La daunorubicine provoque aussi la génération d'anion superoxyde à partir de l'oxygène en interagissant avec le cytochrome P450 réductase en présence de NADPH (Serrano et *al.*, 1999). La doxorubicine cause la génération de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Tsang et *al.*, 2003).

3.4.2 Des xénobiotiques

Les xénobiotiques regroupant les toxines, les pesticides, les herbicides comme le paraquat et des produits chimiques produisent des ERO comme produits secondaires selon leur mécanisme d'action *in vivo* (Obata et *al.*, 2001; Wormser et *al.*, 2000).

3.4.3 Des pathologies

De nombreuses pathologies génèrent en continu des ERO (McGeer et McGeer, 1998; Kaul et *al.*, 2001).

Des espèces réactives d'oxygène sont directement libérées dans des cellules par différents initiateurs et médiateurs radicalaires dans plusieurs types de cancer (Droge, 2002; Nyska et *al.*, 2002), maladies cardiaques (Aikawa et *al.*, 2001; Farré et Casado, 2001), inflammations chroniques (Laroux et *al.*, 2001), brûlures (Latha et Babu, 2001), maladies du tractus intestinal (Blau et *al.*, 2000a et 2000b), diabète (Droge, 2002; Opara, 2002), déficiences cérébrales dégénératives (Giasson et *al.*, 2002), la thalassémie (Meral, 2000), la maladie de Wilson (Strausak et *al.*, 2001) et diverses autres pathologies (Gross et *al.*, 1999; Aikawa et *al.*, 2001).

3.5 Les effets des ERO sur les cellules

Les espèces réactives d'oxygène sont des composantes clés dans plusieurs phénomènes physiologiques, entre autres le développement de mutations, des maladies dégénératives, des inflammations et l'apoptose. Leur action dans les systèmes biologiques peut avoir un effet nuisible ou bénéfique pour l'organisme (Valko et *al.*, 2004).

3.5.1 Des effets délétères des espèces réactives d'oxygène

Les espèces réactives d'oxygène sont la cause d'une multitude de désordres pathologiques moléculaires et tissulaires (Giasson et *al.*, 2002; Nyska et *al.*, 2002;

Kirchner et *al.*, 2012). L'oxygène utilisé par les cellules est en partie converti en métabolites toxiques, des ERO dont la production est continue. Ces ERO sont impliquées dans de nombreuses affections, dont l'athérosclérose, le cancer, les allergies, les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (Lehucher-Michel et *al.*, 2001; Droge, 2002). Dans les cellules vivantes, une fois que la balance entre espèces pro-oxydantes (ERO) et réductrices (antioxydants) est en faveur des premières, plusieurs désordres comme la maladie d'Alzheimer, plusieurs types de cancer, de diabète, de polyarthrite rhumatoïde et autres maladies s'y associent (Droge, 2002; Nyska et *al.*, 2002; Paul et *al.*, 2005). Toutefois, celles-ci peuvent avoir des effets bénéfiques pour les cellules à des concentrations estimées basses.

3.5.2 Des effets bénéfiques des espèces réactives d'oxygène

Dans des conditions normales, les espèces réactives d'oxygène produites agissent souvent au profit de l'organisme. De nombreuses actions médiées par les espèces réactives d'oxygène protègent les cellules contre l'oxydation induite par d'autres espèces réactives d'oxygène : ainsi elles rétablissent ou maintiennent la balance réduction-oxydation (Valko et *al.*, 2007). Les ERO mitochondriales pourraient être importantes dans un grand nombre de réponses cellulaires et de processus de signalisation redox dépendant (Werner et Werb, 2002; Dada et *al.*, 2003) comme dans le vieillissement. Ces espèces générées dans des conditions physiologiques régulent la croissance cellulaire, l'activation de certains facteurs de transcription (NF-*kappa* B, AP-1) et le statut redox (Davies, 1995; Storz, 2005). Elles induisent aussi la réponse mitogénique (Poli et *al.*, 2004) à de faibles concentrations. Dans le même contexte (faible concentration), le peroxyde d'hydrogène stimule la prolifération cellulaire (Song et *al.*, 2007) et augmente la survie de plusieurs types cellulaires en agissant comme des messagers secondaires (Lowenstein et *al.*, 1994).

Afin de se défendre de tout effet nocif de ces agents pro-oxydants, les cellules utilisent de nombreux systèmes antioxydants pour contrôler leur niveau d'espèces réactives d'oxygène.

3.6 Systèmes de défenses de l'organisme contre les espèces réactives: agents bioactifs avec propriétés thérapeutiques antioxydantes

Pour faire face aux effets délétères des espèces réactives d'oxygène (ERO), les cellules utilisent une série de systèmes de défense antioxydante pour les métaboliser afin de contrôler leur niveau (Halliwell et Gutteridge, 2007; Barnham *et al.*, 2004; Finkel et Holbrook., 2000).

Un antioxydant peut être défini comme un composé capable de prévenir ou ralentir l'action des pro-oxydants ou les dommages biologiques oxydatifs (Cao et Prior, 1998; Prior et Cao, 2001; Flora, 2009). Selon Halliwell (1990 et 1995), un antioxydant est un agent qui, présent en de faibles concentrations, peut prévenir ou retarder significativement l'oxydation d'un substrat oxydable. Les antioxydants sont donc des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les espèces réactives d'oxygène et d'azote dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques des ERO.

Suite à leur production physiologique, l'accumulation des ERO est limitée par des défenses antioxydantes reposant sur des systèmes de défense enzymatiques (superoxyde dismutases (SODs), catalase et glutathion peroxydase (GPx), couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase) et non enzymatiques comme les vitamines C et E, les polyphénols (Leverve, 2009). Aussi, le maintien de ces systèmes enzymatiques nécessite la présence d'un certain nombre d'oligoéléments tels les ions cuivre, manganèse, zinc et l'ion sélénium en particulier (Jacotot, 1994). Ces systèmes de défense antioxydante de l'organisme sont donc endogènes et exogènes (diététiques et thérapeutiques: vitamine E, vitamine C (β-carotène).

Ces antioxydants agissent de plusieurs manières. Leur mécanisme d'action peut être direct ou indirect, en tant que partie de la structure d'enzymes et/ou cofacteurs d'enzymes antioxydantes, comme dans le cas des éléments en traces. Les mécanismes les plus fréquents sont l'interruption de la chaîne oxydative (vitamines C et E, le NADPH, le glutathion), la prévention des dégâts par la mise à disposition d'électrons (céruloplasmine, vitamine C, superoxyde dismutase) [Berger, 2006].

Les organismes réagissent donc de façon constante à cette production permanente d'espèces réactives au moyen de deux lignes de défense distinctes au niveau des cellules pour empêcher la toxification ou pour les détoxifier (Favier, 2008). La stratégie préventive utilisée est de nature enzymatique, visant à détruire des radicaux libres, le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les précurseurs des espèces réactives (Palmieri et Sbendorio, 2007). Le mécanisme réactionnel est souvent médié par un métal situé au site actif de l'enzyme (Mn, Zn, ou Cu). Ces agents antioxydants, synthétisés par l'organisme (Catalase, Glutathion peroxydase, Superoxyde dismutase, Thiorédoxine reductase) sont regroupés avec les chélateurs de métaux (Transferrine, albumine), sous le terme d'antioxydants préventifs (Palmieri et Sbendorio, 2007). Certains composés antioxydants comme les vitamines (E: tocophérol, C: ascorbate, Q: ubiquinone), ou les caroténoïdes, apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables (Kinsky, 1989). La vitamine piégeuse peut devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases (Packer, 1991). Ces vitamines sont qualifiées d'antioxydants piégeurs de radicaux (scavengers). De très nombreux composés alimentaires (polyphénols, alcaloïdes, phytates, caroténoïdes) ont aussi ce comportement (Palmieri et Sbendorio, 2007; Hajhashemi et *al.*, 2018).

Dans des conditions physiologiques normales, plusieurs antioxydants permettent de neutraliser les espèces réactives et de protéger l'organisme contre les dommages oxydatifs. Ces antioxydants permettent de contre-balancer la production des espèces

réactives. Ils sont regroupés en deux grands groupes, les antioxydants préventifs et les antioxydants piègeurs de radicaux libres (Palmieri et Sbendorio, 2007).

3.6.1 Des agents antioxydants "préventifs"

3.6.1.1 Les systèmes enzymatiques avec des propriétés antioxydantes spécifiques

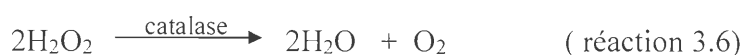
La majeure partie de la défense antioxydante est fournie par les systèmes de défense enzymatiques dont les plus efficaces impliquent la superoxyde dismutase, la catalase, les glutathion peroxydase, transférases et réductases ainsi que la thiorédoxine réductase (Mates et *al.*, 1997; McCall et Frei, 1999). Ces systèmes de défense ont une action directe sur les agents prooxydants.

- La superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1)

Dans les cellules, les superoxydes dismutases (SODs) existent sous plusieurs isoformes dont la structure d'ensemble est très bien conservée lors de l'évolution (Zelko et *al.*, 2002). Rudi et collaborateurs (1991) avaient distingué deux enzymes SOD, la SOD1 ou Cu-ZnSOD et la SOD2 ou MnSOD. Une des différences mises en évidence concernait le métal situé au site actif de celles-ci. Tandis que la SOD1 a en son site un atome de cuivre (Cu) et un de zinc (Zn) comme cofacteurs, la SOD2 est dépendante du manganèse (Mn). Une troisième SOD, la SOD3 ou ecCu-ZnSOD a été localisée dans les compartiments extracellulaires, dans le plasma, la lymphe, le liquide céphalo-rachidien, et dans le liquide synovial (articulaire). Ces trois enzymes (SOD1, SOD2 et SOD3) convertissent spécifiquement, l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), permettant à d'autres enzymes de les épauler dans cette lutte (Radi et *al.*, 1991). D'autres enzymes, la catalase et le glutathion peroxydase prendront par la suite le relais pour détoxifier le nouveau produit formé.

- La catalase (EC 1.11.1.6)

La catalase (EC 1.11.1.6) est une enzyme héminique de la classe des oxydo-réductases. Elle est présente dans les hématies et les peroxysomes (Ganther, 1999) où elle agit comme un piègeur de peroxyde. Elle convertira le peroxyde d'hydrogène en eau (H₂O) et en oxygène (O₂) selon la réaction 3.6 (Radi et *al.*, 1991). L'activité de celle-ci face aux H₂O₂ est plus intense dans le foie, puis les reins, les poumons, le cœur et le cerveau (Ho et *al.*, 2004).



- Les glutathion peroxydases (EC 1.11.1.19), transférases (EC 2.5.1.18) et réductases (EC 1.6.4.2).

La mitochondrie est le siège d'une variété d'isoformes de glutathion peroxydases (EC 1.11.1.19), glutathion transférases (EC 2.5.1.18) et de glutathion réductases (EC 1.6.4.2) (Raza et *al.*, 2002). Le glutathion contenu dans la mitochondrie est utilisé comme un donneur recyclable d'électron et comme consommable dans les réactions de conjugaison. Ainsi, pour la protection de la mitochondrie, le glutathion est utilisé par le glutathion peroxydase pour réduire le peroxyde d'hydrogène en H₂O (Griffith et Meister, 1985; Dringen, 2000).

- La céruloplasmine (EC 1.16.3.1)

La céruloplasmine (EC 1.16.3.1) est une enzyme circulante à cuivre, avec 6 atomes de cuivre par molécule; elle est une protéine antioxydante majeure, synthétisée dans le foie puis sécrétée dans le plasma (Al-Timimi et Dormandy, 1977; Cha et Kim, 1999) et représente 95 % du cuivre en circulation chez un adulte en bonne santé (Fox et *al.*, 1995). La céruloplasmine joue un important rôle dans le transport du cuivre plasmatique dont elle assure 95 % du transport dans le sang. Sa capacité antioxydante a été montrée *in vitro* comme *ex vivo* (Dumoulin et *al.*, 1996; Atanasiu et *al.*, 1998). Avec son activité

ferroxydasique, elle protège les acides gras polyinsaturés des membranes des globules rouges contre les effets des radicaux actifs de l'oxygène (Sass-Kortsak, 1965; Arnaud *et al.*, 1988).

Sous les conditions physiologiques, la céruloplasmine est importante dans le contrôle de l'oxydation des lipides membranaires et du peroxyde d'hydrogène, probablement par l'oxydation directe des cations Fe^{2+} prévenant des réactions de peroxydation des lipides, y compris la réaction de Fenton (Taysi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006).

3.6.1.2 Les chélateurs de métaux

Les chélateurs de métaux (Tableau 3.2) n'agissent pas directement sur les agents pro-oxydants, mais empêchent la disponibilité de l'ion métallique pour la réaction d'oxydation causée par les espèces réactives d'oxygène et d'azote. L'agent antioxydant chélateur de métaux le plus important et plus efficace connu était la transferrine (Gutteridge *et al.*, 1980; Loeffler *et al.*, 1995). D'autres protéines ont été identifiées pour leur participation à la protection des cellules contre les espèces réactives.

Tableau 3.2: Les antioxydants chélateurs de cations métalliques (adapté de Symons et Gutteridge, 1998)

Protéines	Fonction
Transferrine	Liaison avec les ions ferriques
Lactoferrine	Liaison aux ions ferriques à faible pH
Ferritine	Liaison et stockage des ions ferriques
Albumine	Liaison au cuivre et à l'hème
Haptoglobine	Liaison à l'hème
Hémopexine	Liaison à l'hème

L'albumine est une protéine avec un rôle de transporteur et d'antioxydant, très abondante en circulation. La plupart des activités antioxydantes de l'albumine résultent

de sa capacité de fixation aux ligands et à ses propriétés de piégeage de radicaux libres (Roche et *al.*, 2008; Guidet, 2009). L'albumine a la capacité de se fixer à différents types de molécules, d'où l'appellation «éponge» de la circulation (Oettl et Stauber, 2007; Guidet, 2009). En effet, l'albumine est connue pour sa capacité de lier des ions métalliques et des molécules telles que les acides gras, des pigments biliaries, le cholestérol, les médicaments, ainsi que les hormones. Plus de 70% des activités de piégeage des radicaux libres du sérum humain sont dus à l'albumine (Bourdon et Blache, 2001).

3.6.2 Des antioxydants piégeurs («scavengers») de radicaux

Sous ce thème de piégeurs de radicaux sont regroupés les systèmes non enzymatiques avec des propriétés antioxydantes spécifiques ou non. Ils sont presque tous des antioxydants exogènes, majoritairement d'origine végétale (Harasym et Oledzki, 2018).

3.6.2.1 Les tocophérol et tocotriénol (Vitamine E)

La Vitamine E (α -tocophérol et tocotriénol) est l'antioxydant liposoluble le plus important chez l'humain. Les sources diététiques de la vitamine E sont les huiles végétales, l'huile de germe de blé, des grains entiers, des noix, des céréales, des fruits, des œufs, la volaille et la viande (Willcox, 2004).

La vitamine E est un puissant antioxydant biologique, majoritairement utilisé par les cellules (Burton et Ingold, 1989), surtout les membranes cellulaires, pour se protéger contre l'oxydation. La vitamine E piège les radicaux lipidiques produits dans la chaîne des réactions de peroxydation lipidique et les radicaux libres intermédiaires (Linster et Van Schaftingen, 2007). Sa principale fonction antioxydante est la protection contre la peroxydation des lipides (Pryor, 2000). L' α -tocophérol (vitamine E) et la vitamine C fonctionnent en corrélation dans un processus de type cyclique. Durant la réaction d'oxydation, l' α -tocophérol est converti en radical α -tocophéryl en cédant un

hydrogène à un lipide ou à un radical peroxy lipidique. Ce radical α -tocophéryl peut ensuite être réduit en la forme α -tocophérol originale par la vitamine C (Kojo, 2004).

3.6.2.2 L'acide ascorbique (vitamine C)

L'acide ascorbique ou la vitamine C est un monosaccharide présent chez les animaux et les végétaux. L'organisme humain est incapable de le synthétiser et doit être apporté par l'alimentation, dont les sources naturelles sont les fruits acides, les végétaux verts et la tomate (Naidu, 2003). L'acide ascorbique est un agent réducteur qui est maintenu sous sa forme réduite par sa réaction avec le glutathion (Linster et Van Schaftingen E, 2007).

Ses premiers antioxydants partenaires sont la vitamine E et les caroténoïdes, ainsi que les enzymes antioxydantes. La vitamine C peut régénérer l' α -tocophérol à partir des radicaux α -tocophéryl (Kojo, 2004; Carr et Frei, 1999).

3.6.2.3 Les alcaloïdes et autres extraits de végétaux

Un grand nombre d'extraits de plantes se sont révélés capables de piéger les espèces radicalaires (Kabir et *al.*, 2015; Valenza et *al.*, 2018). Les alcaloïdes, largement disséminés dans la nature, constituent une grande part de ces défenseurs exogènes de l'organisme (Maroyi, 2018; Akinrinde et *al.*, 2018; Li, S. et *al.*, 2018). Leur mécanisme d'action n'a toutefois pas encore été élucidé.

La capacité antioxydante de ces composés susceptibles d'exercer une activité antioxydante peut être évaluée par différentes méthodes.

3.7 Méthodes courantes d'évaluation *in vitro* des propriétés antioxydantes

Plusieurs méthodes ont été développées pour estimer les capacités antioxydantes (Lopez-Alarcona et Denicolab, 2013), et elles peuvent être basées sur:

- * la réduction d'espèces radicalaires (ABTS^{•+}, DPPH[•]) par les antioxydants

- * la capacité de l'antioxydant à réduire un cation métallique
- * l'habilité des antioxydants à protéger une molécule cible exposée à une source d'espèces réactives
- * la capacité des antioxydants à inhiber l'oxydation des lipoprotéines à faible densité

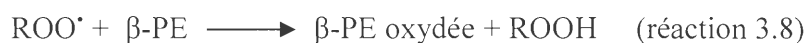
Actuellement, une variété de méthodes est fréquemment utilisée pour estimer la capacité antioxydante. Au nombre de celles-ci, l'on distingue les méthodes dont les procédures et applications sont recommandées pour la standardisation, les méthodes ORAC, ABTS et Folin-Ciocalteu (Prior et *al.*, 2005), ainsi que les méthodes FRAP, DPPH et CUPRAC (Cheng et *al.*, 2015; Moo-Huchin et *al.*, 2015).

3.7.1 La méthode ORAC

La méthode ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) fut développée par Cao et collaborateurs en 1993. C'est une méthode compétitive qui évalue l'habilité de l'échantillon antioxydant testé à inhiber la dégradation de la molécule cible par les radicaux peroxydes (ROO[•]). Cette action est suivie par spectroscopie d'absorption en UV-visible. Cette méthodologie consistait à générer des radicaux peroxydes (ROO[•]) à partir du 2,2-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) après incubation dans un milieu aqueux (réaction 3.7).



La β -phycoérythrine (β -PE), une protéine fluorescente rouge (formée par la complexation de la protéine à un pigment rouge), est utilisée comme molécule cible. En effet, incubée avec l'AAPH, la molécule cible (β -PE) est oxydée par celui-ci (réaction 3.8), ce qui entraîne un changement (baisse) de l'intensité de son absorption en visible.



Cependant, la présence de l'antioxydant de référence (ex : acide gallique, Trolox) ou de l'échantillon à tester (ayant des propriétés antioxydantes) protège la β -PE et entraîne l'inhibition de son oxydation. La capacité antioxydante est évaluée à partir de l'aire en dessous de la courbe du profil cinétique de la molécule cible. L'aire en dessous de la courbe obtenue avec l'échantillon d'intérêt est comparée à celle de l'antioxydant de référence, l'acide gallique ou le Trolox (analogue hydrosoluble de la vitamine E), permettant de déterminer l'index ORAC en termes du composé de référence.

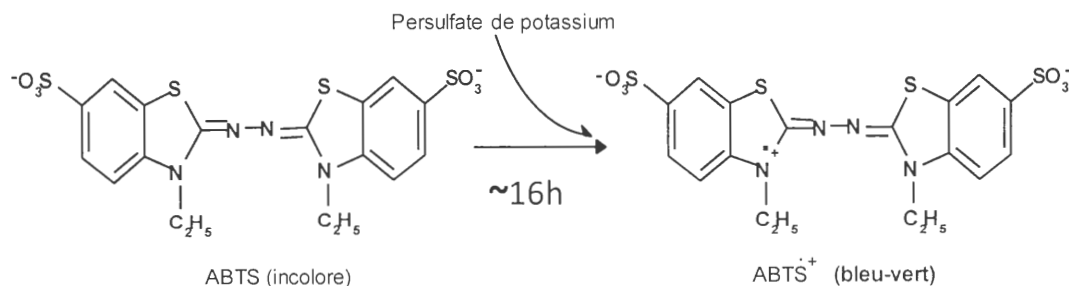
Ce test a été amélioré en remplaçant la sonde β -PE par la fluorescéine (Ou et *al*, 2001). Cette méthodologie ORAC ajustée est couramment utilisée depuis les années 2001, en raison de la photostabilité et du faible coût de la fluorescéine comme sonde. Le principe demeurant le même, l'échantillon d'intérêt, le témoin ou l'antioxydant de référence est incubé avec la sonde (fluorescéine) et la source radicalaire (AAPH) à 37 °C. Au cours de la réaction, la fluorescéine est de même dégradée par l'AAPH (comme avec la β -PE) avec une diminution de l'intensité de la fluorescence de la fluorescéine ($A_{525\text{ nm}}$). La présence d'un antioxydant et des standards adéquats prévient cette diminution de fluorescence. La standardisation est faite avec des concentrations connues de Trolox.

3.7.2 La méthode ABTS ou TEAC

L'appellation méthode ABTS est due à l'utilisation de l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) comme source d'espèce radicalaire, le radical cationique ABTS^{•+}. Cette méthodologie utilise le Trolox comme antioxydant standard et consiste à déterminer la capacité antioxydante en équivalents de Trolox (abrégié en anglais TEAC: « *Trolox Equivalent Antioxydant Capacity* ») au moyen de la décoloration du radical ABTS^{•+} (Rice-Evans et Miller, 1997). L'activité antioxydante est donc évaluée par la capacité d'un antioxydant de piéger le radical ABTS^{•+}. Ce radical de couleur bleu-vert intense est directement généré à partir de l'ABTS en utilisant du persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) comme initiateur radicalaire et absorbe à

734 nm (Miller et *al.*, 1993; Re et *al.*, 1999). Ce processus d'initiation se déroule pendant 12-16 heures d'incubation (réaction 3.9) pour former par oxydation le radical cationique $ABTS^{•+}$ qui sert de solution chromophore dans ce test. L'ajout d'un antioxydant: Trolox (standard) ou l'échantillon d'intérêt à la solution du radical préformé ($ABTS^{•+}$) entraîne un piégeage du cation $ABTS^{•+}$, dépendamment de la capacité antioxydante du composé évaluée. Cette réaction a pour conséquence la décoloration de la solution (proportionnelle à l'efficacité antioxydante, à la concentration, au temps de réaction) qui est mesurée par spectrophotométrie ($A_{734\text{ nm}}$). La capacité antioxydante est alors évaluée comme l'habilité du composé testé à décolorer la solution par réaction directe avec le radical $ABTS^{•+}$ dans un intervalle défini de temps (1-3 minutes). Ainsi, le pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^{•+}$ par le composé testé est déterminé à partir de la décoloration, puis exprimé en équivalents de Trolox dans les mêmes conditions.

Ce test s'accommode aussi bien aux composés hydrophiles que lipophiles, compte tenu de la solubilité des radicaux $ABTS^{•+}$ dans les milieux aqueux et dans l'éthanol acidifié (Arnao et *al.*, 2001).



Réaction 3.9 : L'activation de l'ABTS par le persulfate de potassium

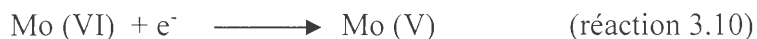
3.7.3 La Méthode Folin-Ciocalteu

L'appellation méthode Folin-Ciocalteu lui a été attribué à base de l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu. Elle est aussi désignée par la nomination de test de dosage des phénols totaux. Le réactif de Folin-Ciocalteu, un mélange de tungstate et de molybdate,

formant un polyanion hétérogène, le molybdotungstophosphate ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$) est utilisé comme réactif chromophore.

Cette méthode spectrophotométrique a initialement été développée pour déterminer les protéines (Folin et Ciocâlțeu, 1927), puis a servi au dosage des phénols totaux dans les échantillons (Singleton et *al.*, 1999; Huang et *al.*, 2005). Avec la mise en évidence de la réduction du réactif de Folin-Ciocâlțeu, cette méthode est utilisée pour l'évaluation de la capacité antioxydante des composés lipophiliques ou hydrophiliques (Huang et *al.*, 2005). Cette réaction de réduction (réaction 3.10) entraîne le changement de la coloration jaune du réactif de Folin-Ciocâlțeu en une coloration bleue avec une absorbance maximale à 765 nm (Huang et *al.*, 2005). Une corrélation est ainsi établie entre les profils de phénols totaux et l'activité antioxydante.

La méthode Folin-Ciocâlțeu pour la mesure de la capacité antioxydante consiste à détecter l'habilité du potentiel antioxydant d'un échantillon (échantillon d'intérêt ou standard) à transférer un électron au molybdène (constituant du réactif de Folin-Ciocâlțeu), formant un complexe bleu absorbant à 745-765 nm (Prior et *al.* 2005; Magalhaes et *al.* 2008). Toutefois, les conditions de son application ont été spécifiées afin de minimiser la variabilité et éliminer les résultats incohérents (Singleton et *al.*, 1999). Ainsi, les analyses sont effectuées en milieu alcalin, la densité optimale monitorée à 765 nm et l'acide gallique (acide trihydroxybenzoïque) est utilisé comme antioxydant standard (Singleton et *al.*, 1999; Prior et *al.*, 2005; Huang et *al.* 2005; Mac et *al.* 2006). La réalisation de cette méthode se résume donc en l'interaction de la molécule antioxydante avec le réactif de Folin-Ciocâlțeu et l'intensité de la coloration bleue du complexe formé est exprimée en équivalents d'acide gallique.



Explicitement, la méthode consiste à traiter l'échantillon d'intérêt (ou le standard) avec l'eau et le réactif de Folin-Ciocâlțeu, puis après 30 sec à 8 min, ajouter du Na_2CO_3 . Le

mélange est complété à 100 mL avec de l'eau et incubé à 23-25 °C pendant 2 h avant la lecture de l'absorbance à 765 nm (Singleton et *al.*, 1999).

3.7.4 La méthode FRAP

La méthode FRAP («*Ferric Reducing Antioxydant Power*» : pouvoir antioxydant réduisant l'ion Fe^{3+}) est basée sur la capacité d'un antioxydant (échantillon d'intérêt ou standard) à réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) contenu dans le complexe tripyridyltriazine ferrique (Fe(III)-TPTZ) de couleur jaune en un autre complexe de couleur bleue foncée, le complexe tripyridyltriazine ferreux (Fe(II)-TPTZ) en milieu acide (pH 3,6) (Benzie et Szeto, 1999; Thaipong et *al.*, 2006). L'espèce antioxydante, en cédant un électron au Fe^{3+} , déclenche cette réaction dont la coloration finale bleue est mesurée par spectrophotométrie à 593 nm. La réaction en présence de l'antioxydant a lieu après 4 min d'incubation à 37 °C. Le résultat est exprimé en équivalents micromolaires d'ion ferreux (Fe^{2+}) ou relatif à un antioxydant standard.

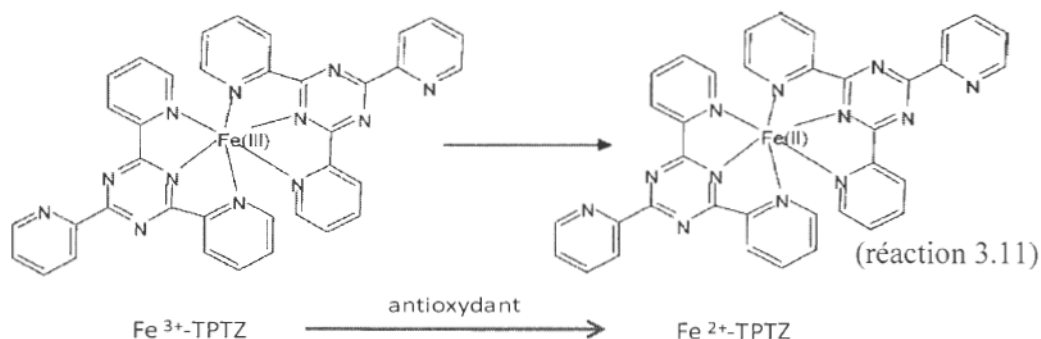


Fig. 3.1: La réduction du $\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}$ en $\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}$

3.7.5 La méthode DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

La méthode DPPH est un test de réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ($\text{DPPH}^{\bullet}$) en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH-H). Elle permet d'évaluer le potentiel antioxydant d'un échantillon contenant l'antioxydant, par sa capacité à piéger

le radical DPPH[•] utilisé comme chromogène (Brand-Williams et *al.*, 1995; Benzie et Szeto, 1999). Ce radical organique est stable à température ambiante et présente une couleur violette A_{517nm} . Les antioxydants présents dans l'échantillon, en transférant un atome H sur le radical DPPH[•], le réduisent en DPPH-H ou DPPH₂ (Fig. 3.2), entraînant un changement de la couleur de la solution du violet au jaune pâle (Sanchez-Moreno et *al.*, 1998; Molyneux, 2004). Cette réduction est facilement mesurable et suivie par spectrophotométrie à 517 nm (Bondet et *al.*, 1997; Krings et Berger, 2001). Le temps de réaction se situe entre 20-30 min (Molyneux, 2004). Les résultats de cette méthode sont présentés de plusieurs manières. L'activité antioxydante peut être évaluée en pourcentage (%) de diminution du radical DPPH[•] ou en quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration du radical DPPH[•]. Cette capacité antioxydante est exprimée en équivalents de Trolox obtenus en divisant la différence d'absorbance après l'addition de l'échantillon d'intérêt par la différence d'absorbance après l'ajout du Trolox en utilisant les solutions de radical de même concentration (Leong et Shui, 2002).

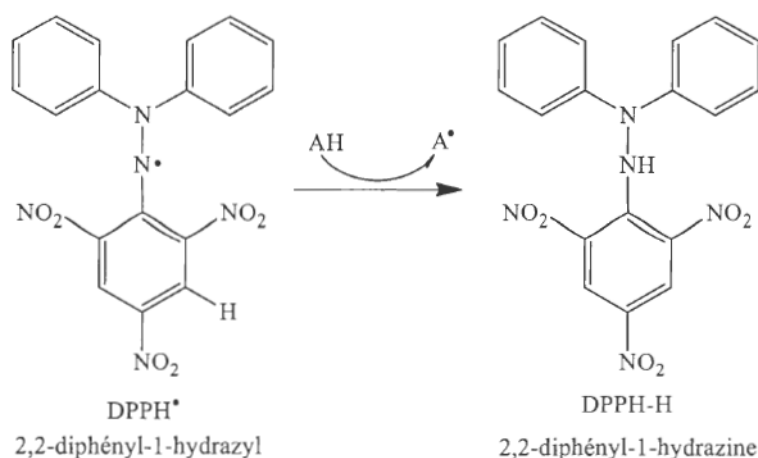


Fig. 3.2: La réduction du radical DPPH[•] (2,2-diphényl-1-hydrazyl) en DPPH-H (2,2-diphényl-1-hydrazine) par un antioxydant.

3.7.6 La méthode CUPRAC

Comme stipulé par son abréviation, la méthode CUPRAC (« *Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity* ») évalue la capacité antioxydante d'une substance par son habilité à réduire l'ion Cu^{2+} du complexe Cuivre(II)-néocuproïne (réactif de la méthode CUPRAC) en ion cuivreux Cu^+ (Fig. 3.3). Cette conversion de l'ion cuivrique (Cu^{2+}) aboutit à la formation d'un autre chélate de cuivre, le complexe cuivre(I)-néocuproïne absorbant à une longueur d'onde maximale λ_{max} de 450 nm. La méthode est donc basée sur la mesure de l'absorbance du complexe cuivre(I)-néocuproïne formé en 30 min suite à l'action conjuguée de tous les antioxydants dans l'échantillon (Ozyurek et *al.*, 2011, Apak et *al.*, 2004).

Une courbe de dilution générée avec l'acide urique comme antioxydant standard est utilisée pour convertir l'absorbance de l'échantillon en équivalents d'acide urique.

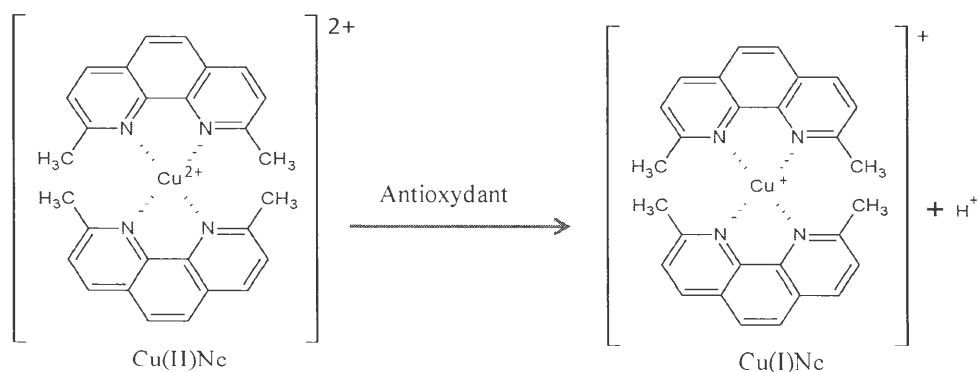


Fig. 3.3: La réduction du Cu(II)-néocuproïne en Cu(I)-néocuproïne par un antioxydant.

CHAPITRE IV

FORMULATION D'AGENTS BIOACTIFS SOUS FORME DE COMPRIMÉS POUR ADMINISTRATION ORALE

Ce chapitre est focalisé sur la formulation sous forme de comprimés, principalement sur les différents types de comprimés pouvant être obtenus et les différents types de formulations permettant d'y parvenir. Aussi, les facteurs pouvant influencer la formulation de comprimés sont passés en revue; ce sont certaines caractéristiques (solubilité, coulabilité, classe biopharmaceutique, sensibilité dans les fluides biologiques, cinétiques et le site de libération) de l'agent bioactif à formuler, le système de livraison (matrice) et les autres excipients présents dans la formulation.

4.1 Définitions: formulation et comprimé

La formulation pharmaceutique est le processus par lequel différentes substances, y compris la substance active, sont associées pour produire un médicament (USP, 2017a). Ainsi, la formulation d'un médicament désigne toutes les substances comprises dans la composition de celui-ci. Elle regroupe le ou les ingrédients pharmaceutiques actifs, le principe actif (PA) ainsi que les autres ingrédients (Rahman et *al.*, 2017) non actifs dont chacun est utilisé à des fins spécifiques pour contribuer à la performance et à la conformité du comprimé comme forme de dosage. Formuler un comprimé revient alors à agencer différents ingrédients sous forme de comprimé permettant une livraison convenable du ou des PA formulés avec des excipients tels que les agents liants,

diluants, désintégrants, lubrifiants, substances capables de faciliter la fabrication, l'administration ou l'absorption et la livraison du PA dans le tractus gastro-intestinal dont la durée de livraison diffère d'une formulation à l'autre.

En général, un comprimé est la forme de dosage solide obtenue par compression directe de la formulation pour une administration orale destinée à produire la réponse pharmacologique désirée. Dans la majorité des cas, des traitements préalables dus à des propriétés (taille des particules, morphologie, flowabilité, solubilité) non idéales du PA sont souvent nécessaires (Leane et *al.*, 2015 ; Hayashi et *al.*, 2018 ; Chatteraj and Sun, 2018). Les comprimés, enrobés ou non, sont les formes de dosage pharmaceutique les plus répandues (Debotton et Dahan, 2017), constituant plus de 70 % des produits pharmaceutiques sur le marché (Gupta et *al.*, 2009 ; Park et *al.*, 2011). Un comprimé peut toutefois contenir un ou plusieurs ingrédients actifs (Griffen et *al.*, 2015 ; Ba et *al.*, 2018 ; Khan et *al.*, 2018), conditionnant l'agencement du PA et des ingrédients sous forme de différentes couches ou monolithiques.

4.2 Types de comprimés en forme de dosage à administration orale

Les comprimés pourraient être regroupés en fonction du nombre de couches. Ainsi se distinguent les comprimés monolithiques (Hani et *al.*, 2017; Le Tien et Mateescu, 2017) et les comprimés "multilayer" majoritairement représentés par les comprimés bilayer (Elzayat et *al.*, 2017; Chang et *al.*, 2017; Castrati et *al.*, 2018). L'option pour le type de comprimé est principalement favorisée par le nombre de PA et, lorsqu'ils sont plusieurs, par leur compatibilité et par leur mode de livraison, simultané ou non (Fig. 4.1).

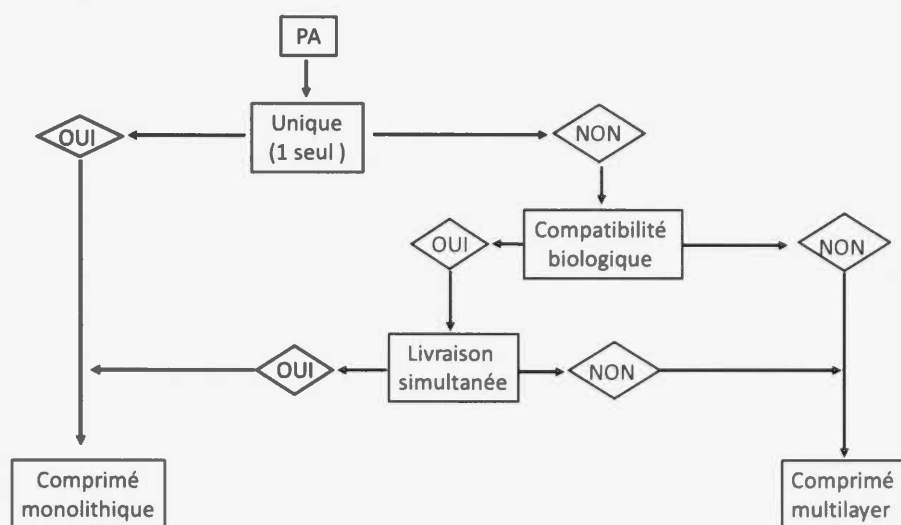


Fig 4.1: Arbre de décision du concept ou du type de comprimés en forme de dosage à administration orale. Principe actif (PA), *multilayer* (multicouches).

Alors que les comprimés monolithiques sont formés d'un seul bloc, les comprimés bilayer ou multilayer sont constitués de plusieurs couches liées les unes aux autres (Fig. 4.2). Les comprimés monolithiques sont la forme la plus ancienne (traditionnelle) de comprimés (Davis et *al.*, 1984) fréquemment développés (Kumar et *al.*, 2018, Sadia et *al.*, 2018).

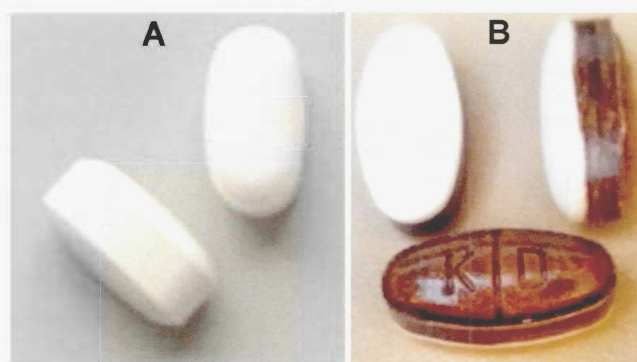


Fig 4.2: Types de comprimés en forme de dosage à administration orale, A) comprimés monolithiques, B) comprimés bilayer

4.3 Types de formulation sous forme de comprimés pour administration orale

La formulation des comprimés est déterminante pour leur efficacité, dans le sens que la livraison du PA (lieu, période et durée de livraison, quantité libérée) est conditionnée par le type de formulation. En effet, après l'administration orale d'une forme de dosage solide, la substance pharmaceutique active est libérée, absorbée, distribuée et métabolisée pour faire valoir son effet thérapeutique, puis excrétée. Ce sont les étapes classiques du système LADMER (libération, absorption, distribution, métabolisme, excrétion, réponse thérapeutique) (Aiache et *al.*, 2007). L'étape initiale, qui est la libération du principe actif, est fortement conditionnée par la formulation du comprimé. L'on distingue la formulation à libération classique et celle à libération contrôlée (Fig 4.3).

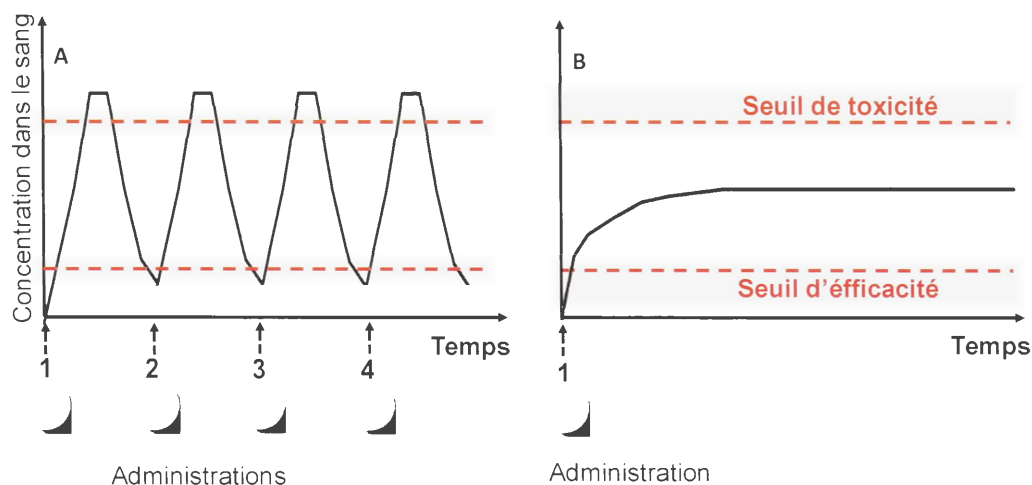


Fig. 4.3: Schéma illustrant la variation de la concentration de l'ingrédient pharmaceutique actif dans le sang suite à l'administration orale de comprimés à libération immédiate (conventionnelle) (A) et à libération contrôlée (prolongée ou ralentie) (B).

La libération classique (conventionnelle) est non contrôlée et souvent rapide. Avec ce type de formulation, le maintien de la dose efficace pendant une longue durée nécessite des administrations à répétition du comprimé par intervalle de temps et la substance active est principalement libérée au niveau gastrique, tandis que les comprimés à libération contrôlée sont capables de fournir en une seule dose la concentration efficace du PA pendant une longue période et peuvent libérer la substance active à l'endroit voulu (gastrique et/ou intestinal) et en quantité désirée en fonction du temps (Le Tien et Mateescu, 2017 ; Pinto et *al.*, 2018). Cette formulation regroupe toutes les formes de libérations modifiées (prolongée, retardée, etc.). Cependant, Le Tien et Mateescu (2017) l'ont réalisé avec un principe actif en une formulation monolithique en forme de dosage solide, avec deux taux de libération distincts, une libération initiale rapide pendant 30 min en milieu gastrique suivie d'une libération lente pendant 12 h en milieu gastrique et intestinal (Fig. 4.4). La formulation à libération contrôlée délivre localement ou systématiquement la substance active à un taux prédéterminé pour une période de temps (Chen et *al.* 2010 ; Le Tien et Mateescu, 2017 ; Yang, G et *al.*, 2018).

4.4 Facteurs influençant la formulation de comprimé

Quel que soit le type de formulation, son développement est influencé par plusieurs facteurs dont les ingrédients utilisés, à savoir l'ingrédient pharmaceutique actif et les excipients.

4.4.1 Le principe actif

Dans la formulation, le principe actif est le premier élément déterminant. Ses caractéristiques sont des facteurs orientant la formulation, surtout pour les formes de dosage solide; ce sont, la classe pharmaceutique (solubilité et perméabilité), le comportement (sensibilité) dans les milieux gastro-intestinaux et la coulabilité. Aussi des facteurs tels que le lieu (site) de livraison du principe actif, ainsi que le profil de

libération adéquat (le taux de principe actif libéré en un temps donné, la période de temps de livraison) et le pourcentage du principe actif influencent la formulation.

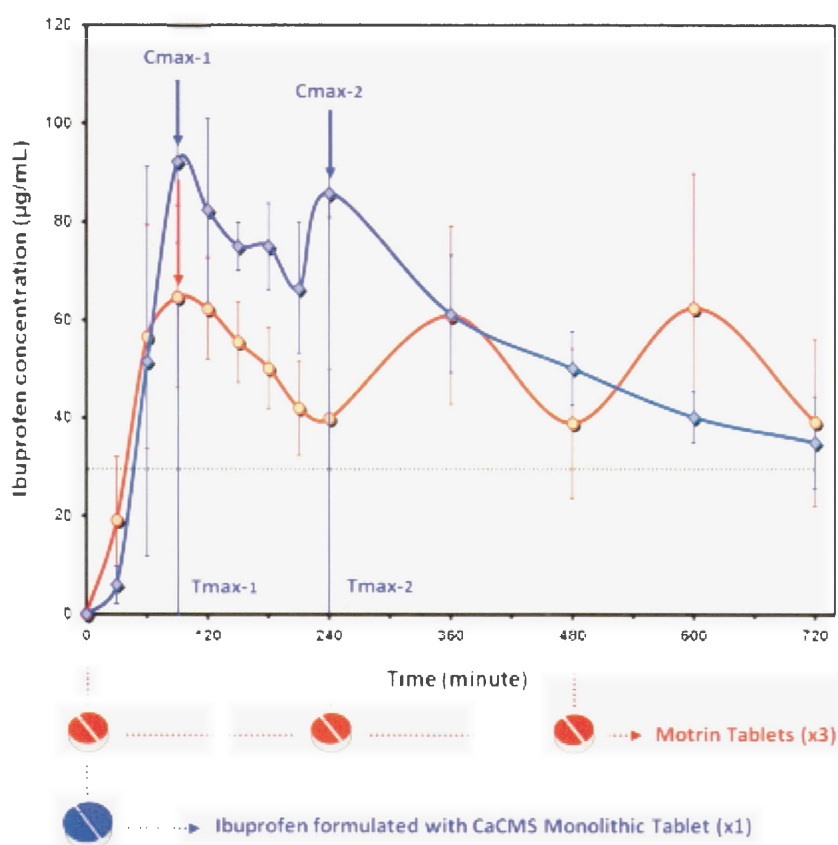


Fig. 4.4: Profil pharmacocinétique de l'ibuprofène (400 mg x 1 comprimé) formulé en comprimé monolithique à libération contrôlée avec deux taux de libération (2RR) en utilisant la matrice calcium carboxyméthyl-amidon comparé avec le profil de libération de la formulation à libération immédiate du Motrin[®] commercial (ibuprofène 200 mg x 3 comprimés) sur des chiens *Beagle* (Le Tien et Mateescu, 2017).

4.4.1.1 Classes pharmaceutiques

Les ingrédients pharmaceutiques actifs sont classifiés selon le système de classification biopharmaceutique (Amidon et *al.*, 1995; Hilfinger, 2009; FDA, 2000 ; Yu et *al.*, 2002).

Ce système, basé sur la solubilité gastro-intestinale et la perméabilité intestinale des ingrédients pharmaceutiques actifs, permet de les regrouper en quatre classes (Fig 4.5) :

Classe I : Haute Solubilité-Haute Perméabilité

Classe II : Faible Solubilité-Haute Perméabilité

Classe III : Haute Solubilité-Faible Perméabilité

Classe IV : Faible Solubilité-Faible Perméabilité

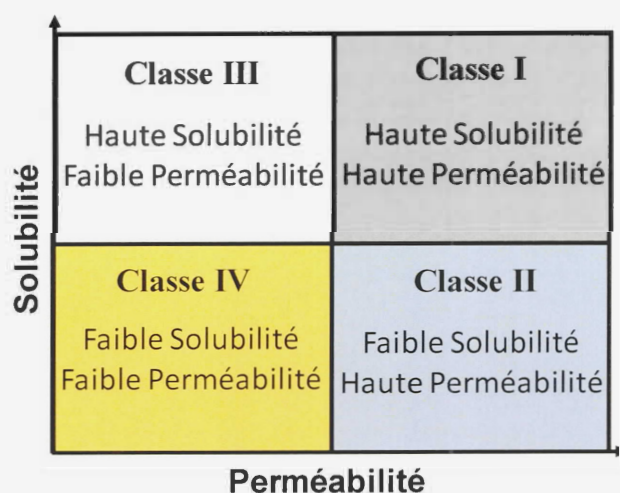


Fig. 4.5: Classes des médicaments selon le Système de Classification Biopharmaceutique des médicaments (Amidon et *al.*, 1995)

Les médicaments de la classe I sont aisément formulables tandis que les autres le sont moins. La biodisponibilité des médicaments est limitée par leur solubilité pour les classes II et IV et par leur perméabilité pour la classe III. De ce fait, leur formulation requiert des traitements préalables pour assurer une biodisponibilité consistante ou nécessite l'emploi de divers excipients (Krishnaiah, 2010 ; Kawabata et *al.*, 2011), entraînant une difficile optimisation de la formulation. Dès lors, les formulations à libération contrôlée sont difficiles à concevoir avec des médicaments faiblement

solubles en milieu aqueux, alors que ceux à solubilité élevée sont présentés comme des candidats appropriés (Fan et *al.*, 2012).

La faible solubilité aqueuse est le problème majeur rencontré lors du développement de formulation de nouveaux composés chimiques (Sharma et *al.*, 2009). Recemment, 40-70% de ces nouveaux composés présentaient une faible solubilité en milieu aqueux (Haus, 2007). Ainsi, la solubilité des médicaments joue un rôle important dans la formulation par son influence sur la quantité du principe actif libéré à partir du comprimé (Furlanetto et *al.*, 2006). Elle constitue avec la perméabilité, les paramètres importants pour la biodisponibilité des médicaments. La cause de la faible biodisponibilité est la solubilité réduite et la basse perméabilité (Kerns et Di, 2008a et 2008b). La solubilité dans le milieu intestinal aqueux et la perméabilité à travers la membrane intestinale sont les deux paramètres clés gouvernant l'absorption suite l'administration orale du comprimé (Dahan et *al.*, 2009 ; Martinez et *al.*, 2002). La solubilité et la perméabilité régissent la cinétique et le degré d'absorption du médicament par voie orale à partir des formes de dosage solides et, finalement, la biodisponibilité (Yu et *al.*, 2002). La classe du médicament est donc fondamentale dans la formulation des formes de dosage solides à administration orale.

4.4.1.2 Stabilité dans les fluides physiologiques et lieu de livraison

En fonction de la stabilité ou non de l'ingrédient pharmaceutique actif dans l'acidité gastrique, la formulation pourrait être orientée pour une libération immédiate (en cas de résistance) ou pour une libération contrôlée (intestinale) en vue de protéger le principe actif pour une action optimale. De ce fait, il est libéré en milieu gastrique et/ou intestinal au moyen de la formulation (Le Tien et Mateescu 2017 ; Agrawal et *al.*, 2018 ; Kumar et *al.*, 2018).

4.4.1.3 Écoulement des poudres (PA et excipients)

Pour obtenir des comprimés, la formulation est suivie par l'étape de compression dans des moules pour presse à comprimés dont le remplissage est fonction de l'écoulement des poudres y compris le principe actif. En effet, le moule (*die*) est rempli par la poudre issue de la formulation pour compression. Le placement de la poudre dans le moule dépend de sa coulabilité qui est modulée par des propriétés physiques particulières telles que la taille, la densité et la forme. (Hirschberg et *al.*, 2016). En fonction de la capacité d'écoulement du principe actif, la formulation est adaptée (Abe et *al.*, 2009 ; Sunkara et Capece, 2018 ; Gao, 2018) pour un meilleur remplissage du moule.

4.4.1.4 Profil de libération du principe actif

Outre les facteurs énumérés ci-dessus, la formulation en forme de dosage solide est aussi conditionnée par le profil de libération envisagé. Elle peut viser une libération graduelle, retardée ou soutenue du médicament sur une longue durée. Elle peut inclure la libération à plusieurs vitesses, une libération en différentes phases successives ou concomitantes lorsqu'il y a plusieurs principes actifs (Garcia et *al.*, 2018). Des formulations en deux phases de libération ont permis la libération immédiate d'un taux spécifique de la charge du médicament suivi par une autre phase avec une libération plus lente et prolongée du reste du médicament (Le Tien et Mateescu, 2017). Une libération biphasique du diclophénac (formulation multi-couche) a été réalisée par Elzayat et ses collaborateurs (2017).

4.4.2 Excipients

Les excipients sont toutes substances autres que les ingrédients pharmaceutiques actifs utilisées dans la composition d'une forme de dosage. Ces ingrédients inactifs ont différents rôles dans la formulation, entre autres, l'aide à garantir la stabilité chimique, la biodisponibilité, le contrôle de la dissolution et de la solubilité de l'ingrédient actif (Byrn, et *al.*, 1999 ; USP, 2017a ; Shetty et *al.*, 2018) et peuvent influencer la livraison

du PA (Kalasz et Antal, 2006). Ils sont les composants majeurs de la plupart des formes des dosages de médicaments, ainsi que dans l'alimentation, la cosmétique et dans les suppléments diététiques (USP, 2017a). Leur utilisation dans la formulation influence celle-ci. Ils affectent directement la dissolution du principe actif présent dans le comprimé (Ghayas et *al.*, 2013, Asmawi et *al.*, 2018). Les différents excipients sont sélectionnés pour la formulation en fonction de leur utilité dans la dissolution de comprimé, permettant d'obtenir des profils de dissolution sur mesure pour les formes solides à administration orale (Rahman et *al.*, 2017 ; Salandova et *al.*, 2018 ; Zaheer et Langguth, 2018). Le taux de dissolution des ingrédients pharmaceutiques actifs peut être drastiquement modifié en présence de différents excipients incluant la matrice (système de livraison), les diluants, liants et désintégrants (Shazly et Mohsin, 2015; Ubaid et Murtaza, 2018; Lupi et *al.*, 2018).

4.4.2.1 Matrice ou système de livraison

Le type de formulation en forme de dosage solide est déterminé par le système de livraison utilisée, qui apparaît comme une approche attractive dans la libération contrôlée (Cardinal et *al.*, 1984; Turato et *al.*, 2017; Le Tien et Mateescu, 2017; Tan and Wu, 2018). Des polysaccharides sont couramment utilisés à cet effet (Le Tien et Mateescu, 2017; Kaczmarek et *al.*, 2018; Debele et *al.*, 2018), dus à leur biodégradabilité, biocompatibilité et non-toxicité (Jian et *al.*, 2012; Rodrigues et *al.*, 2015) et sont facilement dérivables (Saravanakumar et *al.*, 2012; Gao et *al.*, 2017 ; Tan and Wu, 2018).

- Amidon et dérivés

L'Amidon (Fig. 4.6) et ses dérivés sont largement utilisés comme matrices dans les systèmes de livraison des médicaments (Le Tien et Mateescu 2017; Gao et *al.*, 2017; Alharbi et *al.*, 2018), grâce à l'abondance de ce biomatériau et en raison de son excellente biodégradabilité et de ses caractéristiques de biocompatibilité (Meskinfam

et *al.*, 2011). Ce polysaccharide d'origine végétale, composé d'unités de glucose, est la principale substance de réserve la plus abondante des plantes supérieures.

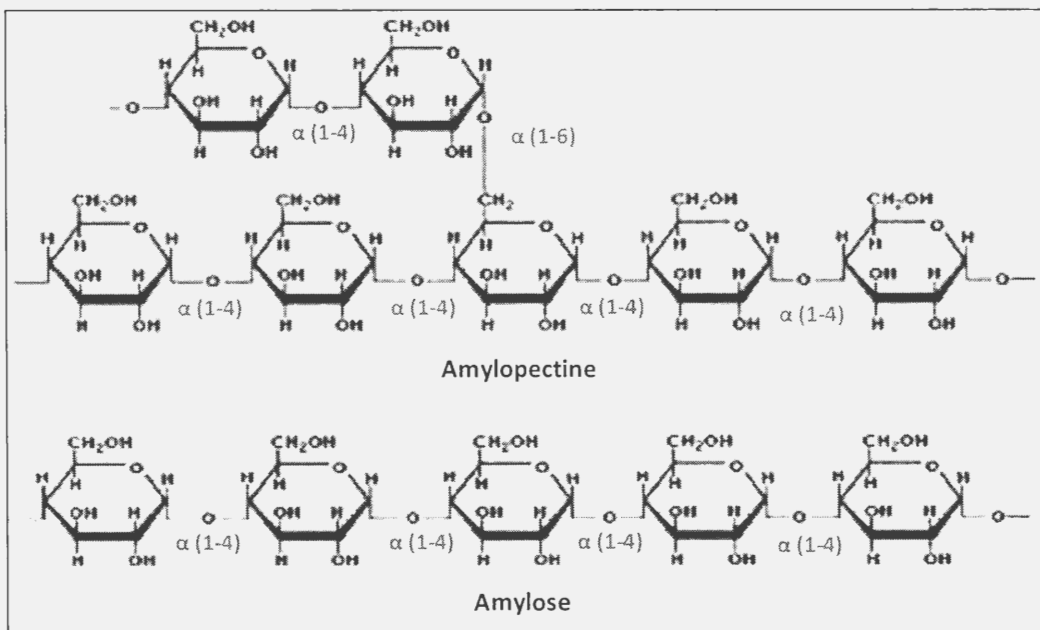


Fig. 4.6: Structure schématique des composés de l'amidon (Amylose et Amylopectine). L'amylose représentant 20-30 % de l'amidon, est un α -polysaccharide constitué de résidus de glucose (200-2000) liés par des liaisons $\alpha(1-4)$ et avec peu de ramifications (1%, à tous les 170-500 résidus), tandis que l'amylopectine (70-80% de l'amidon) est hautement ramifiée, formée par des résidus de glucose (jusqu'à 3.10^6) reliés entre eux par des liaisons $\alpha(1-4)$ et par des liaisons $\alpha(1-6)$ qui sont les ramifications à chaque 20-30 résidus (Oates, 1997 ; Wang et *al.*, 2003 ; Preiss, 2004).

Les dérivés d'amidon sous forme de carboxyméthylamidon (CMA) ont été capables d'assurer un chargement élevé, une résistance gastrique, une livraison adéquate intestinale et une stabilité à long terme des agents bioactifs (Calinescu et *al.*, 2008 ; Zhang et *al.*, 2017). En plus, l'amidon et ses dérivés sont peu dispendieux, faciles à obtenir, versatiles avec un grand nombre de médicament et simple à utiliser dans les formulations par leur compressibilité directe pour l'obtention de formes de dosage solide (Le Tien et Mateescu, 2017; Tan et Wu, 2018; Huang et Huang, 2018).

- Cellulose et dérivés

La cellulose (Fig. 4.7), polysaccharide naturel, omniprésent dans le règne végétal, est constituée de chaînes linéaires (non ramifiées) de haut poids moléculaire (300-15000 résidus de glucose) dans lesquelles les unités saccharidiques sont liées par des liaisons β -1,4-glycosidiques (Liu *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2011). Par une alkylation appropriée, la cellulose peut être dérivée pour former du méthyl-cellulose (MC), de l'hydroxypropyl-cellulose (HPC), de l'hydroxypropylméthyl-cellulose (HPMC) et de nombreuses autres celluloses semi-synthétiques (Merah *et al.*, 2017; He *et al.*, 2017; Miroslav *et al.*, 2018). Elles sont beaucoup prisées pour la livraison de médicaments en forme de dosage solide (Wei *et al.*, 2017; Lobmann and Syaga, 2017; Pawar *et al.*, 2018).

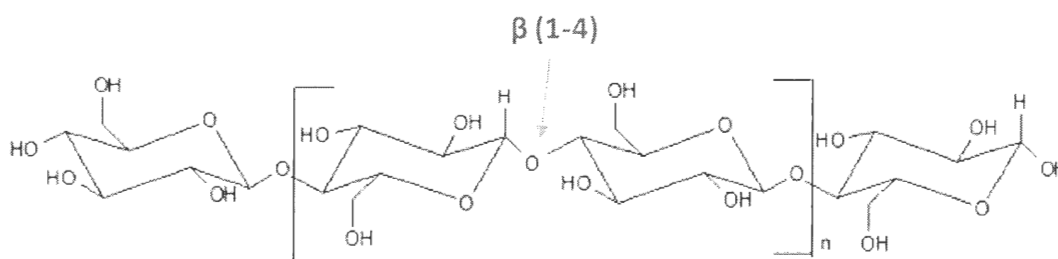


Fig. 4.7: Structure de la cellulose. Polysaccharide linéaire composé de molécules de glucose (> 15) liées par des liaisons β (1-4) glycosidiques.

Plusieurs autres polysaccharides sont aussi utilisés dans les systèmes de livraison de médicaments ; ce sont l'acide hyaluronique (Huang et Huang, 2018), le chitosane (Ashan *et al.*, 2017), l'héparine (Raitman *et al.*, 2018), etc.

4.4.2.2 Autres excipients

Des excipients sont employés dans la formulation des formes de dosage solide à administration orale (Li, Z. *et al.*, 2018). Les ingrédients inactifs communément utilisés dans la formulation de comprimés incluent des agents désintégrants, liants, diluants,

lubrifiants, colorants et autres ingrédients spéciaux pouvant modifier la libération du médicament ou faciliter son absorption (Desai et *al.*, 2016; Abbas et *al.*, 2018; Li, Z. et *al.*, 2018). Un des défis dans la formulation est le choix d'ingrédients inactifs et la quantité pour chacune des catégories de ces excipients dont chacune pouvait contenir jusqu'à 10-20 ingrédients, selon le *National Formulary* (USP, 2017a).

Les agents désintégrants sont des substances ou mélanges de substances ajoutées aux formulations de médicaments, facilitant la dispersion des comprimés en de petites particules pour une dissolution rapide une fois en contact avec le milieu aqueux dans le tractus gastro-intestinal (Onuki et *al.*, 2018). Dans plusieurs des cas, ils sont des facteurs critiques pour la qualité du comprimé (Desai et *al.*, 2016). Les désintégrants peuvent être dérivées d'amidon (amidon de maïs, amidon partiellement pré-gélatinisé, glycolate d'amidon), de cellulose (microcrystalline cellulose, hydroxypropyl cellulose, croscarmellose) et les polyvinylpyrrolidones (povidone, crospovidone) (El-Barghouthi et *al.*, 2008; Desai et *al.*, 2016; Onuki et *al.*, 2018).

Les excipients comme les agents liants sont utilisés dans la formulation pour faciliter l'agglomération des différentes poudres, granules ou autres ingrédients secs de la formulation pour conférer au comprimé la cohésion mécanique nécessaire. Les agents liants incluent les polymères naturels comme l'amidon (réticulé ou gélatinisé), les polymères synthétiques (polyvinylpyrrolidone, méthyl et éthylcellulose, hydroxypropylcellulose), la gélatine et le polyéthylène glycol 4000-6000 (Thoorens et *al.*, 2014; Morkhade et *al.*, 2017)

Les diluants sont utilisés comme agent de remplissage pour avoir la masse requise du comprimé. Ils sont aussi employés pour fournir aux comprimés de meilleures propriétés comme l'amélioration de la cohésion et de la capacité d'écoulement (Solaiman et *al.*, 2016; Turkmen et *al.*, 2018) : ce sont le lactose, le sucrose, le mannitol,

des polysaccharides (amidon, cellulose, microcrystalline cellulose) et autres (Solaiman et *al.*, 2016; Turkmen et *al.*, 2018).

Les lubrifiants facilitent la fabrication des comprimés en réduisant les frictions à l'interface entre la paroi du moule et le comprimé (Ashford, 2002), préservant l'intégrité du comprimé. Ils prolongent la désintégration et ralentissent la dissolution du comprimé (Wang et *al.*, 2010; Ariyasu et *al.*, 2016). Des exemples de lubrifiants sont l'acide stéarique, le stéarate de magnésium, le stéarate de calcium et le talc, constituant les lubrifiants insolubles et les lubrifiants solubles sont le benzoate de sodium, le laurylsulfate de sodium ou dodécylsulfate de sodium, le PEG 400, 600 et 8000.

4.4.3 La force de compression

Toute formulation devient un comprimé à la suite de la compression de celle-ci. La force de compression détermine la quantité d'air emprisonnée dans la matrice et la qualité du comprimé, et est impliquée dans la libération des médicaments (Alderborn et *al.*, 1985; Armstrong and Palfrey, 1989). Cette force est cruciale parmi les facteurs de formulation (Maderuelo et *al.*, 2011).

CHAPITRE V

PRÉSENTATION DU PROJET ET CONTRIBUTION À LA RECHERCHE

Ce chapitre est consacré à la description du projet qui a fait l'objet de cette thèse et à la présentation des réalisations contribuant à la recherche.

5.1 Problématique

Les agents antipaludéens, utilisés en monothérapie contre le paludisme, s'avèrent de plus en plus inefficaces face à des formes de résistance du parasite (Shanks, 2006; Dondorp et *al.*, 2009), surtout du *Plasmodium falciparum*, l'espèce la plus dangereuse et la plus mortelle. L'Artémisinine (Arte), médecine traditionnelle chinoise utilisée par les populations locales il y a plus de 2000 ans, est encore utilisée et commercialisée par Novartis® pour traiter plusieurs dysfonctions et maladies, dont le paludisme. Ce médicament a été extrait et isolé à partir de feuilles d'*Artemisia annua* et est actuellement le principal médicament utilisé contre le paludisme à *Plasmodium falciparum*. En monothérapie, l'Arte inhibe plus rapidement et plus efficacement le métabolisme du parasite que les autres antipaludéens utilisés (Hien and White, 1993).

Cependant, du fait que l'Arte et ses dérivés sont éliminés rapidement avec une demi-vie d'environ 2 heures (Gordi et *al.*, 2002), il existe souvent une réapparition du paludisme après administration de ces médicaments en monothérapie (Taylor et White

2004; OMS, 2005). Récemment des résistances ont été observées aux abords de la Thaïlande et du Cambodge (Dondorp et *al.*, 2009; Tilley et *al.*, 2016).

Pour surmonter ces problèmes, l'OMS recommande l'utilisation de Combinaisons Thérapeutiques à base d'Arte (CTAs) efficaces contre toutes les espèces de *Plasmodium* (Borrmann et *al.*, 2002; Mutabingwa, 2005). En conséquence, l'intérêt pour une thérapie combinée à base d'Arte s'est accru au cours de la dernière décennie. Bien qu'il existe de nombreux traitements combinés sur le marché, ils sont coûteux, à libération immédiate et majoritairement les agents actifs dans ces associations n'agissent qu'au niveau d'un nombre limité de stades de développement du *Plasmodium*. Ainsi, leur efficacité est insatisfaisante malgré leur coût élevé. De plus, certaines combinaisons présentent des effets secondaires considérables (problèmes cardiaques : tachycardie et bradycardie, vomissement, évanouissement, manques d'appétit et de sommeil).

Karici Diagnostics (une société canadienne), spécialisée dans le développement de diagnostics de maladies neurodégénératives et de traitements de maladies infectieuses, a développé un agent antipaludéen naturel extrait d'une plante, *Peschiera fuchsiaefolia* (Pf). Dans le but de répondre aux recommandations de l'OMS pour le traitement du paludisme, Karici Diagnostics a mis l'accent sur la formulation de combinaison, particulièrement d'Arte associée à la Pf. À notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur la formulation de comprimé en CTA associant ces deux agents. D'autre part, les CTAs existantes sont presque toutes à libération immédiate.

L'activité antipaludique de l'extrait de Pf est principalement attribuable à des alcaloïdes bisindoliques, en particulier à la voacamine (Ramanitrahasimbola et *al.*, 2001) dont son activité antioxydante serait à l'origine. Cet extrait agit contre le *Plasmodium* à ses deux

stades de développement, hépatique et érythrocytaire (Ramanitrahasimbola et *al.*, 2001).

Aussi, les alcaloïdes bisindoliques des extraits de Pf peuvent agir comme inhibiteurs de l'action de la P-glycoprotéine (Meschini et *al.*, 2003) dont un analogue est produit par le parasite pour se protéger contre tout traitement. Cette action inhibitrice pourrait favoriser la biodisponibilité de l'Arte et prolonger sa demi-vie, ce qui augmenterait son activité antiplasmodiale, surtout pour les souches résistantes de *Plasmodium*. En général, les alcaloïdes sont des molécules peu solubles et avec une biodisponibilité limitée. Ces molécules produisent un effet thérapeutique rapide, mais possèdent une demi-vie biologique courte (Sethi et *al.*, 1984). Par conséquent, des administrations souvent répétées sont nécessaires. C'est pourquoi l'utilisation des formulations à libération contrôlée (de longue durée d'action) est appropriée.

L'Arte et la Pf sont toutes deux d'origine naturelle et sont lipophiles. De ce fait, il est difficile de les formuler en combinaison thérapeutique à libération contrôlée. Toutefois, des travaux précédents (Mulhbachter et *al.*, 2001; Le Tien et *al.*, 2003 ; Calinescu et *al.*, 2008) ont abouti à une série de polymères biocompatibles comme matrices pour plusieurs applications biomédicales et pharmaceutiques, en particulier pour la livraison contrôlée de médicaments. Ces polymères fonctionnalisés ont été abordés comme excipients pour fournir une libération différentielle d'agents antimalaria.

D'autre part, chaque année, les élevages de porcs et aviaires sont touchés en certaines mesures par des maladies infectieuses comme l'entérite hémorragique, la brucellose et la salmonellose. La source de la contamination peut souvent être durant le sevrage (porcs) ou l'élevage (porcs et aviaires). Il est donc important que ces animaux d'élevages soient protégés contre des agents pathogènes. Actuellement, l'utilisation des antibiotiques contre ces agents pathogènes est de plus en plus limitée due à la diminution de la sensibilité ou à l'apparition de souches résistantes, ce qui nécessite des doses administrées de plus en plus élevées. Les méthodes alternatives comme

l'utilisation des produits naturels d'origine végétale sont préférables pour les fermes d'élevage et les consommateurs.

Les alcaloïdes bisindoliques constituant l'extrait de Pf semblent être de bons candidats. Cet extrait de plante a déjà été utilisé contre certaines maladies telles que la leishmaniose, la bilharziose et l'amibiase. Leur mécanisme d'action (Federici et *al.*, 2000; Meschini et *al.*, 2003) pourrait s'avérer efficace contre les agents pathogènes comme *E. coli*, *Listeria* et *Salmonella*.

5.2 Hypothèses de travail

La Pf et l'Arte pourraient être formulées en CTA à libération contrôlée utilisant des excipients adéquats d'origine naturelle, offrant une libération libération lente pour assurer une efficacité à long terme de l'activité antipaludique. Aussi la Pf pourrait être proposée comme une alternative pour le traitement préventif ou curatif de maladies infectieuses chez les porcs et poulets, contre *E. coli*, *Listeria* et *Salmonella*

5.3 Objectifs de recherche

L'objectif central du projet est de développer une formulation de comprimés type monolithique associant deux agents antiplasmodiaux en utilisant un polysaccharide carboxyméthylé (CMP) comme excipient permettant une libération différentielle et prolongée des deux agents actifs : l'Arte (déjà utilisée) et l'extrait de Pf (moins connu).

La formulation recherchée visait à permettre un relargage simultané, mais à des vitesses différentes des deux actifs avec une libération totale en 8 h pour l'Arte et 10 h pour la Pf, afin d'obtenir des meilleurs effets additifs et continus du traitement. L'Arte ayant une action rapide et une demi-vie biologique courte (2 h), son activité sera soutenue

par une deuxième activité antipaludique, celle de la Pf permettant une action antiplasmodiale régulière, plus longue et plus efficace.

Pour assurer la charge élevée des agents actifs, la résistance gastrique et intestinale et la livraison adéquate, ainsi que pour la stabilité à long terme, il a fallu une matrice à base de polysaccharides fonctionnalisés (le carboxyméthylamidon, développé au laboratoire du Prof. Mateescu à l'UQAM, puis le carboxyméthylcellulose, déjà approuvé et commercialement disponible). Le défi dans ce projet concernait non seulement la formulation, mais également le choix d'excipients adéquats (permettant d'améliorer la biodisponibilité et favorisant un bon suivi du traitement par le patient).

Ces agents antipaludiques proposés proviennent de sources naturelles et leur association est nouvelle. Comme il n'existe aucune méthode standard pour mesurer ces actifs, en particulier pour les études de cinétique de libération dans les fluides biologiques, un autre défi a été l'élaboration de méthodes appropriées pour l'évaluation quantitative de la Pf et de l'Arte dans cette association médicamenteuse à base d'Arte (CTA) pour la libération contrôlée.

Les objectifs spécifiques ont été les suivants:

1. Développer une approche d'évaluation rapide de l'activité antioxydante dont la Pf était soupçonnée en avoir (Chapitre VI);
2. Améliorer la solubilité et stabiliser la Pf pour faciliter sa formulation pour une libération prolongée (Chapitre VII);
3. Développer des méthodes de dosage pour Pf et l'Arte séparément et ensemble, l'une en présence de l'autre, en association et une méthode simple et précise pour l'évaluation de la solubilité de Pf (Chapitres VII et VIII);
4. Formuler des comprimés en associant la Pf et l'Arte, en utilisant un polysaccharide carboxyméthylé comme matrice pour une libération prolongée

ainsi que pour l'action antiplasmodiale à longue durée de 8 h pour Arte et 10 h pour Pf (Chapitres VIII et IX);

5. L'extrait de Pf étant trop léger et volumineux, optimiser sa densité (un prétraitement) pour une meilleure manipulation sans influencer les profils de libération des formulations et l'activité antiplasmodiale de Pf, permettant de produire les comprimés à l'échelle industrielle à l'aide des appareils automatique et à multicompression (Chapitre IX).
6. Évaluer les propriétés antibactériennes de la Pf (Annexe B).

Les principales étapes du projet et travaux effectués, constituant l'ensemble du projet, sont présentés schématiquement dans la Figure 5.1.

En résumé, l'extrait de Pf a été complexé avec du carboxyméthylpolysaccharide, le rendant plus soluble et stable; ce qui a permis sa formulation en CTA par association avec l'Artémisinine pour des formulations à libération prolongée à double vitesse, séquentielle ou simultanée, mais différentielle des deux actifs. Aussi, des méthodes ont été développées pour les évaluations de l'activité antioxydante et de la solubilité et pour la quantification de la Pf et de l'Arte. Une approche de prétraitement de l'extrait de Pf (sous forme de poudre volumineuse et légère) a été proposée pour réduire considérablement sa densité, sans influence majeure sur le profil de libération des différentes formulations de comprimés et sur sa capacité antioxydante. Elle a pour avantage de densifier l'extrait de Pf, et de permettre sa manipulation plus aisée en milieu industriel par l'utilisation de presse à comprimés automatique et de presse à multicompression. Aussi, l'extrait de Pf s'avère efficace contre certaines souches de bactéries.

5.4 Principales contributions à la recherche durant le projet doctoral

Les principaux résultats obtenus (chapitres VII-IX) durant ce projet ont permis d'atteindre nos objectifs et la majorité de ceux-ci ont fait l'objet d'une demande de brevet d'invention (Annexe A). Une partie de ces résultats a déjà été publiée sous forme de 3 articles scientifiques dans des revues avec comité de lecture ou sous forme d'affiches. L'autre partie a été rédigée sous forme de manuscrit d'article scientifique et est maintenant en soumission pour publication.

Articles avec comité de lecture

(Articles publiés et articles soumis pour publication)

Chapitre VI : Konan, K. V., Le Tien, C. et Mateescu, M. A. (2016). «Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay». *Anal Methods*, 8(28), p. 5638-5644

Chapitre VII : Konan, K. V., Le, T.C. et Mateescu, M. A. (2019). «Enhanced solubility of alkaloids by complexation with polycarboxylic materials for controlled release formulation: case of *Peschiera fuchsiaefolia*». *AAPS PharmSciTech*, 20(3), p. 108-119

Chapitre VIII : Konan, K. V., Le, T.C. et Mateescu, M. A. (2019). «Antiplasmodial formulation of Artemisinin combined with *Peschiera fuchsiaefolia* bis-indole alkaloids». Manuscrit soumis pour publication.

Chapitre IX : Konan, K. V., Le, T. C. et Mateescu, M. A. (2019). «Optimization of the density and compactness of dry vegetables bioactive agents: case of *Peschiera fuchsiaefolia* powdered materials». *Powder Technol.*, 347, p. 85-92

Brevet d'invention/propriété intellectuelle

Kouadio Victorien Konan, Mircea Alexandru Mateescu, Controlled release formulation for the treatment of malaria, 2018, US Patent application, 62/739,394.

Colloques et conférences (résumés publiés)

K.V. Konan, T.C. Le, C.A. Gagnon et M.A. Mateescu, 2018. (Poster), Alcaloïdes bisindoliques comme agent antibactérien d'origine naturelle. 11^e symposium annuel du CRIPA (Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Aviaire), Saint-Hyacinthe (Qc), Canada.

Konan K.V., Le T.C. et Mateescu M.A, 2016. (Poster), Activation rapide de l'ABTS pour la détermination des propriétés de piégeage de certains agents antioxydants. *Colloque annuel BioMed*, Laval (Qc), Canada.

Cissé S, Le TC, Konan KV et Mateescu MA, 2014. (Présentation orale), «Carboxymethyl Starch (CMS): Biocompatible Carrier for Controlled Release of Artemisinin Combined Therapy (ACT)». *97th Canadian Chemistry Conference and Exhibition*, Vancouver (BC), Canada.

Le Tien Canh, Cissé Soriba, Konan K. Victorien et Mateescu Mircea A., 2013. (Poster), Carboxymethyl amidon comme excipient pour la libération contrôlée des antipaludéens. *3^{ème} Journée Scientifique RQRM*, Montréal (Qc), Canada

Nouvelles formes pharmaceutiques antipaludéennes

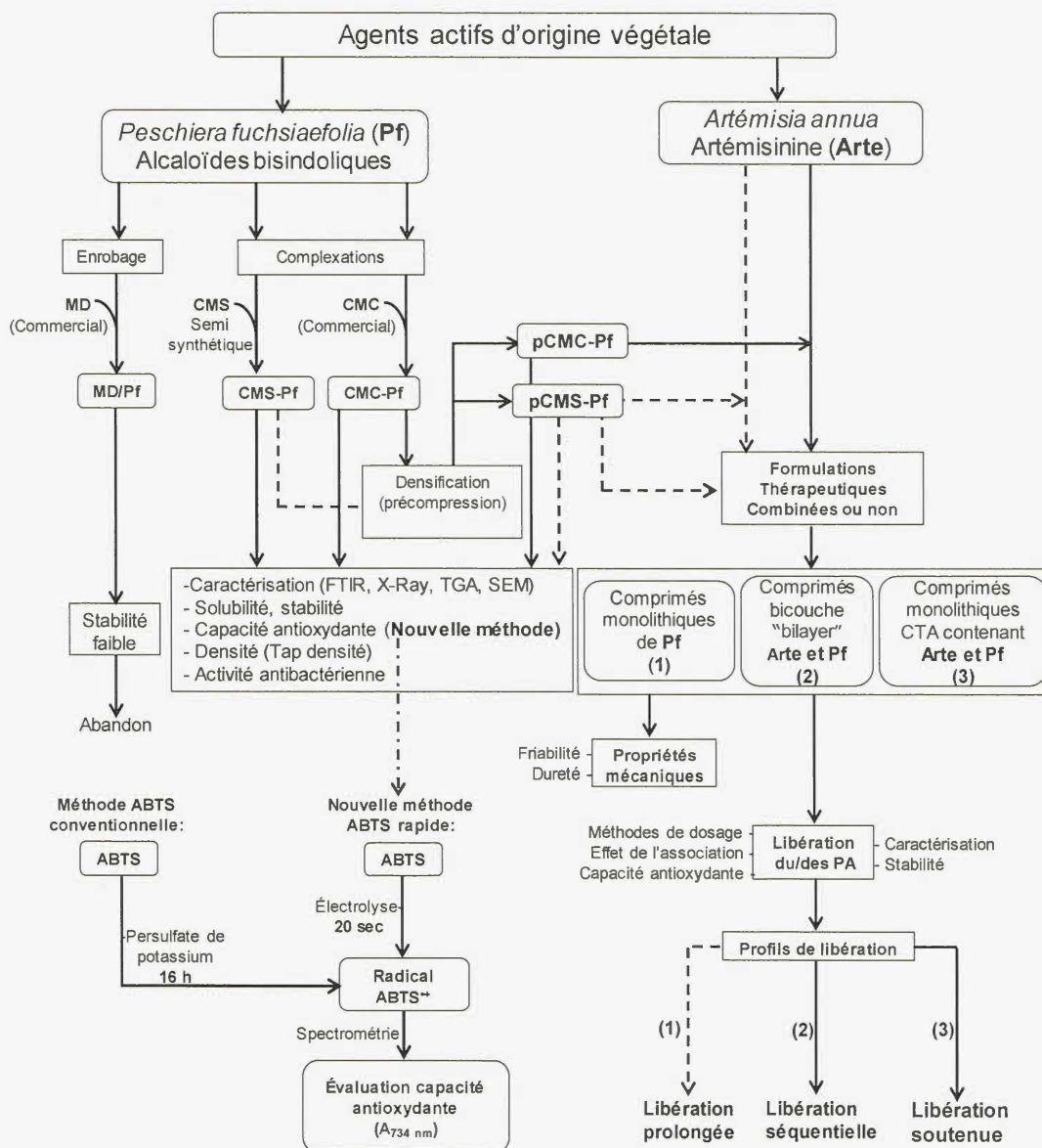


Fig. 5.1 : Présentation schématique des principales étapes du projet de thèse, où MD: Maltodextrine; CMS: *Carboxymethyl starch* (carboxyméthylamidon); CMC: Carboxyméthylcellulose; CTA: Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine; pCMC-Pf: complexe CMC-Pf précompressé; pCMS-Pf: complexe CMS-Pf précompressé; ABTS: acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).

CHAPITRE VI

ARTICLE 1: ACTIVATION RAPIDE DE L'ABTS PAR ÉLECTROLYSE POUR L'ÉVALUATION DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE

Cet article a été publié dans la revue scientifique *Analytical Methods*. Sa référence complète est sous la forme :

Konan, K.V., Le, T.C. & Mateescu, M.A. *Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. Anal. Methods*, 2016, 8, 5638-5644.

Contributions des (co) auteurs

Kouadio Victorien Konan : Expérimentation, analyse des résultats, montage des figures, recherche bibliographique, rédaction et correction du manuscrit.

Tien Canh Le : Supervision des travaux, analyse des résultats et révision du manuscrit

Mircea Alexandru Mateescu : Supervision du projet et révision du manuscrit

6.1 Résumé

Une procédure améliorée de la méthode TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) pour l'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante de certains piègeurs de radicaux, incluant les protéines à cuivre (e.g hémocyanine, céruloplasmine ou diamine oxydase) et des complexes à cuivre (serine₂-cuivre), est présentée. La méthode TEAC consiste en la mesure de la réduction du réactif chromophore, le monocation radicalaire de sel de l'acide 2,2-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) avec une décoloration induite par le piègeur à analyser. Plusieurs inconvénients, particulièrement la longue durée (environ 16 h) pour l'activation de l'ABTS avec le persulfate de potassium (initiateur de radicaux libres), justifient la nécessité d'améliorer ce mode opératoire. Par conséquent, nous proposons une nouvelle procédure consistant en une activation rapide de l'ABTS par électrolyse en environ 20 sec au lieu de 16 h comme requis pour l'activation avec le persulfate de potassium.

En outre, l'activation de l'ABTS par électrolyse fournit un réactif à stabilité améliorée pour 7-8 jours alors que la stabilité dans le cas de la méthode classique est limitée à 3 jours. Le test rapide a été comparé avec l'activation classique au moyen du persulfate de potassium comme méthode pour activer l'ABTS et les résultats ont été exprimés en équivalence de Trolox (piégeur de référence standard). Une bonne linéarité aux réponses en termes de quantité de Trolox a été obtenue avec le test rapide, comme celle avec la méthode classique. Aussi, l'essai rapide semble compatible avec la méthode classique, avec pour seule différence et avantage qu'il est plus rapide et facile à opérer.

Mots clés : Propriétés antioxydantes; Protéines à cuivre; Activation rapide de l'ABTS par électrolyse; Piégeurs de radicaux; Espèces réactives d'oxygène (ERO); Méthode TEAC améliorée

Analytical Methods, 2016, vol. 8, 5638-5644

Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity
assay

K. V. Konan, C. Le Tien and M. A. Mateescu*

Department of Chemistry, Research Chair on enteric dysfunctions "Allerdys" and
Centre BioMed, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Branch A, Montréal
(Québec), H3C 3P8, Canada

*Corresponding author

Phone: +1 (514) 987 4319

Facs: +1 (514) 987 4054

email: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

6.2 Abstract

An improved TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) analytical procedure to evaluate the *in vitro* antioxidant capacity of some radical scavengers, including copper proteins (i.e. hemocyanin, ceruloplasmin or diamine oxidase) and some copper complexes (i.e. serine₂-copper), is described. The TEAC method consists in measuring the reduction of the 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical monocation (ABTS^{•+}) with a decoloration induced by the scavenger to be analyzed. Several disadvantages, such as a particularly long time (about 16 h) for the activation of ABTS with potassium persulfate (free radical initiator), justify the need to improve this operatory mode. Consequently, we propose a new procedure consisting in a rapid activation of ABTS by electrolysis in about 20 sec instead of 16 hours as required by the activation with potassium persulfate. Furthermore, the ABTS activation by electrolysis provides an improved reagent stability for 7-8 days

whereas the stability in the case of the classical method is limited to 3 days. The fast assay was compared with the classical activation with potassium persulfate as a method of reference to activate ABTS and the results were expressed in equivalents of Trolox (standard reference scavenger). A good linearity of the answer in terms of Trolox amounts has been obtained with the fast assay, as with the classical method. Therefore, the fast assay seems compatible with the classical method, with the only difference and advantage that it is much faster and easier to operate.

Keywords: Antioxidant properties; Copper-proteins; ABTS electrolysis fast activation; Radical scavengers; Reactive oxygen species (ROS); TEAC improved method.

6.3 Introduction

Reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$) and the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), are highly reactive towards DNA, lipids and proteins, often causing damage of membranes (Valko *et al.*, 2007; Orrenius *et al.*, 2007). These biochemical changes are frequently involved in cardiovascular dysfunctions, neurodegenerative diseases associated with aging (Alzheimer's, Parkinson's disease), inflammatory diseases, diabetes, tumorigenesis and cancer (Afonso *et al.*, 2007; Sung *et al.*, 2010; Sabharwal and Schumacker, 2014). The ROS can destroy the integrity of DNA, forcing the organisms to protect themselves and triggering their repair systems (Imlay, 2013). Organisms possess several antioxidant molecules to reduce or counteract these ROS. Some components in the antioxidant defence system are specific including the superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) scavenging superoxide as well as catalase (EC 1.11.1.6) and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) acting against hydrogen peroxide.

Others are non-specific antioxidants such as albumin, transferrin and copper proteins (Stocks *et al.*, 1974; Wayner *et al.*, 1987) which among other functions can contribute to the body's defence systems. They are involved in protecting the body against reactive oxygen species (ROS) that cause oxidative stress phenomena thus preventing various pathologies. Several copper proteins are involved in several metabolic reactions and are present in vertebrate (ceruloplasmin, CP; serum amine oxidase) and invertebrate (hemocyanin, HC) animals and plants (diamine oxidase, DAO). The CP is a copper protein (6 copper atoms) present in the blood plasma. Its antioxidant activity has been shown *in vitro* and *ex vivo* (Stocks *et al.*, 1984; Galdston *et al.*, 1984; Dumoulin *et al.*, 1996; Atanasiu *et al.*, 1998; Aouffen *et al.*, 2001; Novikova and Zlotnikova, 2011) with a marked capacity to scavenge several ROS (Goldstein *et al.*, 1979). The HC is a copper protein with two copper atoms, responsible for oxygen transport in the tissues of molluscs and arthropods (Makino, 1985; Van Holde and Miller, 1995; Sanchez-

Maureno et al., 1998). The DAO, also known as histaminase (due to its ability to degrade the histamine), is a copper protein (2 copper atoms) encountered in both plants (peas, chickpeas, lentils) and animals (placenta, kidney and intestinal mucosa vesicular structures). The DAO has a protective effect in post-ischemia reperfusion at the cardiac or intestinal level (Mondovi et al., 2014; Masini et al., 2007). The interest towards the antioxidant biomolecules is continuously growing due to their therapeutic or protective potential benefits in pharmaceuticals, cosmetics and food for the prevention and treatment of several diseases (Aouffen et al., 2001; Lamm et al., 2000; Polla et al., 2007). Over past decades, several methods to quantify antioxidant capacities were developed, each of them for certain fields of applicability and in function of their scavenging specificity. One of the largely used methods to evaluate antioxidant capacities, the ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) assay (Cao et al., 1999; Ou et al., 2001 et 2002; Zulueta et al., 2009), was recently removed from the list of recommended *in vitro* methods by the USDA (United States Department of Agriculture). This was due to the erroneous values of the antioxidant capacity of bioactive components (Haytowitz et Bhagwat, 2010). Consequently, the TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) method or ABTS^{•+} (azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) decolorization assay remained the *in vitro* method recommended for antioxidant capacity determination. In this assay, first reported by Miller and Rice-Evans (1993), ABTS^{•+} radicals are generated through the peroxidase activity of metmyoglobin in the presence of hydrogen peroxide and can easily be detected spectrophotometrically at 734 nm. However, certain interferences lead to overestimation of antioxidant capacity (Strube et al., 1997) due to compounds interfering with the formation of the ABTS^{•+}. Several modifications of the method to generate ABTS^{•+} were proposed using, for instance, chemical reagents such as manganese dioxide (Miller et al., 1996), 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) HCl (ABAP) (Van den Berg et al., 1999) or potassium persulfate (Re et al., 1999) or enzyme reactions with horseradish peroxidase (Amao et al., 1996). In general, chemical

activation (i.e. with potassium persulfate) requires a long time (up to 16 h with potassium persulfate) or high temperatures (60 °C for ABAP generation), whereas enzyme activation is faster, but the reaction mechanism may shift with pH: for example, electron transfer is facilitated at acid pH (Lemanska et al., 2001). An electrochemically generated ABTS radical cation was reported by Ivekovic et al., (2005) using a flow injection analysis system with an electrolysis process for each sample in a flow-through electrolysis cell. This report was aimed to evaluate the assay of the antioxidant capacity *in vitro* of copper bioactive agents such as hemocyanin, ceruloplasmin, diamine oxidase and serine₂-copper complex by the TEAC assay based on a new and fast way to activate ABTS by electrolysis and to compare the new rapid assay with the ABTS activation to ABTS^{•+} radical cations generated by potassium persulfate. The novel activation procedure markedly simplifies the assay reducing the time of operation from about 16 hours to less than one minute and offering a higher stability of the ABTS^{•+} activated reagent.

6.4 Results

6.4.1 ABTS activation by electrolysis

6.4.1.1 Color of the reagent depending on the electrolysis time for ABTS activation.

Native ABTS in a saline solution is colorless. Electrolysis induces a blue-green color with different absorbency intensities associated with the activation as ABTS^{•+} and depending on the electrolysis time (Fig. 6.1). This color changes first from colorless to blue-green (A_{max} 734 nm) and then to yellow-green and orange when the electrolysis time is extended (Fig. 6.1a and 6.1b).

6.4.1.2 Optimized ABTS activation time

The maximal absorbency at 734 nm, corresponding to the radical cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ solution, was obtained in the range of 15 to 35 s of electrolysis. After this interval, there is a decrease in the absorbance intensities at 734 nm (Fig. 6.2) and the characteristic blue-green colour diminishes (Fig. 6.1a and 6.2). Since the maximal absorbency ascribed to ABTS activation ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) was obtained at 15-35 s, the optimal operation time for ELS for the fast TEAC was selected as 20 s, enough for the formation of radical monocations, and obviously advantageous for the rapidity of the assay. Furthermore, it appears that the fast assay fits well with the classical ABTS method based on activation by potassium persulfate, but requiring 16 h for $\text{ABTS}^{\bullet+}$ generation.

6.4.2 Stability of activated $\text{ABTS}^{\bullet+}$

The ABTS activated as $\text{ABTS}^{\bullet+}$ with potassium persulfate (standard activation) is a reagent that can remain stable for three days in the dark at 25 °C. When activated by electrolysis, the stability of $\text{ABTS}^{\bullet+}$ was prolonged to eight days (Fig. 6.3).

6.4.3 The reactivity of activated $\text{ABTS}^{\bullet+}$ reagent versus different concentrations of Trolox

In the presence of Trolox (standard antioxidant) at various concentrations, the absorbance of $\text{ABTS}^{\bullet+}$ activated by a classical method with potassium persulfate was rapidly decreased in response to the Trolox antioxidant scavenging capacity, following by a stabilization of the intensity for the next 1 to 5 min and slowly decreasing after up to 30 min and more (Fig. 6.4a). The same results were obtained with $\text{ABTS}^{\bullet+}$ activated by electrolysis (Fig. 6.4b). The absorbency decrease was linearly proportional to the Trolox concentration.

6.4.4 Antioxidant capacity evaluation

The antioxidant capacities of various scavengers were evaluated by the original method and by the fast TEAC assay and were expressed in Trolox equivalent units per g of

sample. Different scavenging capacities of various agents with known or possible antioxidant properties such as hemocyanin (HC), ceruloplasmin (CP), diamine oxidase (DAO), Bovine Serum Albumin (BSA) and serine2–copper are presented in Table 6.1. For every tested agent, the scavenging values determined by the classical procedure and by the fast assay, were close each other.

6.5 Discussion

Oxidation of ABTS with potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) to generate a $ABTS^{\bullet+}$ radical cation requires the transfer of one electron. Then, under prolonged oxidative conditions, this radical can be transformed into a dication $ABTS^{2+}$ (Scheme 6.1) (Venkatasubramanian and Maruthamuthu, 1989; Branchi *et al.*, 2005). This change can also be obtained by prolonged ELS and is associated with a decoloration and a shift of the maximal absorbency from 734 nm to 514 nm wavelength (Fig. 6.1a and 6.5). The $ABTS^{\bullet+}$ radical cations for the classical method may be formed either by chemical oxidation of ABTS with $K_2S_2O_8$ for about 16 h (Pellegrini *et al.*, 1999; Rice-Evans, 1999) or enzymatically with laccase (EC 1.10.3.2) or horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7) (Lemanska *et al.*, 2001; Cano *et al.*, 1998; Arnao *et al.*, 1999) and this must be done several hours prior to analysis. By electrolysis, which generates free radical species (Jackson *et al.*, 1986; Chahine *et al.*, 1997), the ABTS was rapidly converted by oxidation into $ABTS^{\bullet+}$ radical cations with blue green colour development after only a few s with a maximal oxidation of ABTS achieved in 15 to 35 s of electrolysis (Fig. 6.2). After thirty min of electrolysis, the solution became colorless. The decreasing intensity of green-blue coloration with reduced absorbency at 734 nm is probably due to the degradation of $ABTS^{\bullet+}$. To support the hypothesis that the $ABTS^{\bullet+}$ was degraded, the absorbance of the ABTS electrolyzed solution (ABTS ELS) was read at 280 nm in order to evaluate if the aromatic rings were affected. The absorbencies were determined at 280 nm to check the status (degradation or not) of the $ABTS^{\bullet+}$ aromatic rings by

electrolysis. No differences were detected when compared with the ABTS solution without electrolysis suggesting that the aromatic rings of $\text{ABTS}^{\bullet+}$ evaluated at 280 nm are still preserved (Fig. 6.7). Therefore, they have been apparently stable following electrolysis (400 V, 10 mA), with no degradation. The variation of absorbency between 15 s and 60 s at ELS could be due to the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ double bond delocalization, followed by stabilization (Fig. 6.7). Additionally, an increase of absorbance intensity was observed when the time of ELS was extended (Fig. 6.8). The A_{max} of 734 nm was ascribed to $\text{ABTS}^{\bullet+}$ whereas the shift of the maximal absorbency from 734 nm to 514 nm with maintenance of the absorbency at 280 nm was attributed to the ABTS^{2+} dication formation 50 at prolonged ELS time. After more than 35 s of ELS, the radical cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ was further oxidized to an ABTS^{2+} dication with a change of the colour intensity and with the shift of maximum absorption wavelength followed by a loss of intensity (Fig. 6.1). The purple-red colour identified at a longer ELS time was attributed to the ABTS^{2+} dication. As example, this colour was obtained after ten minutes of electrolysis (Fig. 6.1) and was ascribed to the dication ABTS^{2+} as shown in the absorbency curve (Fig. 6.8). The $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical cation obtained by ELS appeared stable for 7-8 days as shown by the absorbency at 734 nm, whereas the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical cation obtained by the classical assay with potassium persulfate was stable only for 3 days (Fig. 6.3). The presence of potassium persulfate residues in the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical cation solution could favor the recovery of the electrons which had been ceded to ABTS, making the conversion slowly reversible for the classical method and explaining thus the stability being limited to only three days. For activation of ABTS by the present method, there are probably other oxidant species (i.e. hypochlorous acid) generated during electrolysis which may contribute to maintain the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical level. When the electrolysis process is stopped, the generation of electrons is arrested and no other accumulated agents can influence the stability of the resulting $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical. Differently, in the case of the classical method the remaining persulfate can influence the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical stability. This can explain the fact that although the same compound

(ABTS^{•+}) is formed, the stability of the ABTS^{•+} radical cations generated by the classical method remains only for 3 days in comparison with the proposed method with electrolysis, of about 8 days. At the same initial concentration of ABTS, the level of ABTS^{•+} radical cations obtained by the two methods (electrolysis and potassium persulfate) measured by the absorbance at 734 nm showed no significant differences. The absorbency value was maintained for 8 days when ABTS was activated by ELS whereas the value was moderately decreased (by about 20%) after 3 days when ABTS was activated by potassium persulfate at 734 nm showing a better stability of ABTS activated by ELS, as mentioned in Section 6.5.2. For the evaluation of scavenging capacities of various antioxidants, we have followed the quenching of the absorbency at 734 nm as a measure of the scavenging activity of the antioxidant sample against ABTS^{•+} radical cations. In the presence of different concentrations of Trolox (100 mM, 150 mM, 200 mM and 300 mM), the reactivity of the ABTS^{•+} radical cation solution obtained by ELS showed a behavior similar to that of the reactive radical (ABTS^{•+} cation) reagent generated by the classical method. The decrease in absorbance value, equivalent of quenching induced by the reference antioxidant (Trolox), can be followed during an interval of 1-5 min stability (Fig. 6.4 and 6.6). Thereby, an end point value read at any moment of the interval between 1 and 5 min can be effective for the evaluation of the antioxidant sample. The absorbency decrease was more pronounced with the radical ABTS^{•+} reagent when it was produced by ELS. This method offers more sensibility to the absorbance quenching of the ABTS^{•+} solution and more rapidity to the assay. Trolox equivalent antioxidant capacities of different samples (hemocyanin, ceruloplasmin, diamine oxidase, bovine serum albumin and serine₂-copper) were each evaluated separately with a solution of ABTS^{•+} radical cations obtained by activation with potassium persulfate and by ELS and compared with the antioxidant capacities of different concentrations of Trolox. No marked differences between the TEAC values with ABTS^{•+} obtained by the classical activation (with potassium persulfate) and by the ELS were found (Table 6.1). The fast assay was also compared with the classical

activation with potassium persulfate as the method of reference to activate ABTS. A good linearity of the answer in terms of Trolox amounts has been obtained. Therefore, the fast method seems compatible with the classical method, with the only difference and advantage that it is much faster and easier to operate with a larger stability of the $\text{ABTS}^{•+}$ reagent obtained by the fast assay. The chosen parameters of electrolysis voltage of 400 V with current of 10 mA were justified by previous studies. In fact, similar parameters have been used previously (Dumoulin *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 1986) to generate oxidative damage simulating post-ischemia-reperfusion on isolated rat heart. In our case, at higher than 400 V electrolysis voltage or higher current the amount of electric charges per unit time increases; so the ABTS will be oxidized faster (less than 20 seconds, possibly with undesired dication formation, but it is difficult to make a statement on stability). The optimal electrolysis time may depend on the concentration of ABTS used. However, for this TEAC method, the chromophore reagent ($\text{ABTS}^{•+}$ radical cation solution) should be diluted so as to have an absorbency of 0.7 (± 0.02) before use. A moderate-low concentration (0.14 mM) of native ABTS allows to reach this intensity. The concentration of ABTS used in Fig. 6.1 and 6.2 is the same.

6.6 Conclusion

Commonly used to evaluate the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), the $\text{ABTS}^{•+}$ radical cation evanescence classical assay was improved by a fast ABTS activation using electrolysis in only about 20 s versus about 16 hours for the classical method. This activation procedure by electrolysis gives similar results in terms of antioxidant capacity values, with the advantage of a faster and easier procedure. In addition, our procedure involves an optimized time of activation and the same batch of activated $\text{ABTS}^{•+}$ reagent, which is stable for several days, can be used for serial sampling.

6.7 Figures, scheme and table

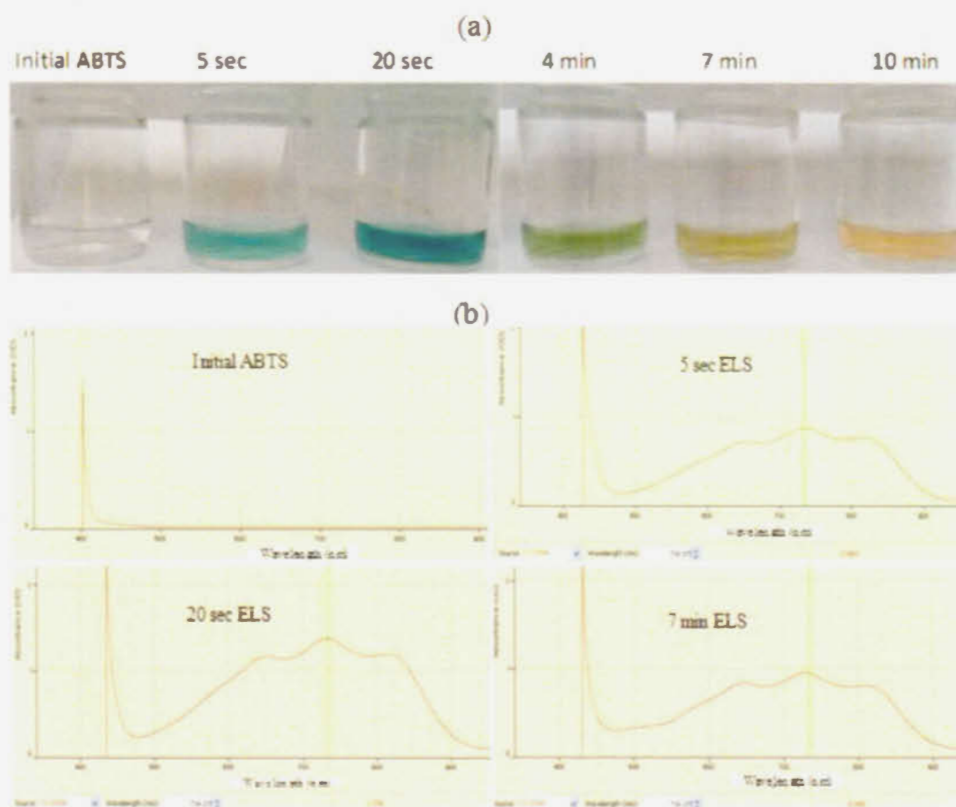


Fig. 6.1: Influence of the electrolysis time on the color intensity (a) and the visible spectra (b) of the activated $\text{ABTS}^{+\bullet}$

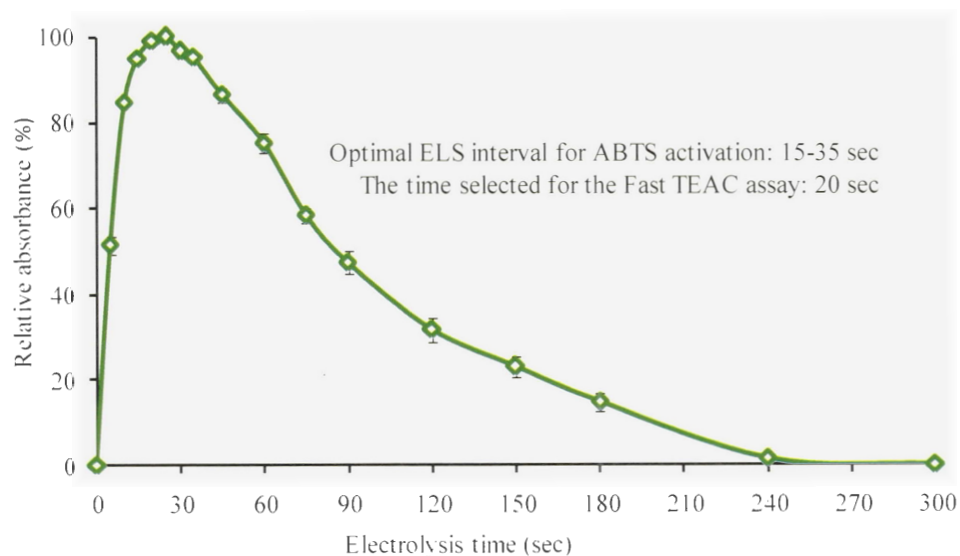


Fig. 6.2: Time course of $A_{\max}$ 734 nm of $\text{ABTS}^{\bullet-}$ at increasing electrolysis time

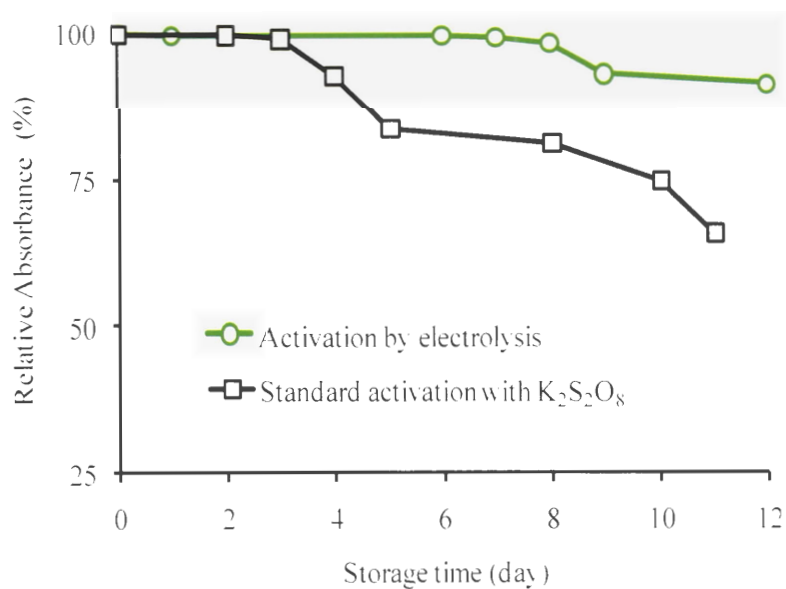


Fig. 6.3: Stability of the $\text{ABTS}^{\bullet-}$ reagent obtained by ABTS activation with potassium persulfate (classical assay) and via ELS (20 sec) for the Fast TEAC assay, as showed by $A_{\max}$ 734 nm

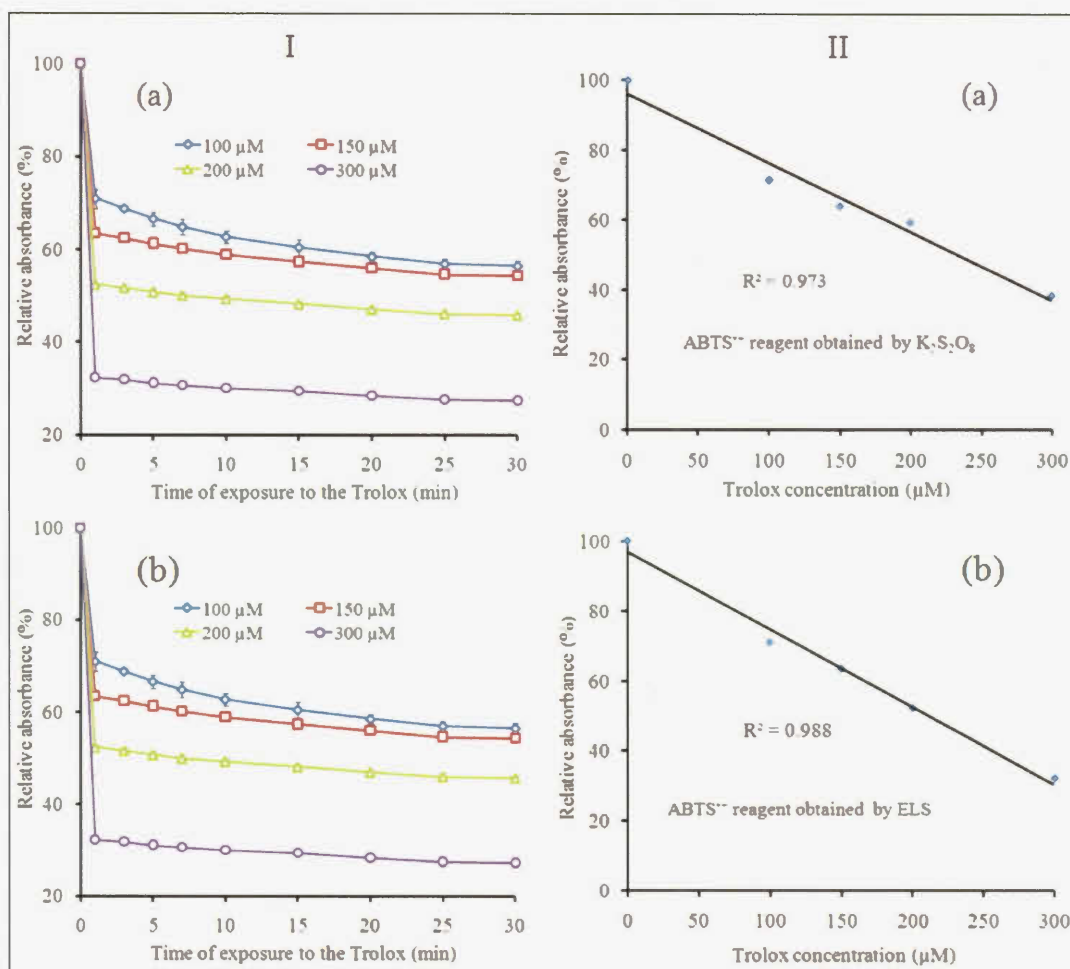
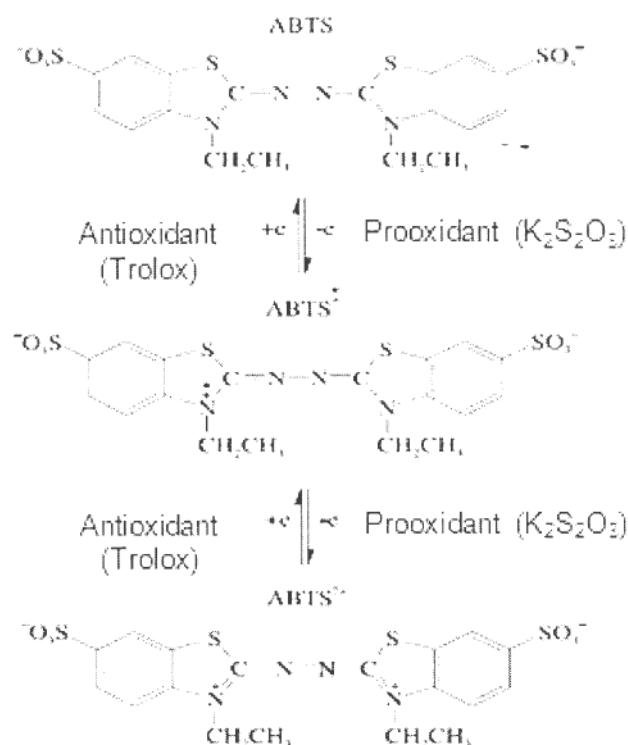


Fig. 6.4: Time course (I) and absorbance dependency (II) of the ABTS $^{\bullet+}$ reagent activated by potassium persulfate (a) classical method and by electrolysis (b) fast method, at different concentrations of Trolox



Scheme 6.1: Hypothetical structures and mechanisms involved in ABTS activation in pro-oxidant conditions and antioxidant scavenging action of Trolox standard, according to Venkatasubramanian and Maruthamuthu, (1989) and Branchi *et al.*, (2005).

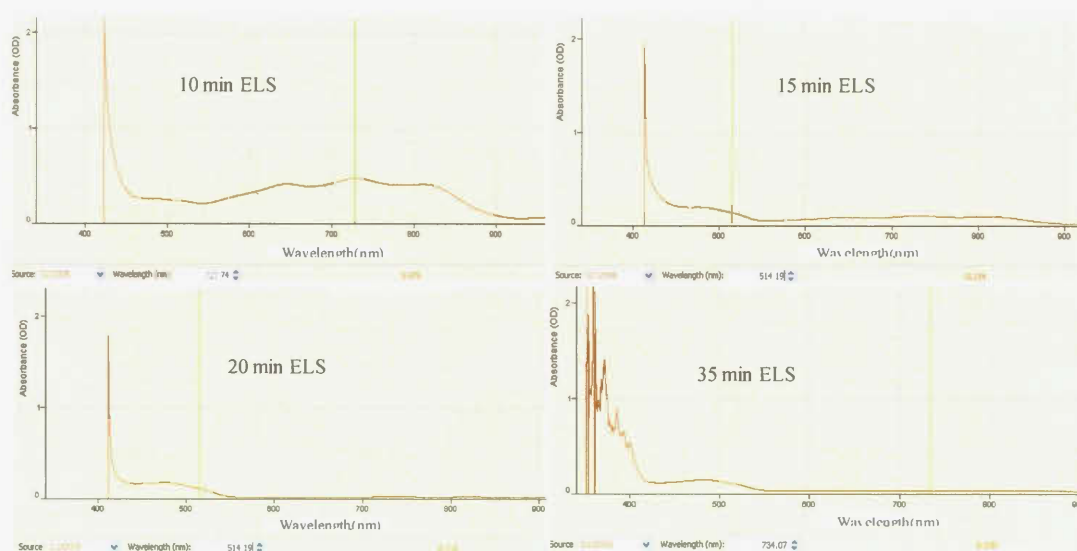


Fig. 6.5: Maximal absorbance wavelength shifts of activated ABTS depending on the electrolysis time

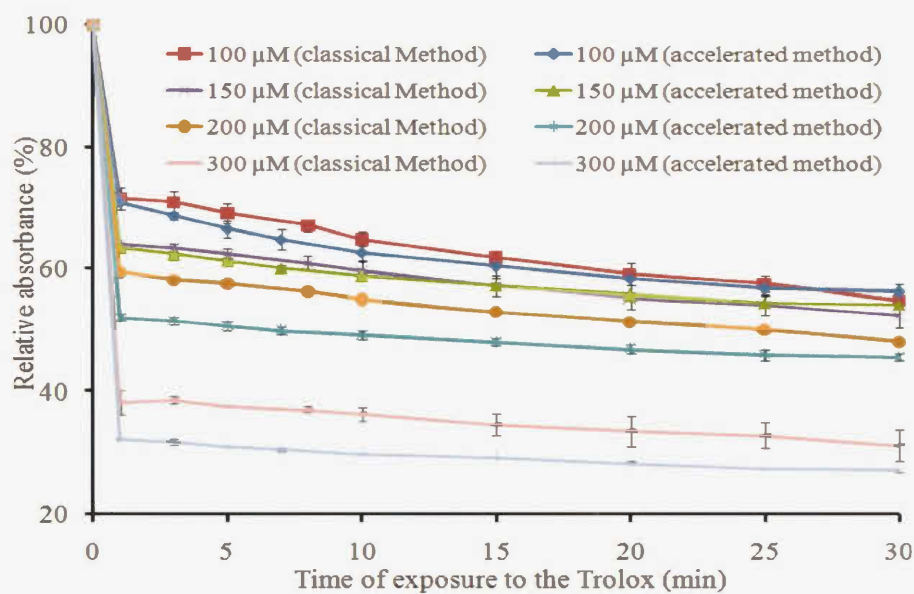


Fig. 6.6: Comparison of time courses of absorbency of ABTS²⁺ reagent in the presence of different concentrations of Trolox

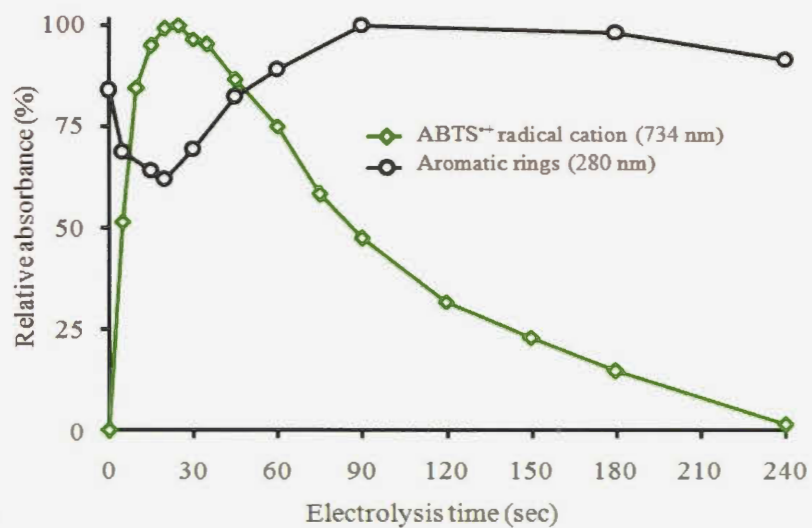


Fig. 6.7: Relative absorbency at 280 nm (aromatic rings of ABTS) at increasing electrolysis time

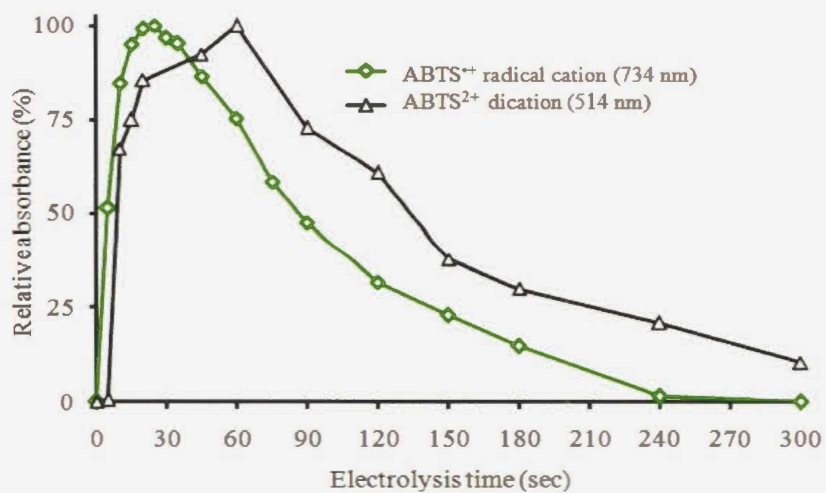


Fig. 6.8: Relative absorbency at 514 nm (ABTS²⁺dication formation) at increasing electrolysis time

Table 6.1: Antioxidant capacity of samples

Samples		HC	CP	DAO	BSA	Serine ₂ copper
Antioxidant capacity (Trolox U/g)	Classical method	18.18 ±5.9	131.17 ±8.7	51.1 ±3.9	56.0 ±3.1	6.1 ±1.5
	Fast method	25.3 ±4.1	132.9 ±4.5	52.4 ±2.4	56.9 ±7.1	4.1 ±1.0

6.8 Experimental

6.8.1 Materials

The ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) diammonium salt (purity 98%) and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid) 97% were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A Trolox antioxidant stock solution (2.5 mM) was prepared in ethanol 50%. Potassium persulfate (99.5%) and sodium chloride (99%) were from Anachemia (Montreal, QC, Canada). The bovine serum was obtained from the blood collected at the Slaughterhouse Tarte (Marieville, QC, Canada). All other reagents used were of analytical grade.

6.8.2 Ceruloplasmin purification

Ceruloplasmin (CP) was purified from bovine plasma by ammonium sulphate fractionations (35 and 55% saturation) followed by a chromatographic single-step separation on aminoethyl-agarose (Ivekovic *et al.*, 2001), obtained by agarose (Superose 6B, Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) treatment with chloroethylamine (Wang *et al.*, 1994). The retained pool of purified CP obtained by elution with 200 mM potassium phosphate at pH 7.2 was electrophoretically homogeneous (Mateescu *et al.*, 1999) with an A_{610}/A_{280} ratio of ≥ 0.04 (a value corresponding to the standard criteria

for the purified enzyme, where A_{610} is given by the blue copper site of CP and $A_{280\text{ nm}}$ by the protein content). It was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, until use.

6.8.3 Enzymatic activities

Ceruloplasmin oxidase activity was determined spectrophotometrically at 540 nm and room temperature ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), according to Osaki's method (Osaki *et al.*, 1966) based on the oxidation of 1 mL p-phenylenediamine (pPDA) reagent (10 mM pPDA in a 0.25 M sodium acetate buffer at pH 5.2, containing 5mM EDTA) in the presence of 50 mL of the CP sample. One enzyme unit was the amount of enzyme (CP) able to oxidize 1.0 mmol of substrate (pPDA) per min at pH 7.0 and $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The activity of DAO was determined using a peroxidase coupled reaction to quantify the released H_2O_2 , as previously described.³⁹ The assay mixture containing 3.2 mL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), 50 mL of peroxidase solution (0.1 mg mL⁻¹), 250 mL of 30 mM N,N-diethyl para-phenylenediamine solution and 1 mL of 30mMputrescine solution was incubated for 5 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Calineescu *et al.*, 2012). The assay started with the addition of DAO for the dosage. After incubation for 10 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, the absorbency was read at 515 nm using an Ocean Optic© fiber optic spectrometer (Winter Park, FL, USA). The standard curve was prepared using various concentrations of H_2O_2 ranging from 0 to 0.4 mM. One enzyme unit (EU) of DAO was considered as the amount of enzyme required to catalyze the oxidation of 1.0 mmol of putrescine per min at pH 7.2 at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hemocyanin phenoloxidase (catecholase) activity was evaluated at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ using 10 mM catechol in a 100 mM phosphate buffer at pH 7 as the substrate. The reaction medium contained 0.5 mL of hemocyanin and 2.5 mL of 10 mM catechol. The absorbance was measured every 30 s for 5 min. One enzyme unit was defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1 mmol of substrate per min at pH 7 and $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.8.4 TEAC method based on ABTS^{•+} generated by potassium persulfate

The Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) original method is based on the scavenging of the blue-green ABTS^{•+} radical cations by electron-donating antioxidants (Miller et al., 1993). The ability of the tested sample to scavenge the ABTS^{•+} radical cations is compared to that of Trolox (structural hydrosoluble analogue of vitamin E) used to establish the standard curve. In the standard procedure, the assay is based on the capacity of the antioxidant to scavenge the blue-green ABTS^{•+} radical cations into colorless ABTS (Miller et al., 1996; Re et al., 1999; Pellegrini et al., 1999).

Practically, for the classical assay, the ABTS^{•+} was produced by reacting 4 mL of 7 mM ABTS solution with 1 mL of 12.25 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈) and maintaining the mixture in the dark at 37 °C for 16 h before use. The ABTS^{•+} solution was then diluted to adjust its absorbance to 0.700 (±0.020) at 734 nm. To determine the antioxidant activity of a substance, 950 µL of a diluted ABTS^{•+} solution was mixed with 50 µL of the substance sample to be evaluated or 50 µL of Trolox standard solutions (concentration 0-360 µM) and the absorbance was measured at 734 nm during 1 min after the initial mixing. The Trolox equivalent antioxidant capacities of the samples were estimated by measuring the antioxidant activities of solutions of these compounds and expressed versus those of standard solutions of Trolox. The Trolox equivalence corresponds to the Trolox concentration having the same activity as the tested sample at a given concentration. The results are expressed in µM or mM of Trolox equivalence per gram (g) of product or per mL for solutions. The percentage of decrease of absorbance at 734 nm is plotted against the concentration of Trolox as the standard.

6.8.5 Modified TEAC assay with ABTS fast activation by electrolysis

The improved antioxidant capacity assay with ABTS activated by electrolysis (ELS) drastically reduces the time of the procedure. The principle of the modified method

consists in the activation of ABTS by electrolysis, which is very fast, unlike activation by potassium persulfate requiring 16 h. An amount of ABTS was dissolved in a saline (0.85% NaCl) aqueous solution in order to obtain a final ABTS concentration of 140 mM. The NaCl electrolyte solution allows the movement of electrons by a continuous current. The activation of ABTS was carried out by electrolysis (400 volts, 10 mA) for different times (0-240 s). The two electrodes were in platinum, with 2.12 mm diameter, 25.33 mm length and inter-electrode space of 26.36 mm measured with an Electronic Digital Caliper (Docap Corp., St-Laurent, Quebec, Canada) for the range 0-200 mm with readings at a precision of tens of microns. The absorbency at 734 nm was measured and plotted as a function of electrolysis time of ABTS. Electrolysis time was chosen so as to have the maximal absorbance. This electrolysis optimized time of 20 s generated a maximal oxidation of ABTS amount.

6.8.5.1 Fast TEAC assays

The improved TEAC rapid assay is hereto shortly called fast TEAC assay and is based on the same principle as the TEAC classic assay. The major difference is that ABTS should be activated by electrolysis for some 20 s instead of 16 h of activation by potassium persulfate. The ABTS solution prepared as above was electrolyzed without an antioxidant, generating the cation radical ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) which is in fact the reagent for the antioxidant assay. To establish the standard curve, Trolox was used in various concentrations and its antioxidant capacity was determined by monitoring the decrease of absorbance at 734 nm in the electrolyzed $\text{ABTS}^{\bullet+}$ solution.

Practically, a volume of 6.5 mL (140 mM) ABTS was electrolyzed during 20 s to generate the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical (according to the needs of the test, a stock volume of the reagent can be produced). For the assay, the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ solution (950 mL) was then mixed with 50 mL of 0-200 mM Trolox or 50 mL of the antioxidant sample. The absorbance at 734 nm was measured for 1 min after the initial mixing with the electrolysis-induced

ABTS^{•+}. By measuring $-\Delta A/\text{min}$, the analyzed antioxidant was compared with Trolox in terms of capacity to scavenge ABTS^{•+} as is currently done for the TEAC classic assay. The decrease of absorbency due to the antioxidant capacity reflects the scavenging of the free radical (ABTS^{•+}). The stabilities of the ABTS^{•+} reagent (reactive radical species) obtained by chemical (potassium persulfate) and by ELS ways and maintained at room temperature for several days were evaluated as their absorbency at 734 nm. Each measurement consisted of at least five readings and the values represented the mean $\pm$ standard deviations.

Acknowledgements

Thanks are due to the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada for the support of this research and to Prof Bruno Mondovi and Prof Serge Laplante for generous supply of diamine oxidase and hemocyanin samples.

6.9 References

1. M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur, *Chem.-Biol. Interact.*, 2006, 160, 1-40.
2. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, 39, 44-84.
3. S. Orrenius, V. Gogvadze and B. Zhivotovsky, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2007, 47, 143-183.
4. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. Collin and A. Lomri, Jr., *Bone, Spine*, 2007, 74, 324-329.
5. H. J. Sung, W. Ma, P. Y. Wang, J. Hynes, T. C. O'Riordan, C. A. Combs, J. P. McCoy Jr, F. Bunz, J. G. Kang and P. M. Hwang, *Nat. Commun.*, 2010, 12, 1-5.
6. S. S. Sabharwal and P. T. Schumacker, *Nat. Rev. Cancer*, 2014, 14, 709-721.
7. J. A. Imlay, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, 11, 443-454.

8. J. Stocks, J. Gutteridge, R. Sharp and T. Dormandy, *Clin. Sci. Mol. Med.*, 1974, 47, 223-233.
9. D. Wayner, G. Burton, K. Ingold, L. Barclay and S. Locke, *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, 924, 408-419.
10. M. Galdston, V. Levytska, M. S. Schwartz and B. Magnusson, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1984, 129, 258-263.
11. M. J. Dumoulin, R. Chahine, R. Atanasiu, R. Nadeau and M. A. Mateescu, *Arzneimittelforschung*, 1996, 46, 855-861.
12. R. L. Atanasiu, D. Stea, M. A. Mateescu, C. Vergely, F. Dalloz, F. Briot, V. Maupoil, R. Nadeau and L. Rochette, *Mol. Cell. Biochem.*, 1998, 189, 127-135.
13. M. Aouffen, J. Paquin, E. De Grandpré, R. Nadeau and M. A. Mateescu, *Biochem. Cell Biol.*, 2001, 79, 489-497.
14. I. Novikova and M. Zlotnikova, *Biomed. Pap.*, 2011, 155, 361-366.
15. I. M. Goldstein, H. B. Kaplan, H. S. Edelson and G. Weissmann, *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 4040-4045.
16. N. Makino, *Eur. J. Biochem.*, 1985, 146, 563-569.
17. K. E. Van Holde and K. I. Miller, *Adv. Protein Chem.*, 1995, 47, 1-81.
18. C. Sanchez-Maureno, J. A. Larrauri and F. Saura-Calixto, *J. Sci. Food Agric.*, 1998, 76, 270-276.
19. B. Mondovi, O. Befani, R. Federico, M. A. Mateescu, E. Masini, P. F. Mannaioni and A. Vannaci, US Patent 8 722 038/2014.
20. E. Masini, S. Cuzzocrea, D. Bani, E. Mazzon, C. Muja, R. Mastroianni, F. Fabrizi, P. Pietrangeli, L. Marcocci, B. Mondovi, P. F. Mannaioni and R. Federico, *Shock*, 2007, 27, 409-415.
21. D. L. Lamm, J. I. Dehaven and D. R. Riggs, *Eur. Urol.*, 2000, 37, 41-44.
22. L. L. Polla, T. Pouillo and B. S. Polla, *Journal de Médecine Esthétique et de Chirurgie Dermatologique*, 2007, 34, 173-178.
23. G. Cao, H. M. Alessio and R. Culter, *Free Radical Biol. Med.*, 1993, 14, 303-311.
24. G. Cao, C. P. Verdon, A. H. B. Wu, H. Wang and R. L. Prior, *Clin. Chem.*, 1995, 41, 1738-1744.
25. G. Cao and R. L. Prior, *Methods Enzymol.*, 1999, 299, 50-62.

26. B. Ou, D. Huang, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan and E. K. Deemer, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 3122–3128.
27. A. Zulueta, M. J. Esteve and A. Frigola, *Food Chem.*, 2009, 114, 310-316.
28. USDA, Nutrient Data Laboratory, 2010, <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/orac>.
29. N. J. Miller, C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan and A. Milner, *Clin. Sci.*, 1993, 84, 407-412.
30. M. Strube, G. R. Haenen, B. H. Van Den and A. Bast, *Free Radical Res.*, 1997, 26, 515-521.
31. N. J. Miller, J. Sampson, L. P. Candeias, P. M. Bramley and C. Rice-Evans, *FEBS Lett.*, 1996, 384, 240-242.
32. R. Van den Berg, G. R. M. M. Haenenb, H. Van den Berg and A. Bast, *Food Chem.*, 1999, 66, 511-517.
33. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans, *Free Radical Biol. Med.*, 1999, 26, 1231-1237.
34. M. B. Arnao, A. Cano, J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Canovas and M. Acosta, *Anal. Biochem.*, 1996, 1, 255-261.
35. K. Lemanska, H. Szymusiak, B. Tyrakowska, R. Zielinski, A. E. M. F. Soffers and I. M. C. M. Rietjens, *Free Radical Biol. Med.*, 2001, 31, 869-881.
36. D. Ivekovic, S. Milardovic, M. Roboza and B. S. Grabaric, *Analyst*, 2005, 130, 708-714.
37. X. T. Wang, M. J. Dumoulin, O. Befani, B. Mondovi and M. A. Mateescu, *Prep. Biochem.*, 1994, 24, 237-250.
38. M. A. Mateescu, X. T. Wang, M. J. Dumoulin, O. Befani and B. Mondovi, in *Analytical and preparative separation methods of biomacromolecules*, ed. H. Y. Aboul-Enein, Marcel DekkerInc, New York, 1999, pp. 445-455.
39. S. Osaki, D. Johnson and E. Frieden, *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 2746-2751.
40. C. Calinescu, B. Mondovi, R. Federico, P. Ispas-Szabo and M. A. Mateescu, *Int. J. Pharm.*, 2012, 428, 48–56.
41. N. Pellegrini, R. Re, M. Yang and C. Rice-Evans, *Methods Enzymol.*, 1999, 299, 379-389.

42. L. Venkatasubramanian and P. Maruthamuthu, *Int. J. Chem. Kinet.*, 1989, 21, 399-421.
43. B. Branchi, C. Galli and P. Gentili, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 21, 2604-2614.
44. C. Rice-Evans, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1999, 220, 262-266.
45. A. Cano, J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Canovas, M. Acosta and M. B. Arnao, *Phytochem. Anal.*, 1998, 9, 196-202.
46. M. B. Arnao, A. Cano and M. Acosta, *Free Radical Res.*, 1999, 31, 589-596.
47. M. B. Arnao, A. Cano and M. Acosta, *Food Chem.*, 2001, 73, 239-244.
48. C. V. Jackson, J. K. Mickelson, K. Stringer, P. S. Rao and B. R. Lucchesi, *J. Pharmacol. Methods*, 1986, 15, 305-320.
49. R. Chahine, M. P. Huet, L. Oliva and R. Nadeau, *Exp. Toxicol. Pathol.*, 1997, 49, 91-95.
50. S. L. Scott, W. J. Chen, A. Bakac and J. H. Espenson, *J. Phys. Chem.*, 1993, 97, 6710-6714.

CHAPITRE VII

ARTICLE 2 : SOLUBILITÉ AMÉLIORÉE DES ALCALOÏDES POUR UNE FORMULATION DE COMPRIMÉS À LIBÉRATION CONTRÔLÉE: LE CAS DE LA *PESCHIERA FUCHSIAEFOLIA*

Article publié dans la revue scientifique *AAPS PharmSciTech*. Sa référence complète est sous la forme:

Konan, K.V., Le, T.C. & Mateescu, M.A. Enhanced Solubility of Alkaloids by Complexation with Polycarboxylic Materials for Controlled Release Formulations: Case of *Peschiera fuchsiaefolia*. *AAPS PharmSciTech*, 2019, 20, 108-119.

Contributions des (co) auteurs

Kouadio Victorien Konan : Expérimentation, analyse des résultats, montage des figures, recherche bibliographique, rédaction et correction du manuscrit.

Tien Canh Le : Supervision des travaux, analyse des résultats et révision du manuscrit

Mircea Alexandru Mateescu : Supervision du projet et révision du manuscrit

7.1 Résumé

Le paludisme ou malaria est un problème majeur de santé publique avec des centaines de milliers de morts annuellement. L'extrait de la *Peschiera fuchsiaefolia* (Pf), plante de la famille des *Apocynaceae*, est souvent utilisé comme traitement traditionnel par plusieurs populations. L'Artémisinine est un autre agent antipaludique efficace et largement utilisé, mais susceptible de générer des formes de résistance du *Plasmodium*. Afin d'éviter l'apparition de ces souches résistantes aux traitements, l'OMS a recommandé les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA), en associant un agent bioactif à longue demi-vie ou des formulation en CTA à libération prolongée assurant une longue durée de l'activité antiplasmodiale. Les alcaloïdes de Pf sont de bons candidats pour les CTA, mais leur solubilité aqueuse est très faible. Pour améliorer la solubilité, des études précédentes proposaient d'aggréger la Pf avec à la maltodextrine, mais le produit obtenu était instable. Le présent travail visait à améliorer la solubilité de Pf par complexation avec le carboxyméthylamidon (*carboxyméthylstarch*, CMS) qui permettrait aussi de formuler des formes de dosage de comprimés à administration orale avec un temps de libération prolongé et une meilleure stabilité de Pf. Il a été trouvé que l'aggrégation ou la complexation affecte les propriétés physiques, mais pas l'activité antioxydante de la Pf. Ainsi, la Pf pourrait être associée avec l'Artémisinine pour des formulations à libération contrôlée de type CTA. Cette approche par complexation serait même utile pour d'autres extraits d'alcaloïdes. Aussi, une nouvelle approche consommant moins de temps pour l'évaluation de la solubilité a été proposée. Cette procédure consiste en la détermination de la concentration effective à saturation (mg/mL) du composé d'intérêt dans un milieu via une de ses capacités spécifiques (ex. absorption à 280 nm ou propriétés antioxydantes). Une telle approche serait plus appropriée dans le cas de l'évaluation de la solubilité de divers agents actifs à partir de complexes ou d'extrait brut ou dans des échantillons hétérogènes de divers complexes comme des extraits bruts non purifiés.

Mots clés : Amélioration de la solubilité de *Peschiera fuchsiaefolia*; Améliorer la solubilité des alcaloïdes; Méthode d'évaluation de la solubilité; Formulation à libération contrôlée; Agent antioxydant naturel soluble.

AAPS PharmSciTech, 2019, vol. 20, 108-119

Enhanced solubility of alkaloids by complexation with Polycarboxylic Materials for
Controlled Release Formulations: Case of *Peschiera fuchsiaefolia*

Kouadio Victorien Konan, Tien Canh Le and Mircea Alexandru Mateescu*

Department of Chemistry, Research Chair on enteric dysfunctions "Allerdys".
Pharmaqam and CERMO-FC centers, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888,
Branch A, Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada

*Corresponding author

Phone: +1 (514) 987 4319

Facs: +1 (514) 987 4054

email: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

7.2 Abstract

Malaria is a major public health problem with hundreds of thousands of deaths yearly. Extracts of *Peschiera fuchsiaefolia* (Pf), an *Apocynaceae* family plant, are used as malaria treatment by several populations. Artemisinin is another effective largely used antimalarial agent but susceptible to generate resistant forms of *Plasmodium*. To reduce the risk of new resistant strains appearance, WHO recommended Artemisinin Combination Therapy (ACT) with another bioactive agent, ensuring a long duration of antiparasmodial activity. Pf alkaloids are good candidates for ACT, but their solubility is very low. This research was aimed to improve the solubility of Pf alkaloids by complexation via their amine groups with carboxylate groups of carboxymethylstarch (CMS), an excipient used to formulate oral dosage forms for controlled drug release. It was found that when complexed as CMS-Pf, the solubility of Pf is increased (4-5 times in function of dissolution medium). A new specific and faster approach to evaluate the solubility was proposed, measuring the effective saturation concentration of the compound of interest via one of its specific capacities, *i.e.* absorption capacity at a specific wavelength or antioxidant properties. This approach is more convenient for solubility evaluation of various active agents from complexes or crude extracts, or in heterogeneous samples. Also, the storage stability was markedly improved from one week for Pf co-processed with Maltodextrin (MD/Pf) to several months for CMS-Pf (in similar controlled temperature and humidity conditions). The co-processing as MD/Pf or complexation as CMS-Pf affected physical properties but not the biological (*i.e.* antioxidant) activity of Pf.

Keywords: Alkaloid solubilization; Controlled release formulation; Natural soluble antioxidant agent; *Peschiera fuchsiaefolia* solubility improvement; Solubility evaluation methods.

7.4 Introduction

Alkaloids are abundant in different organisms, including animals, micro-organisms and higher plants (CCD, 2018). Indole alkaloids represent an interesting class of natural compounds. They have been largely exploited for their various pharmacological properties (Murphy) including anesthetics (cocaine) and analgesics (morphine), anti-inflammatory (Küpeli *et al.*, 2002; Souto *et al.*, 2011), antihypertensive (indole alkaloid) (Lau *et al.*, 2012; Roberts, 2013; Song et Ao, 2014), antitumor (Isah, 2016; Winzer *et al.*, 2012), antibacterial (Nair *et al.*, 2017; Zhou, L.-N. *et al.*, 2017) and (largely used) as antiplasmodial (Frederich *et al.*, 2008; Komlaga *et al.*, 2017) agents. Infections caused by the *Plasmodium* parasite take a huge toll on human lives, particularly in tropical and sub-tropical countries (Snow *et al.*, 2005; World Health Organization, 2017). Malaria is considered the first parasitic disease with about 230,000 deaths in 2016 in 91 countries (World Health Organization, 2017).

Quinine (a quinoline alkaloid) and its derivatives have been used, for many years, as main treatment of malaria. This monotherapy was abandoned due to the diminution of sensibility of quinine and to the appearance of new resistant strains, particularly of *Plasmodium falciparum*. Artemisinin (Arte) is also effective to treat malaria, but WHO recommended its association with another antimalarial agent (World Health Organization, 2018) to avoid the appearance of new resistant strains. Because of the short half-life of Artemisinin (approx. 2 h), its association with another antiplasmodial agent is recommended, particularly with those having a long half-life. It is also of interest to formulate these antiplasmodial agents as extended release forms, particularly when associated with Artemisinin.

Several alkaloid producing plants, such as *Guiera senegalensis* (Ancolio *et al.*, 2002), *Strychnos usambarensis* (Frédérich *et al.*, 1999), *Balanites rotundifolia* (Asrade *et al.*, 2017), have some antimalarial (antiplasmodial) properties, but *Peschiera fuchsiaefolia*

(Pf) was selected for the current study because this plant is of low cost, non-toxic, already used by indigenous peoples in certain countries, and particularly due to its efficacy on multidrug-resistance of cell systems (Meschini *et al.*, 2003). The *Peschiera fuchsiaefolia* is a tree of the *Apocynaceae* family, also known in Brazil by the name «*leiteira* » because of the presence of latex in the plant, which is currently used in traditional medicine to treat malaria in Sao Paulo and Parana states (Zocoler *et al.*, 2005). Pf extract has been reported effective against *Plasmodium falciparum* and other drug resistant strains (Chowdhury *et al.*, 2017; Federici *et al.*, 2000). Used under Artemisinin-based Combination Therapy (ACT), Pf may enhance the effect of Artemisinin by acting on the multidrug-resistant proteins (Meschini *et al.*, 2003). The antimalarial activity of Pf extracts is mainly attributed to bisindole alkaloids, particularly voacamine (Fig. 7.1) and probably to its cumulative action with other indole alkaloids (Federici *et al.*, 2000) present in the extract such as voacamidine, affinisine, tabernamine (Fig. 7.1).

Like most of alkaloids, the Pf extract is low water-soluble, which makes it difficult to formulate and may limits its bioavailability for the bloodstream. Thus, the proposed long-lasting controlled release forms are appropriate to overcome these problems. A key challenge is the choice of an adequate matrix for controlled delivery, affording protection (if needed) of the active agents against the stomach acidity and able to transport them to the intestinal absorption sites. Currently, to the best of our knowledge, there are no sustained release forms of Pf. In this context, an improvement of solubility of alkaloids would enhance their bioavailability and facilitate their controlled release formulation.

The solubility of drug (maximal amount of a solute that can be dissolved in a certain quantity of solution at a specific temperature) remains one of the key factors in pharmaceutical formulation, determinant for the achievement of expected

concentration of drug in circulation and of the pharmacological efficacy (Chaudhary *et al.*, 2012; Savjani *et al.*, 2012).

There are techniques to enhance the water solubility and therefore the dissolution rate of poorly water-soluble drugs, such as co-solvency (Asghar *et al.*, 2018; Dizaj, 2013; Shao *et al.*, 2018), micro-emulsion (Dizaj, 2013; Raval et Patel, 2011), complexation (Das *et al.*, 2018; Jagdale *et al.*, 2012; Sabzevari *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018), solid dispersion (Kawakami, 2012; Tabbakhian *et al.*, 2014; Yuvaraja *et al.*, 2015) and particle size reduction (Javadzadeh *et al.*, 2010; Mohammadi *et al.*, 2011).

A previous formulation approach (unpublished results) consisted in aggregating Pf with maltodextrin (MD), a commercial excipient (oligosaccharide of 3 to 17 D-glucose units chain length) but the storage stability of this material was limited in time.

This investigation was aimed to enhance the solubility of Pf alkaloids by complexation with carboxymethylstarch (CMS) as CMS-Pf and to facilitate the sustained release formulation. In addition, a rapid method to quantify Pf and to follow its release profile, was proposed.

The hypothesis for this study was that CMS, with highly hydratable (and thus soluble) carboxylate groups (negative charges), may interact with amine groups (positively charged) of Pf to form a CMS-Pf complex with improved Pf solubility. Thus, the CMS would act not only as an excipient for controlled release formulation, but also as a complexation agent to increase stability and solubility of Pf.

In addition, the CMS is classified as GRAS (Generally Recognized as Safe), inexpensive and easy to obtain (Haroon *et al.*, 2018; U.S. Food and Drug Administration, 2016; Zhou, M. *et al.*, 2018) from the abundant starch rough material.

7.5 Materials and methods

Materials

Peschiera fuchsiaefolia (Pf) extract was obtained from Yerbalatina Phytoactives (Colombo, PR, Brazil) and Artemisinin (Arte) was from Changsha Inner Natural Inc., (Changsha, Hunan, China). Maltodextrin was purchased from Aldrich chemical Company Inc (Milwaukee, WI, USA), High amylose corn starch (Hylon VII) was from Ingredion Incorporated (Bridgewater, NJ, USA). The ABTS [2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] diammonium salt (purity 98 %), and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid) 97 %, were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) was from Dow Chemical Company (Midland, MI, USA) and Sodium chloride (99 %) was from Anachemia (Montreal, QC, Canada).

All other reagents were of analytical grade and used without further purification.

Methods

7.5.1 Synthesis of CMS

Carboxymethylstarch (CMS) at different degrees of substitution (DS) was prepared from high amylose starch first gelatinized at 65 °C in NaOH medium followed by treatment with various amounts of sodium monochloroacetate as described by Assaad and Mateescu, 2010 (Assaad et Mateescu, 2010). CMS with three different DS (CMS1, CMS2 and CMS3) were obtained by varying the amount of sodium monochloroacetate. Briefly, an amount of 100 g of Hylon VII was suspended in 250 mL distilled water for hydration (10 min at 50-60 °C). Then, 200 mL of 4 M NaOH were added for gelatinization under continuous stirring for 1 h. Various quantities (60-100 g) of

sodium monochloroacetate (solubilized in 120 mL water) were added for 24 h of reaction, under continuous stirring. After neutralization (pH 7.0) of the reaction medium with acetic acid, the CMS was precipitated by adding an excess of ethanol/water (70:30, v/v) and then filtered on Whatman cellulose filter paper. Subsequently, CMS was dehydrated by washing three times with pure acetone, and the CMS mass was air-dried for elimination of residual solvent and to obtain the powder.

The DS was determined by titrimetry in conditions described by Le Tien *et al.* (Le - Tien *et al.*, 2004) with some modifications, as follows: the carboxyl groups of the CMS (1.0 g) were first converted into the acidic (protonated) form by dispersion of the CMS polymer in ethanol (70 %) containing 1.0 M HCl. The protonated CMS was filtered, washed several times with ethanol/distilled water (80:20) to completely remove the acid in excess, and then precipitated and dried with pure acetone. Finally, an aliquot of 100 mg of protonated CMS powder was suspended in 100 mL distilled water and titrated with 0.05 M sodium hydroxide. The amount of carboxyl groups (DS) was calculated as described by Stojanovic *et al.*, 2005 (Stojanović *et al.*, 2005), and expressed as the percentage of carboxymethyl groups per glucose unit.

7.5.2 Pf co-processed with Maltodextrin

The *Peschiera fuchsiaeifolia* (Pf) pure extract was co-processed with maltodextrin (MD) to obtain the MD/Pf aggregate. An amount of 50 mL of maltodextrin (20 % in water) was slowly added to 450 mL of Pf (20 % dissolved in alcohol 60 %). This solution with a final ratio Pf/maltodextrin (w/w) of 90/10 was maintained under agitation at room temperature until spray-drying (Büchi Mini Spray Dryer B-290, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) using the following parameters: i) inlet temperature 150 °C; ii) outlet temperature 100 °C; iii) spray flow 500 L/h, and iv) aspirator setting at 38 m³/h. During the drying process, the MD excipient/Pf suspension was continuously and

gently stirred to prevent sedimentation, obtaining thus a homogeneous powder of co-processed MD/Pf.

7.5.3 Preparation of CMS-Pf complexes

Ionic interaction between CMS and Pf resulting in Pf-CMS complexation was first evaluated in relation to the DS. To a filtered (0.45 μm) aqueous solution of Pf (3 g in 200 mL), an equivalent quantity of CMS (3 g) was added. After homogenization and incubation under stirring at room temperature (30 min), CMS (free form or complexed with Pf) was precipitated by adding methanol in excess; then, after decantation, the product was collected and washed with methanol on filter paper. The obtained product was dried overnight at room temperature and then at 70 °C for 24h. Similar operations were carried out with CMS at different DS (CMS1, CMS2 and CMS3) with various DS. The quantitation of Pf complexed with CMS as Pf-CMS1, Pf-CMS2 and Pf-CMS3 was done by UV (280 nm). A quantity of CMS-Pf (10 mg) was dissolved in nanopure water (5 mL) and the absorbance of one mL of the solution was recorded at 280 nm. The absorbency value is proportional to the concentration (mg/mL) of Pf. A calibration curve of $A_{280\text{nm}}$ versus the Pf concentration (mg/mL) was used to quantify the Pf.

Also measured was its antioxidant capacity via the discoloration of blue-green ABTS^{•+} radical cations (Konan *et al.*, 2016; Re *et al.*, 1999).

For complexation, a dry processing by spray-drying was proposed. CMS was first dispersed at 8.5 % in water. After homogenization, an amount of 50 mL of CMS suspension was slowly added to 450 mL of Pf 21.5 % previously dissolved in ethanol (60 %), for complexation. After homogenization, the complexed CMS-Pf powders were obtained by spray-drying using the same parameters as for MD/Pf co-processing (section 7.5.2).

7.5.4 Formulation of CMS-Pf complexes as monolithic tablets

Formulation of one dosage form consisted in mixing of 450 mg of CMS-Pf complex with 120 mg of CMS (CMS1, CMS2 or CMS3) and with 100, 120, 150 or 200 mg of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) dry powders. An amount of 15 mg of magnesium stearate was used as lubricant. Monolithic tablets were obtained by direct compression of mixed powders at 2.3 T/cm^2 .

7.5.5 Characterization of Pf complexes

7.5.5.1 Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

The FT-IR spectra of samples as native (Pf, MD), or as obtained CMS or co-processed MD/Pf or complexed as CMS-Pf powders or compacted as tablet forms were recorded (before and after incubation in SGF and in SIF) on Thermo Scientific Nicolet 6700/Smart iTR (Madison, WI, USA) equipped with a deuterated triglycinesulfate-KBr detector and a diamond smart attenuated total reflection platform. Before the spectral analysis, the crystal was cleaned with ethanol and a background spectrum was acquired. The parameters were: number of scans, 32; resolution, 4 cm^{-1} . All the analyses were carried out at room temperature.

7.5.5.2 X-Ray Diffraction (X-RD)

The diffraction patterns of different samples as native (Pf, MD), or as obtained CMS or co-processed MD/Pf or complexed as CMS-Pf powders or compacted as tablet forms were recorded (before and after incubation in SGF and in SIF) using a Siemens D-5000 diffractometer (Munich, Germany) SOL-X detector with a Cobalt cathode in reflectance mode at a wavelength of $1.789 \text{ \AA}$. The diffractograms, registered for 2θ from 0° to 30° and a scan rate of $2^\circ/\text{min}$, were treated using a Diffracplus software.

7.5.5.3 Scanning electron microscopy (SEM)

The microstructures of samples (Pf, MD, MD/Pf and CMS-Pf) were examined with a JSM-6010LV InTouchScope TM Scanning Electron Microscope (SEM) (JEOL, Tokyo, Japan) using a secondary electron image detector. A small amount of powder was mounted on a metal stub with an adhesive and covered under vacuum with a fine layer of gold in a sputter coater BIO-RAD E5200 (Bio-Rad Laboratories Ltd., London, UK). The microphotographs were obtained at accelerating voltages of 1.5 kV under high vacuum.

7.5.5.4 Antioxidant properties of *Peschiera fuchsiaefolia* extracts

Antioxidant activity of *Peschiera fuchsiaefolia* extracts was evaluated before and after aggregating with MD or complexation with CMS. In fact, after dispersion of samples (Pf, MD/Pf and CMS-Pf) in different media, distilled water, Simulated Gastric Fluid (SGF) and Simulated Intestinal Fluid (SIF), the antioxidant capacity of samples was evaluated by a fast ABTS spectrophotometric method, as previously described (Konan *et al.*, 2016). Similar to the TEAC classical assay, this ABTS test is based on the scavenging of the blue-green ABTS^{•+} radical cations but with the difference that they were generated by electrolysis (20 sec) of the ABTS solution (Iveković *et al.*, 2005; Konan *et al.*, 2016) instead of oxidation with ammonium persulfate. A volume of 6.5 mL of 140 µM ABTS (in 0.85 % NaCl) was electrolyzed (400 Volts, 10 mA) during 20 sec to generate the ABTS^{•+} radical. The electrodes of platinum were 2.12 mm diameter, 25.33 mm length with inter-electrode space of 25 mm (measured directly with an Electronic Digital Caliper (Docap Corp., St-Laurent, Quebec, Canada) for the range 0-200 mm.

To evaluate the scavenging capacities of samples, a volume of 950 µL of electrolysis induced ABTS^{•+} solution was mixed with 50 µL of 0-200 µM Trolox (for calibration) or with 50 µL of each tested sample (Pf, MD/Pf or Pf-CMS, 0.1 mg/mL in nanopure

water) and their absorbances were recorded at 734 nm, after 1 min of incubation. The decrease of absorbency due to the antioxidant capacity reflects the scavenging of the free radical (ABTS^{•+}). The different abilities of Pf, MD/Pf and Pf-CMS to scavenge the ABTS^{•+} radical cations were compared to that of Trolox (hydrosoluble structural analogue of vitamin E) used as reference antioxidant. The results are expressed in mM of Trolox equivalence per mg of product.

Each measurement consisted of at least five readings and the values represented the mean $\pm$ standard deviations.

7.5.5.5 Solubility assay of powders of Pf and of Pf complexes

Solubilities of Pf (as MD/Pf, CMS-Pf or free Pf) in distilled water, in Simulated Gastric Fluid (SGF, pH 1.5) and in Simulated Intestinal Fluid (SIF, pH 6.8) was evaluated and defined as described in U.S Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF) (U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35), 2016).

The SGF (one liter) was obtained by mixing 2 g NaCl with 7 mL HCl in distilled water, and the SIF (one liter) was a solution from 6.8 g monobasic potassium phosphate and 190 mL NaOH (0.2 M) in distilled water. To evaluate the solubility, each sample (Pf, MD/Pf or CMS-Pf) was added carefully to 100 mL of medium (water, SGF or SIF under stirring at 37 °C) until saturation (accumulation of solid matter). The solubility was then quantified according Cano-Chauca *et al.*, 2005 (Cano-Chauca *et al.*, 2005) by adding an excess of Pf, MD/Pf or CMS-Pf (20 g) to 100 mL of different media. The saturated solution prepared with each medium (nanopure water, SGF or SIF) was shaken at 37 °C for 24 h. The mixture was centrifuged at 2000 g for 10 min and the supernatant was filtered using a 0.45 μ m Millipore filter. An aliquot of 30 mL was pre-weighed in Petri dishes, oven-dried at 105 °C for 5 h, cooled down in a desiccator and

weighed. The solubility (mg/mL) was calculated as the weight difference for determining the amount of Pf (mg) per volume (mL) of solution.

The solubility was also determined by a new approach, here proposed, based on a specific property of the sample of interest.

Solubility (mg/mL) was determined by UV-spectrophotometry at a maximum absorption wavelength (280 nm) or by antioxidant capacity of samples.

Saturation was obtained with the sample (2 g) in 10 mL of dissolution medium for 5 h incubation and then centrifugation. After filtration of supernatant, the concentration of Pf was determined by UV at 280 nm in an aliquot (1 mL). The antioxidant activity of aliquots (10 μ L) was also evaluated. Concentrations (mg/mL) were determined using standard curves as functions of sample concentrations (mg/mL) previously established. Standard curves were established with different concentrations of Pf and derivatives (MD/Pf and CMS-Pf) from 0 to 1 mg/mL, in different media.

7.5.6 Dissolution assay

Dissolution patterns of formulated monolithic tablets were followed in simulated gastric fluid (SGF, pH 1.5) for 2 h and continued in SIF (pH 6.8) as referred by USP method (U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35), 2017).

The release kinetics of Pf (Pf, MD/Pf or CMS-Pf) from different monolithic tablet dosage forms were followed using a Distek dissolution system 2100A (Betatek Inc., Markham, ON, Canada) at 100 rpm and 37 °C. At predetermined intervals, an established volume of samples (1 mL) was withdrawn from dissolution media, filtered (0.45 μ m) and the released Pf was quantified by UV measurement at 280 nm.

7.6 Results

7.6.1 Degree of substitution (DS) of synthesized CMS

The DS (% carboxymethyl group/glucose unit) of the three CMS synthesized (CMS1, CMS2 and CMS3) were respectively 17.69 ± 0.19 , 22.01 ± 0.17 and 27.03 ± 0.15 %.

7.6.2 Characterization of MD/Pf and CMS-Pf

7.6.2.1 CMS-Pf complexation yield

CMS-Pf complexation yield increases with DS of CMS (supplementary material, Fig. 7.S1). The highest Pf complexation rate was obtained with CMS3 (DS 27.03), which was retained and used for further studies on complexation with Pf. The final ratio Pf/CMS used was about of 96/4.

7.6.2.2 FTIR analysis

FTIR spectra showed marked differences between CMS (CMS1, CMS2 and CMS3) and native high amylose starch (Fig. 7.2).

By carboxymethylation of native starch, new bands were found for CMS at 1595 and 1415 cm^{-1} ; they are ascribed to asymmetric and symmetric stretching vibrations of carboxylate anion groups. The absorption at 1595 cm^{-1} is greater for CMS3 (Fig. 7.3) probably due to its higher DS.

Fig. 7.3 shows the FTIR spectra of complexed CMS-Pf (with CMS3) compared to that of CMS alone and to those of MD, of native Pf and of Pf co-processed with maltodextrin (MD/Pf).

For MD, the FTIR pattern is, as expected, similar to that of native starch, with O-H absorption bands at 3300, at 1640 cm^{-1} and at 1010 cm^{-1} . This similarity is due to the same glucose units in MD and in starch.

Native Pf exhibits stronger absorption intensities in the region 2935-2863 cm^{-1} due to C-H stretching groups. Absorption bands at 1750, 1700, 1610 cm^{-1} are attributable to C=O (from esters and acids groups) and C=C stretching vibrations of Pf. The spectral region 1600-1300 cm^{-1} is mainly ascribed to aromatic C=C (symmetric stretching), N-H and C-N vibrations.

When Pf is aggregated with MD, a major decrease of intensities of bands was observed in spectral region 1750-1550 cm^{-1} , probably due to the association of MD that surrounds and hides the Pf. However, two absorption bands at 1750 and 1680 cm^{-1} were still noticed and possibly ascribed to C=O and C=C stretching vibrations of Pf.

For CMS-Pf complex, a decrease of the absorption band at 1595 cm^{-1} was observed when compared to CMS alone, probably due to interactions between carboxylate groups of CMS and amine groups of Pf, with an absorption band appearing at 1470 cm^{-1} . A new band was appeared at 1720 cm^{-1} which was assigned to C=O (acid and carbonyl) of Pf.

After incubation in SGF (2h) and then in SIF (2h), no marked differences (Fig. 7.4) in the FTIR patterns were found for the MD/Pf. For CMS-Pf complex, when transferred from SGF into SIF, an increase in intensity of carboxylate bands (1595 cm^{-1}) was observed (Fig. 7.4). In intestinal medium (pH 6.8), the carboxylic groups previously protonated during the 2 h incubation SGF (pH 1.5), are probably deprotonated, with a further increase of this absorption band at 1595 cm^{-1} ascribed to carboxylate ions.

7.6.2.3 X-Ray Diffraction (X-RD) of Pf forms

X-RD analysis of native starch showed an organized structure with a higher-order degree and several crystalline domains whereas by carboxymethylation, starch loses its crystallinity, in good agreement with previous results of Lemieux *et al.*, (Lemieux *et al.*, 2010). Native starch diffractograms present a predominant double helix B-structure characterized by diffraction bands with *2-theta* angles at 14°, 17°, 20°, 26° and 28° and

a minor single helix V-structure with bands at 14° and 22° . After carboxymethylation, starch diffractogram presented only 2 main bands with $2\text{-}\theta$ angles at 14° and 22° attributed to a single helix V-structure. These CMS bands were larger and diffuse showing a lesser crystallinity than that of native starch. Furthermore, CMS at a higher DS presents a more organized V-structure than those at lower DS (data not shown). Hydrogen associations involving carboxylic groups may contribute to more order at higher DS.

When complexed with Pf, the CMS structures lose most of their crystallinity (Fig. 7.5) with a decrease in intensity of bands as a proof of involvement of carboxylic groups in the ionic complexation with the Pf alkaloids. The carboxylic groups are no more involved in CMS stabilization (by hydrogen bonding), the bands became broader and tended to disappear. Similar diffractogram profiles were observed after incubation of CMS-Pf in SGF and in SIF, with large peaks at lower intensities.

For maltodextrin (MD alone) and aggregated with Pf (MD/Pf), their diffractograms presented similar profiles with a main $2\text{-}\theta$ angle at 21° . After incubation of the MD/Pf aggregate in SGF and in SIF, there is an appearance of a new $2\text{-}\theta$ angle appeared at 14° whereas the angle at 21° remained generally unchanged (Fig. 7.5).

7.6.2.4 Scanning electron microscopy of the Pf complexes

SEM of Pf co-processed with MD or complexed with CMS showed spherical granules of variable size (Fig. 7.6). The CMS-Pf granules presented spherical surfaces with numerous holes differing from those of MD/Pf with a smoother aspect and with only a few holes.

7.6.3 Antioxidant activity of *Peschiera fuchsiaefolia* (alkaloid) extracts

The antioxidant capacities of free Pf, of co-processed Pf (MD/Pf) and of CMS-Pf complexes before and after incubation in SGF and in SIF were evaluated by the fast

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay using ABTS^{•+} radical as probe reagent. Results were expressed in Trolox equivalent units (mM) per mg of sample, not in $\mu\text{M/g}$ which is generally used (conversion into $\mu\text{M/g}$ would need to multiply different values by 10^6).

Antioxidant activities were higher in SIF (Fig. 7.7) than in nanopure water and much higher than in SGF (where the activities were moderately low decreased). The three agents presented similar antioxidant activities before and after 2 h of incubation in the respective mentioned media. After 2 h incubation in SGF, CMS-Pf presented a slightly higher antioxidant activity in comparison to those of Pf and MD/Pf. This behavior is probably due to the protonation of carboxylic groups, which are compacted and thus less protective in gastric acidity. No changes in antioxidant properties of Pf were induced by aggregation with MD or complexed with CMS (Fig. 7.7).

7.6.4 Solubility of complexes

After filtration, the saturated solutions of Pf, of co-processed Pf (MD/Pf) or of CMS-Pf in different media (water, SGF and SIF) presented different color characteristics and intensities (related to their alkaloids content). They were darker in SGF and SIF than in nanopure water and more pronounced for aggregated MD/Pf and complexed CMS-Pf than for the free Pf saturated solution, with the highest intensities for CMS-Pf dissolved in SGF medium (supplementary material, Fig. 7.S3). Solubility values (mg/mL) in different media (water, SGF and SIF) of the co-processed MD/Pf and of the CMS-Pf complex are markedly higher than those of free Pf extract, regardless the (determination) approach of the solubility (Fig. 7.8 and 7.9). In contrast to the intensity of their colorations, the solubility as evaluated by the drying approach was higher for the co-processed MD/Pf than that of CMS-Pf complex in water and in SGF media (Fig. 7.8). In SIF, the solubility of CMS-Pf was higher due to the strong ionization of CM groups.

Solubility values obtained by the new approach based on an intrinsic property of the concerned agent correlates with coloration intensity of different solutions at their maximal concentration (supplementary material, Fig. 7.S3).

Solubilities of CMS-Pf were significantly different from those of Pf and of co-processed MD/Pf (Fig. 7.9). Furthermore, these solubility values were higher for co-processed MD/Pf or for CMS-Pf complex than those of Pf alone, with the highest value for CMS-Pf complex in SGF was the highest (Fig. 7.9). In the three media, solubility values established with the new approach were similar for the two-different durations (5h and 24 h) of incubation (Fig. 7.9).

7.6.5 Dissolution assay

A comparative study of CMS-Pf and of co-processed MD/Pf was carried out to highlight the advantages of complexation with CMS.

The MD/Pf materials obtained by Pf co-processing with MD were unstable in time. Furthermore, dissolution studies showed a rapid release of Pf (supplementary material, Fig. 7.S2). To overcome these limitations, the extract of cationic Pf alkaloids was complexed with the anionic CMS excipient, as CMS-Pf.

The release kinetics of CMS-Pf from different formulations (Fig. 7.10) showed that CMS-Pf was slowly and gradually released in SGF and then in SIF (Fig. 7.10A-C). After 2h in SGF, about 100-150 mg were released whereas the complete release of Pf (450 mg) was achieved after 10-13 h (Fig. 7.10D). Total release time did not vary significantly for different DS of CMS used as matrix.

7.7 Discussion

Pf is mainly composed of bis-indole alkaloids containing secondary (Voacamin, Voacamidin, Tabernamine) and/or tertiary (Voacamin, Voacamidin, Tabernamine, Affinisine) amine groups. The carboxylic negative charges of CMS can ionically interact with positively charged amine groups of Pf to form a CMS-Pf complex between carboxylate groups of CMS and amine groups of Pf.

The MD/Pf aggregate seems to maintain its conformation after incubation in SGF and in SIF as supported by the lack of differences in terms of FTIR patterns after incubation in these media (Fig. 7.3 and 4).

Concerning the CMS-Pf complex, compared to CMS alone, a slightly decreased intensity of the absorption at 1595 cm^{-1} would suggest that after complexation with Pf, an amount of free carboxylate remains available. In SGF, the protonation of carboxylate to carboxylic acid groups and a possible interaction with the ionized ammonium groups of Pf may explain the reduced intensity of the carboxylate band at 1595 cm^{-1} . The CMS excipient was known as able to ensure high loading of bioactive agents, to offer gastric resistance (Calinescu et Mateescu, 2008; Calinescu *et al.*, 2005). It was now found, to provide adequate controlled delivery and a long-term storage stability of ionically complexed alkaloids (Calinescu et Mateescu, 2008; Calinescu *et al.*, 2005) as bioactive agents.

The X-ray patterns indicated for the co-processed MD/Pf a structure similar to that of MD, but with a lesser order after incubation in SGF and SIF solutions (Fig. 7.5). Differently, the structural differences between CMS, CMS-Pf and Pf suggest that CMS, when interacting with amine groups via its carboxylic groups, loses hydrogen interactions and crystallinity in favor of an amorphous structure and an improved solubility in SGF and SIF media.

The smooth surface observed in SEM for MD/Pf (Fig. 7.6) suggested that MD used for co-processing with Pf is able to partially or completely cover (as a “coating”) the Pf granules. The MD may generate a self-formed outer membrane probably stabilized by hydrogen associations, able to partially or completely cover Pf granules and explaining why MD/Pf exhibited a smooth surface (Fig. 7.6).

Presence of several holes on CMS-Pf surface (Fig. 7.6) could be explained by stronger binding interactions between anionic CMS and cationic Pf. The CMS is thus able to better fit the roughness of Pf grains, with deep holes. Furthermore, CMS is hydrophilic and may be in part solubilized, leaving even more pronounced holes. The partial solubilization may also eliminate small parts of CMS-Pf complex (stabilized by ionic interactions) which may represent, in fact, the basic process of Pf enhanced solubility. The *in vitro* determination of antioxidant activity of Pf and of its co-processed and complexed (CMS-Pf) forms revealed that Pf is a very good antioxidant agent (Fig. 7.7). Alkaloid indoles were found to react nonspecifically and quench ABTS^{•+} radicals at physiological pH producing ABTS (Herraiz et Galisteo, 2004). Pf extract is essentially composed of bis-indole nuclei that acts efficiently at physiological pH 6.8 (Herraiz et Galisteo, 2004), exerting a good antioxidant activity.

For an equal mass, antioxidant activity of Pf compared to that of Trolox was moderately low but in the same order of magnitude (Table 7.1). In similar antioxidant assays, various other compounds such as polyphenols, fruits, plant extracts, wine (Chaiyana *et al.*, 2017; Konan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017) showed markedly lower antioxidant capacities (differences up to 10³ times), suggesting a large scavenging capacity of Pf.

The stability test at 40 °C and relative humidity (RH) 40 % for the Pf and its compounds as tablet forms showed that MD/Pf tablets were hydrated and melted. The MD/Pf powder in these conditions changed the color from light brown to dark brown after one week. This phenomenon was possibly due to the hygroscopic properties of maltodextrin that retains water, favoring the Maillard reaction between reducing

hemiacetal of maltodextrin and amine groups of Pf alkaloids. To prevent this, it is important to enhance the Pf stability prior to the formulation.

The risk of undesirable effects of the Maillard (browning) reaction was reduced by complexing amine groups of Pf with carboxyl anion groups of the carboxymethylstarch. Such complexations may also prevent undesirable interactions of Pf in formulation with other bioactive ingredients (*e.g.* Artemisinin).

Since the samples are forms of the same Pf product, with approximatively the same color, their solubility can be evaluated spectrophotometrically by their color intensity. After filtration, pictures of the saturated solutions of different samples were taken (supplementary material, Fig. 7.S3) and their absorbencies at 280 nm (λ_{max}) were measured. Intensities of coloration showed higher solubility of samples in SGF and in SIF than in nanopure water. The highest solubilities in SGF were found for Pf and for CMS-Pf (with solubility of free Pf slightly higher). This can be explained by higher solubility of amines in acidic media. These results are in good agreement with x-ray pattern (Fig. 7.5) and morphology of samples (Fig. 7.6). A more organized structure was correlated with a higher stability and lower solubility of the sample (Fig. 7.8). Differently, the CMS-Pf with an amorphous structure would be more soluble than MD/Pf.

Having obtained a known volume of saturated and filtered solution, the classical approach consisted in determining the weight of the remaining solid after drying process for Pf, co-processed MD/Pf or complexed CMS-Pf. The obtained weights measured were not only those of Pf but also those from the additive MD or of complexation CMS agents. MD is hydrophilic, with a much higher solubility than that of the Pf alkaloids. In the co-processed MD/Pf, with no binding to retain MD on the Pf, when incubated in an aqueous medium (during saturation), a large amount of MD

would be easily dissolved and thus largely contributing to the solubility value of Pf as MD/Pf when measured by the drying method. Similarly, CMS-Pf complex material may contain free CMS, not complexed with Pf (supported by a band at 1590 cm^{-1}). It would be easily and rapidly dissolved, enhancing thus the weight of the solute. Even though that CMS involved in CMS-Pf complexation is less soluble than MD, in both cases, the residual mass values obtained for MD/Pf and for CMS-Pf were not limited to Pf from these samples. Consequently, this approach seems not appropriate for complexes, mixtures or association of nonhomogeneous samples, containing various compounds with different solubilities.

For this reason, the new approach here proposed to quantify the solubility of only one of the compounds in a mix or a complex, based on a specific property of the analyzed agent, may evaluate the effective solubility (mg/mL) of an agent in a complex sample. After filtration of the obtained saturated solution, the effective quantity or the effective concentration of the compound of interest (*i.e.* Pf) in filtrate is determined based on an intrinsic property (capacity or activity) of the concerned agent. In the case of Pf, of the co-processed MD/Pf or of CMS-Pf complexes, the absorption of indole nuclei (at 280 nm) and the antioxidant activity were used to evaluate Pf concentration (mg/mL) in a saturated solution. These values were close to each other and seem to correspond better to the Pf solubility (mg/mL). Consequently, this approach determines only the effective concentration (mg/mL) and thus the solubility of the compound of interest in various saturated solutions containing different components, based on one of its distinctive activities or properties.

Differing from the weighing procedure, the results of the new proposed approach based on antioxidant capacity, were in accordance with results indicated by coloration intensity (Fig. 7.9) and in conformity with the composition of samples (Fig. 7.5 and 7.6) and with their behavior in SGF and SIF during incubation (Fig. 7.4). Since, the absorbance at 280 nm and the antioxidant activity were features of Pf only in different

samples, the obtained values effectively reflect the solubility of Pf, even as MD/Pf and CMS-Pf solubility. With this new approach, the drying time (5h) can be eliminated since an intrinsic characteristic (absorption at 280 nm or antioxidant capacity) may be directly determined once obtained from the filtered saturated solutions. Overall, this new approach with 5 h solubilization time (incubation) instead 24 h and avoiding drying time (5h) permitted to save about 24 h and may be considered as a fast method.

This procedure is advantageous for multicomponent samples containing different compounds (*i.e.*: MD/Pf and CMS-Pf), when it is difficult to determine their solubility by measuring the dry weight per volume. Also salts present in dissolution media (SGF, SIF) may influence results. In Table 7.2, the solubility measurements and values obtained for each sample are described in terms of the USP-NF (U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35), 2016).

The co-processing (MD/Pf) and complexation (CMS-Pf) of Pf clearly enhanced the solubility of Pf in different media (Table 7.2), and probably, its bioavailability. Native Pf, sparingly soluble in aqueous media, became soluble in water, in SGF and in SIF when aggregated with MD. Also, CMS-Pf complex was soluble in water and in SIF, with the highest solubility (freely soluble). MD/Pf and CMS-Pf were both soluble in water and in SIF, but the CMS-Pf solubility values were significantly higher than those of MD/Pf. (Table 7.2).

The highest solubility in SGF was unexpected for CMS-Pf because normally CMS is protonated in SGF with a loss of solubility. The high solubility of the complex CMS-Pf is a proof of complexation when carboxylate groups complexed with the Pf alkaloid are unable to protonate in gastric acidity. Practically, carboxylate groups cannot be protonated when complexed with Pf alkaloids.

Generally, the solubility of Pf alone is approximately 4-5 times lower than that of CMS-Pf complex, in all media. This is a proof that the high increase of Pf solubility is due to its complexation as CMS-Pf. Similar results were observed by previous studies during the complexations of sanguinarine alkaloid with carboxylatopillar-6-arene (Ping *et al.*, 2017), of opipramol with β -cyclodextrin (Majewska *et al.*, 2018) and of temozolomide with cyclodextrins (Gürten *et al.*, 2018).

The approach here described may give better solubility values of Pf, even when is complexed as CMS-Pf. Furthermore, the enhanced solubility of Pf is a good achievement (otherwise the Pf, although effective, would be in risk of abandon because of its low solubility).

Gastric acidity (Fasting gastric juice acidity in healthy subjects) is from pH 1.2 up to 2.9 (Lu *et al.*, 2010), with a considerable variability. On the other hand, corn starch can be depolymerized (partial hydrolysis of alpha-1,4-glucosydic links) by treatment with 0.36 % HCl (pH 1) for 1-8 h (Pratiwi *et al.*, 2018).

Pf processed with Maltodextrin as Pf/MD or complexed as CMS-Pf was maintained for 2-24 hrs in Simulated Gastric Fluid. The USP recommended for SGF pH 1.2. In reality, the pH is fluctuating (Lu *et al.*, 2010) and no marked difference was observed when SGF pH was in the range 1.2-1.5. The pH was slightly increased at pH 1.5 in order to prevent (at least in part) degradation of MD or of CMS (58) which may alter the release profile

Considering their high antioxidant activity, Pf and derivatives (MD/Pf, CMS-Pf) could be used in this regard for several purposes. With enhanced Pf solubility, it could be easier to formulate dosage forms for controlled release.

Preliminary dissolution tests revealed that complexation of Pf with CMS could prolong the release time of Pf for several hours (depending on the degree of substitution of CMS). This is a major achievement compared to the tablets formulated with Pf or with MD/Pf which release about 700 mg in less than 50 min in SGF.

In vitro liberation patterns showed that CMS-Pf complex formulations were able to provide a limited slow release of Pf in simulated gastric fluid (2 h), following by a sustained release for 9-12 hours in SIF according to the DS of the CMS matrix and to the HPMC binding agent amount (Fig. 7.10). The sustained release of Pf is thus expected to ensure a long-lasting action. Furthermore, complexed Pf seems able to prevent undesirable interactions or antagonistic effects when associated with other bioactive ingredients (*i.e.* Artemisinin).

7.8 Conclusion

The Pf extract appeared as a natural alkaloid extract with high antioxidant activity. Its solubility increased when processed with MD as Pf/MD or complexed with CMS as CMS-Pf, without modification of its antioxidant activity. The complexation with CMS generates interactions between amine group of Pf and carboxylate group of CMS. Complexation of Pf with CMS presents several advantages such as enhanced solubility, increased stability and easier controlled release tablet formulation with extended release time of Pf, as requested for long lasting action and for improving bioavailability.

A faster and simpler approach was proposed to quantify the effective solubility (mg/mL) of an active agent based on one of its intrinsic properties such as absorption at certain wavelength (where other components will not absorb) or antioxidant capacities, even when the bioactive agent (*i.e.* Pf) is in a complexed form or mixed with other compounds (*i.e.* Artemisinin) in antimalaria combined therapy.

7.9 Figures and tables

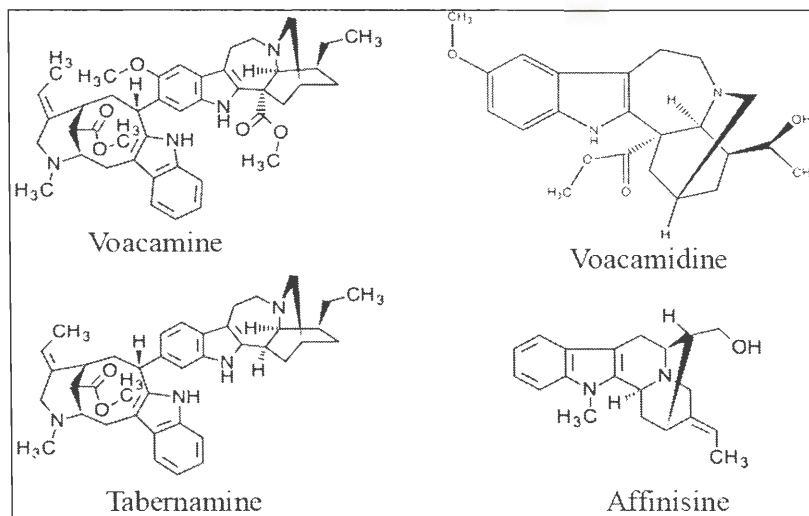


Fig. 7.1: Chemical structures of principal alkaloids from Pf extract

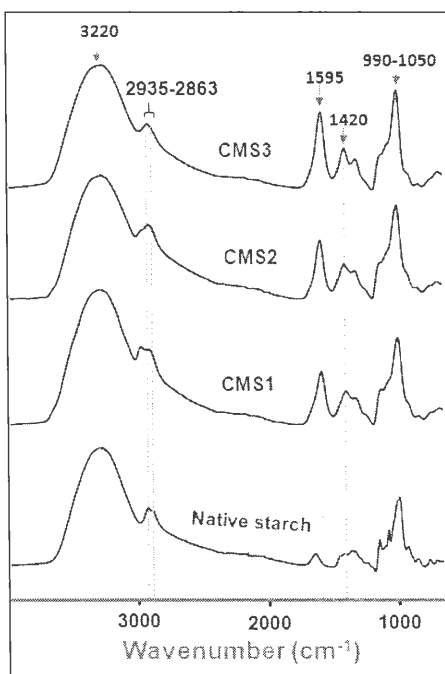


Fig. 7.2: FTIR spectra of different Carboxymethylstarch (CMS) and of native starch

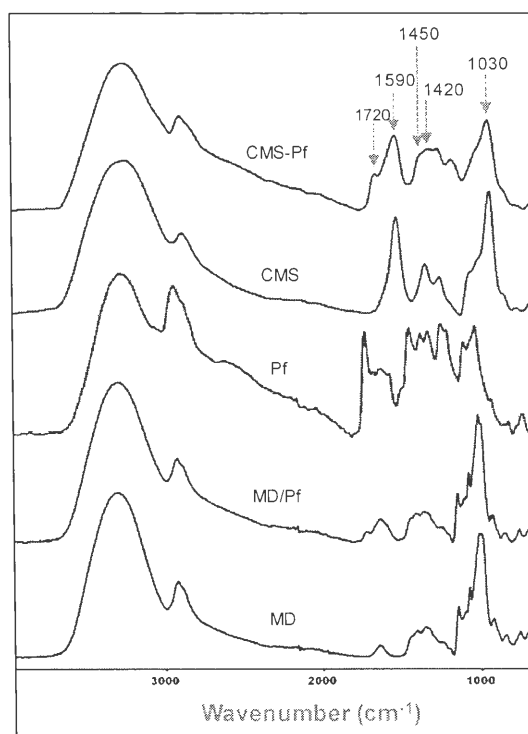


Fig. 7.3: FTIR spectra of powders of CMS-Pf complex, CMS, free Pf, MD/Pf and MD.

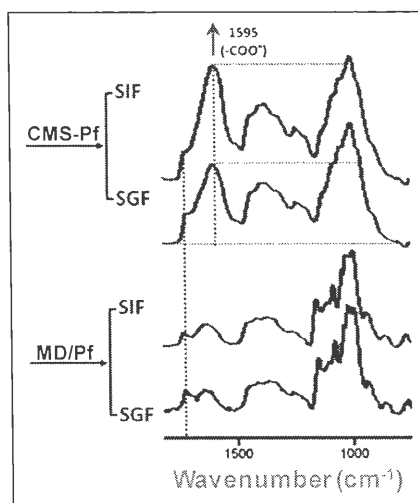


Fig. 7.4: FTIR spectra of CMS-Pf and MD/Pf tablets after incubation in simulated gastric (SGF) and intestinal (SIF) fluids

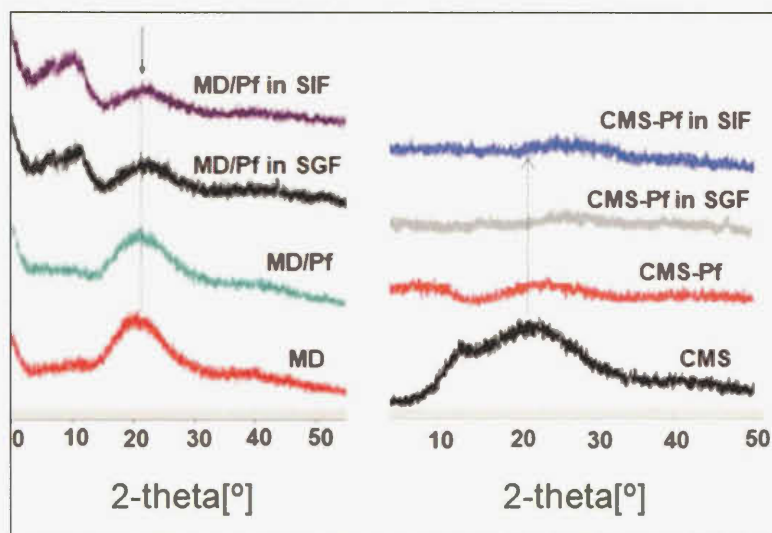


Fig. 7.5: X-Ray diffractograms of MD, MD/Pf (co-processed) and of CMS and CMS-Pf complexes. The MD/Pf and CMS-Pf in SGF or in SIF are in tablet dry forms. After incubation in SGF or in SIF, the tablets were dried before X-ray analysis.

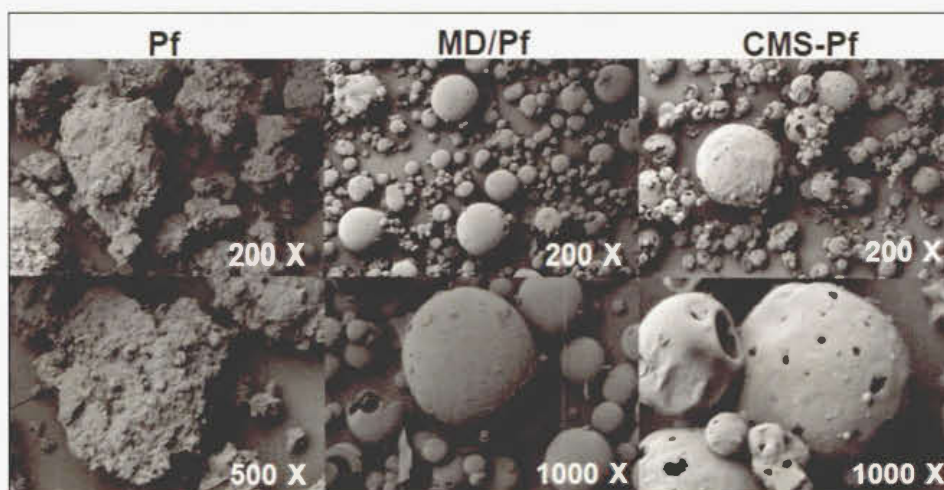


Fig. 7.6: Scanning Electronic Microscopy of Pf, co-processed MD/Pf and CMS-Pf complexes at different magnitudes

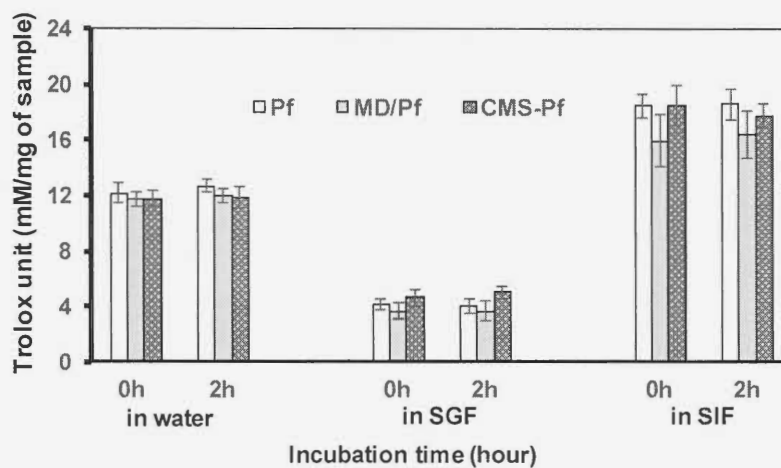


Fig. 7.7: Antioxidant capacity of Pf, MD/Pf and CMS-Pf before (0h) and after incubation (2h) in water, in SGF or in SIF.

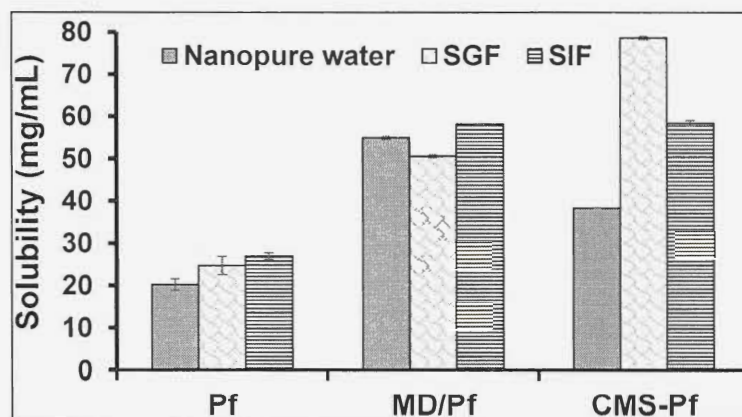


Fig. 7.8: Solubility in saturation condition of Pf, MD/Pf and CMS-Pf in different media using drying method

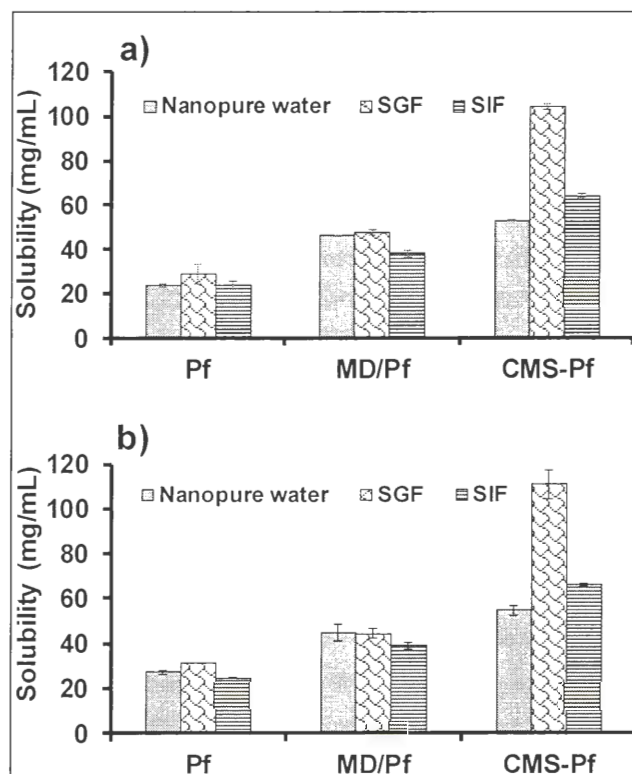


Fig. 7.9: Solubility of Pf, MD/Pf and CMS-Pf determined following the new approach based on the absorbency of Pf at 280 nm in different media at various times of incubation: 5h (a) and 24h (b). Solubilities were also quantified by antioxidant capacity of Pf and no significant differences were obtained when compared with data obtained by spectrophotometric dosage at 280 nm.

Table 7.1: Antioxidant activity of Pf, MD/Pf and CMS-Pf versus the antioxidant activity of equal mass of Trolox

Antioxidant activity (% of Trolox activity)			
Sample type	Water	SGF	SIF
Pf	15.23 ±0.48	5.21 ±0.11	23.11 ±2.98
MD/Pf	14.67 ±0.23	4.58 ±0.03	19.95±5.19
CMS-Pf	14.74 ±0.05	5.78 ±0.34	23.20 ±6.27

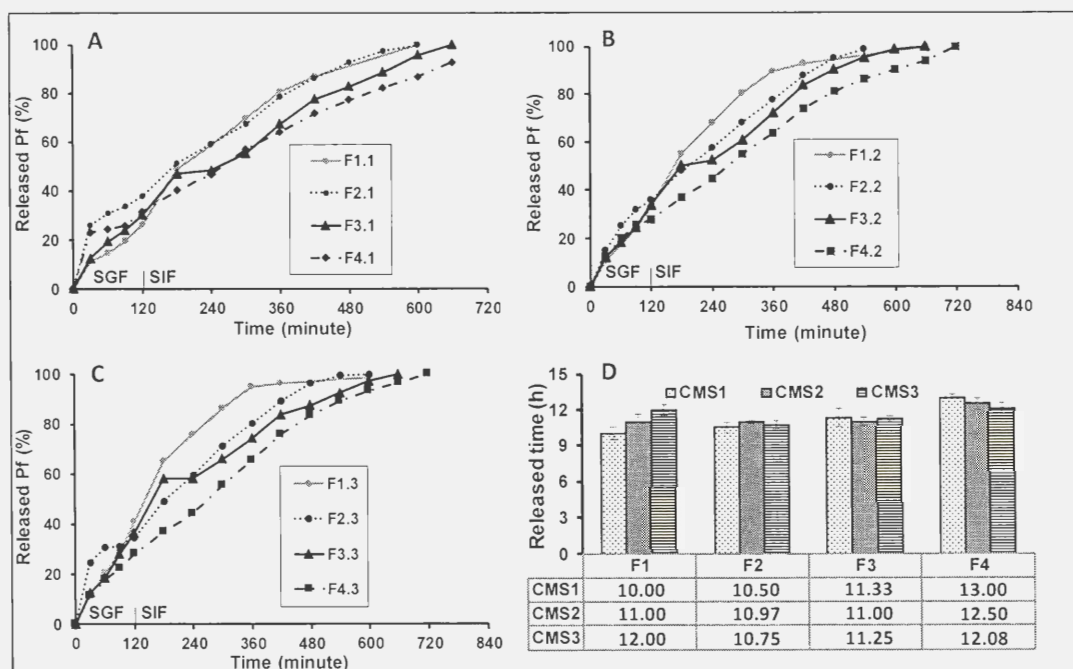


Fig. 7.10: Release profiles (A-C) and release time (D) of *Peschiera fuchsiaeifolia* extract from tablets of 755-855 mg formulated with CMS as matrix containing 450 mg Pf as API, 15 mg magnesium stearate (lubricating agent) and CMS1 or CMS2 or CMS3 (120 mg), with different amounts of HPMC in formulation F1 (100 mg), F2 (120 mg), F3 (150 mg), F4 (200 mg) respectively. When the matrix used was CMS1, the formulations (A) were labeled as F1.1, F2.1, F3.1 and F4.1. For CMS2 the formulations (B) were F1.2, F2.2, F3.2 and F4.2 and for CMS3 they (C) were F1.3, F2.3, F3.3 and F4.3. These release profiles represent quantities (%) of released Pf in 1000 mL of simulated gastric fluid (SGF, pH 1.5) during 2 h and then transferred and continued in 1000 mL of simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8), at 37 °C and 100 rpm, followed with a dissolution device Distek (Apparatus 2).

Table 7.2: Solubility of various Pf forms in different media according to the USP

Solubility in various media (mg/mL)				
Sample	Water	SGF	SIF	Descriptive terms
Pf	27.32 ±0.88	31.07 ±0.01	24.49 ±0.38	Sparingly soluble
MD/Pf	44.87 ±3.69	44.28 ±2.05	38.97 ±1.68	Soluble
CMS-Pf	54.41 ±2.64	110.91 ±8.46	65.74 ±0.95	Soluble in water and SIF Freely soluble in SGF

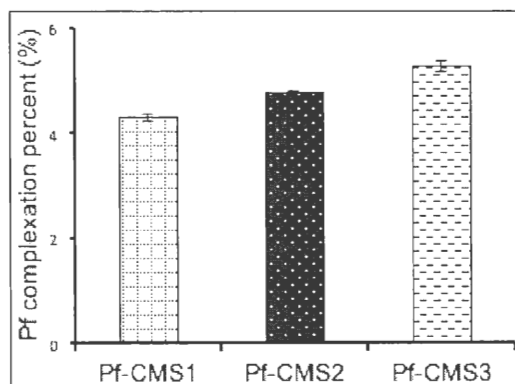


Fig. 7.S1: Quantity of Pf complexed to CMS according to DS of the CMS. In an aqueous filtered (0.45 μ m) solution of Pf (3 g in 200 mL) was added 3 g of CMS (CMS1, CMS2 or CMS3). The mixture was incubated under stirring at 37 $^{\circ}$ C for 2h. Then, the CMS was precipitated with ethanol and Pf complexed to CMS was determined by absorbance measurement at 280 nm.

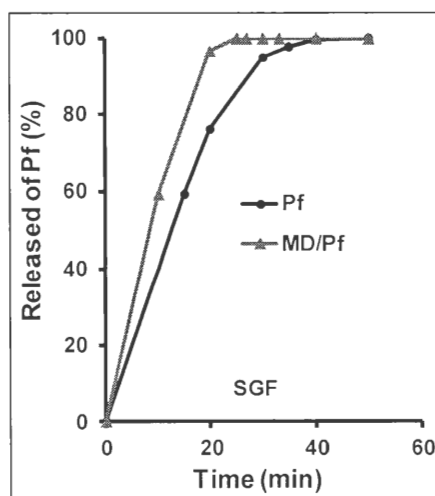


Fig. 7.S2: Release profiles of free Pf and MD/Pf. The Pf was totally released in 1000 mL of simulated gastric fluid (SGF, pH 1.5) during less than 60 min.

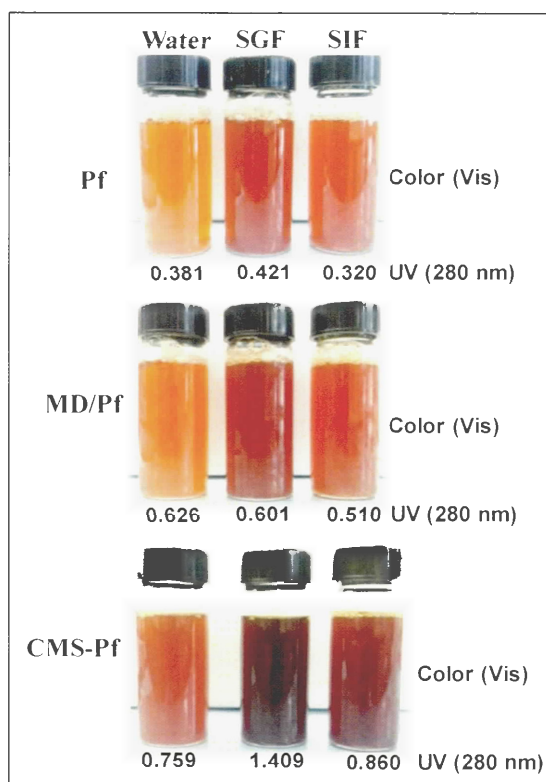


Fig. 7.S3: Color intensities and absorbencies at 280 nm (λ_{max}) of Pf, MD/Pf and CMS-Pf saturated solutions in different media. Values on pictures are $\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ obtained after dilution (1/500) of samples.

7.10 References

1. Combined Chemical Dictionary. Alkaloids. *CRC Press: Taylor and Francis Group*. 2017. Alkaloids. <http://ccd.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearchResults.xhtml>. Accessed 2 Nov 2017.
2. Murphy D. J. 2017. Alkaloids. In B. Thomas, B. G. Murray et D. J. Murphy. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (2nd Ed.)* (p. 118-124). Oxford : Academic Press.
3. Souto AL, Tavares JF, Da Silva MS, Diniz MdFFM, De Athayde-Filho PF, Barbosa Filho JM. Anti-inflammatory activity of alkaloids: an update from 2000 to 2010. *Molecules*. 2011;16:8515-34.

4. Küpeli E, Koşar M, Yeşilada E, Başer KHC. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish Berberis species. *Life Sci.*, 2002;72:645-57.
5. Song Z, Ao M. Research progress of alkaloids in Uncaria. *Med. Plant.*, 2014;5:56-8.
6. Lau Y-S, Machha A, Achike FI, Murugan D, Mustafa MR. The aporphine alkaloid boldine improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Exp. Biol. Med.*, 2012;237:93-8.
7. Roberts MF. Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications: *Springer Science & Business Media*; 2013.
8. Isah T. Anticancer Alkaloids from Trees: Development into Drugs. *Pharmacogn Rev.*, 2016;10:90-9.
9. Winzer T, Gazda V, He Z, Kaminski F, Kern M, Larson TR, et al. A Papaver somniferum 10-Gene Cluster for Synthesis of the Anticancer Alkaloid Noscapine. *Science*. 2012;336:1704-8.
10. Zhou L-N, Ge X-L, Dong T-T, Gao H-Y, Sun B-H. Antibacterial steroidal alkaloids from *Holarrhena antidysenterica*. *Chin J Nat Med.*, 2017;15:540-5.
11. Nair JJ, Wilhelm A, Bonnet SL, Van Staden J. Antibacterial constituents of the plant family *Amaryllidaceae*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017;27:4943-51.
12. Frederich M, Tits M, Angenot L. Potential antimalarial activity of indole alkaloids. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2008;102:11-9.
13. Komlaga G, Genta-Jouve G, Cojean S, Dickson RA, Mensah MLK, Loiseau PM, et al. Antiplasmodial Securinega alkaloids from *Phyllanthus fraternus*: Discovery of natural (+)-allonorsecurinine. *Tetrahedron Letters*, 2017;58:3754-6.
14. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005;434:214.
15. World Health Organization. World Malaria Report 2017. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2017; 196 p. Accessed April, 05th 2018: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/>
16. World Health Organization. Malaria-Areas of work: Overview of malaria treatment. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Accessed April 05th, 2018: <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/>

17. Ancolio C, Azas N, Mahiou V, Ollivier E, Di Giorgio C, Keita A, et al. Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and Sao Tome. *Phytother. Res.*, 2002;16:646-9.
18. Frédérich M, Tits M, Hayette M-P, Brandt V, Penelle J, DeMol P, et al. 10 '-Hydroxyusambarensine, a new antimalarial bisindole alkaloid from the roots of *Strychnos usambarensis*. *J Nat Prod.*, 1999;62:619-21.
19. Asrade S, Mengesha Y, Moges G, Gelayee DA. *In vivo* antiplasmodial activity evaluation of the leaves of *Balanites rotundifolia* (Van Tiegh.) Blatter (*Balanitaceae*) against *Plasmodium berghei*. *J.Exp. Pharmacol.*, 2017;9:59.
20. Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Federici E, Galeffi C, Arancia G. Voacamine, a bisindolic alkaloid from *Peschiera fuchsiaefolia*, enhances the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrug-resistant tumor cells. *Int. J. Oncol.*, 2003;23:1505-13.
21. Zocoler MA, Oliveira AJBd, Sarragiotto MH, Grzesiuk VL, Vidotti GJ. Qualitative determination of indole alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (*Apocynaceae*). *J. Braz. Chem. Soc.*, 2005;16:1372-7.
22. Federici E, Palazzino G, Nicoletti M, Galeffi C. Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaefolia*. *Planta medica*. 2000;66:93-5.
23. Chowdhury SR, Kumar A, Godinho JLP, Silva STDM, Zuma AA, Saha S, et al. Voacamine alters *Leishmania* ultrastructure and kills parasite by poisoning unusual bi-subunit topoisomerase IB. *Biochem. Pharmacol.*, 2017;138:19-30.
24. Chaudhary A, Nagaich U, Gulati N, Sharma VK, Khosa RL, Partapur MU. Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review. *J Adv Pharm Educ Res*. 2012;2:32-67.
25. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm*. 2012:195727, 10 pp.
26. Shao D, Yang Z, Zhou G, Chen J, Zheng S, Lv X, et al. Improving the solubility of acipimox by cosolvents and the study of thermodynamic properties on solvation process. *J. Mol. Liq.*, 2018;262:389-95.
27. Asghar SZ, Jouyban A, Martinez F, Rahimpour E. Solubility of naproxen in ternary mixtures of {ethanol + propylene glycol + water} at various temperatures: Data correlation and thermodynamic analysis. *J. Mol. Liq.*, 2018;268:517-22.

28. Dizaj SM. Preparation and study of vitamin A palmitate microemulsion drug delivery system and investigation of co-surfactant effect. *J Nanostruct Chem.*, 2013;3:59.
29. Raval AJ, Patel MM. Preparation and characterization of nanoparticles for solubility and dissolution rate enhancement of meloxicam. *Int Res J Pharm.*, 2011;1:42-9.
30. Jagdale SC, Jadhav VN, Chabukswar AR, Kuchekar BS. Solubility enhancement, physicochemical characterization and formulation of fast-dissolving tablet of nifedipine- β -cyclodextrin complexes. *Braz J. Pharm. Sci.*, 2012;48:131-45.
31. Sabzevari A, Adibkia K, Hashemi H, De Geest BG, Mohsenzadeh N, Atyabi F, et al. Improved anti-inflammatory effects in rabbit eye model using biodegradable poly beta-amino ester nanoparticles of triamcinolone acetonide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2013;54:5520-6.
32. Das SK, Kahali N, Bose A, Khanam J. Physicochemical characterization and in vitro dissolution performance of ibuprofen-Captisol® (sulfobutylether sodium salt of β -CD) inclusion complexes. *J. Mol. Liq.*, 2018;261:239-49.
33. Zhang L, Liu M, Lu C, Ren D, Fan G, Liu C, et al. The hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation of toltrazuril for enhancing bioavailability. *Drug Des Devel Ther.*, 2018;12:583.
34. Kawakami K. Miscibility analysis of particulate solid dispersions prepared by electrospray deposition. *Int J Pharm.*, 2012;433:71-8.
35. Tabbakhian M, Hasanzadeh F, Tavakoli N, Jamshidian Z. Dissolution enhancement of glibenclamide by solid dispersion: solvent evaporation versus a supercritical fluid-based solvent -antisolvent technique. *Res Pharm Sci.*, 2014;9:337-50.
36. Yuvaraja K, Das SK, Khanam J. Process optimization and characterization of carvedilol solid dispersion with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and tartaric acid. *Korean Journal of Chemical Engineering.* 2015;32:132-40.
37. Javadzadeh Y, Ahadi F, Davaran S, Mohammadi G, Sabzevari A, Adibkia K. Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2010;81:498-502.
38. Mohammadi G, Nokhodchi A, Barzegar-Jalali M, Lotfipour F, Adibkia K, Ehyaei N, et al. Physicochemical and anti-bacterial performance characterization of clarithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids Surf. B*, 2011;88:39-44.

39. U.S. Food and Drug Administration. GRAS Notice 616: Acetylated high amylose corn starch. In: US FDA, editor. GRAS Notice 2016.
40. Zhou M, Shi L, Cheng F, Lin Y, Zhu PX. High-Efficient Preparation of Carboxymethyl Starch via Ball Milling With Limited Solvent Content. *Starch-Stärke*. DOI: 2018;70:1700250.
41. Haroon M, Wang L, Yu H, Ullah RS, Zain Ul A, Khan RU, et al. Synthesis of carboxymethyl starch-g-polyvinylpyrrolidones and their properties for the adsorption of Rhodamine 6G and ammonia. *Carbohydr Polym*. 2018;186:150-8.
42. Assaad E, Mateescu MA. The influence of protonation ratio on properties of carboxymethyl starch excipient at various substitution degrees: Structural insights and drug release kinetics. *Int J Pharm.*, 2010;394:75-84.
43. Le Tien C, Millette M, Mateescu MA, Lacroix M. Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteria immobilization. *Biotechnol Appl Biochem.*, 2004;39:347-54.
44. Stojanović Ž, Jeremić K, Jovanović S, Lechner MD. A Comparison of Some Methods for the Determination of the Degree of Substitution of Carboxymethyl Starch. *Starch - Stärke*. 2005;57:79-83.
45. Konan KV, Le Tien C, Mateescu MA. Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. *Anal. Methods*, 2016;8:5638-44.
46. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.*, 1999;26:1231-1237.
47. Iveković D, Milardović S, Roboz M, Grabarić BS. Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. *Analyst*. 2005;130:708-14.
48. U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35). Description and Relative solubility of USP and NF Articles. United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2016; Rockville, Md, USA, 2017. p. 2453-2454.
49. Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos AM, Cal-Vidal J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innov Food Sci Emerg Tech.*, 2005;6:420-428.
50. U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35). Dissolution. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2016; Rockville, Md, USA, 2017. p. 588-610.

51. Lemieux M, Gosselin P, Mateescu MA. Influence of drying procedure and of low degree of substitution on the structural and drug release properties of carboxymethyl starch. *AAPS PharmSciTech.*, 2010;11:775-785.
52. Calinescu C, Mulhbachter J, Nadeau É, Fairbrother JM, Mateescu MA. Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2005;60:53-60.
53. Calinescu C, Mateescu MA. Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008;70:582-9.
54. Herraiz T, Galisteo J. Endogenous and dietary indoles: a class of antioxidants and radical scavengers in the ABTS assay. *Free Radic Res.*, 2004;38:323-331.
55. Chaiyana W, Punyoyai C, Somwongin S, Leelapornpisid P, Ingkaninan K, Waranuch N, et al. Inhibition of 5 α -reductase, IL-6 secretion, and oxidation process of Equisetum debile Roxb. ex vaucher extract as functional food and nutraceuticals ingredients. *Nutrients.* 2017;9:1105.
56. Wang H, Guo X, Hu X, Li T, Fu X, Liu RH. Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (*Vaccinium* spp.). *Food chem.*, 2017;217:773-781.
57. Ping G, Wang Y, Shen L, Wang Y, Hu X, Chen J, et al. Highly efficient complexation of sanguinarine alkaloid by carboxylatopillar[6]arene: pKa shift, increased solubility and enhanced antibacterial activity. *Chem. Commun.*, 2017;53:7381-7384.
58. Majewska K, Skwierawska A, Kamińska B, Przeźniak-Welenc M. Improvement of opipramol base solubility by complexation with β -cyclodextrin. *Supramol. Chem.*, 2018;30:20-31.
59. Gürten B, Yenigül E, Sezer AD, Malta S. Complexation and enhancement of temozolomide solubility with cyclodextrins. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2018;54:e17513
60. Lu P-J, Hsu P-I, Chen C-H, Hsiao M, Chang W-C, Tseng H-H, et al. Gastric juice acidity in upper gastrointestinal diseases. *World J. Gastroenterol.*, 2010;16:5496-5501.
61. Pratiwi M, Faridah DN, Lioe HN. Structural changes to starch after acid hydrolysis, debranching, autoclaving-cooling cycles, and heat moisture treatment (HMT): A review. *Starch-Stärke.* 2018;70: 1700028.

CHAPITRE VIII

MANUSCRIT: FORMULATION ANTIPLASMODIALE : ARTÉMISININE ASSOCIÉE À DES ALCALOÏDES BIS-INDOLIQUES (L'EXTRAIT DE LA *PESCHIERA FUCHSIAEFOLIA*)

Ce manuscrit a été soumis pour publication sous forme d'article dans la revue scientifique *Phytotherapy Research*. L'évaluation par le comité de lecture est en cours.

Contributions des (co) auteurs

Kouadio Victorien Konan : Expérimentation, analyse des résultats, montage des figures, recherche bibliographique, rédaction et correction du manuscrit.

Tien Canh Le : Supervision des travaux, analyse des résultats et révision du manuscrit

Mircea Alexandru Mateescu : Supervision du projet et révision du manuscrit

8.1 Résumé

Les agents antipaludiques utilisés en monothérapie pour le traitement du paludisme sont de plus en plus inefficaces en raison de l'émergence de souches résistantes du *Plasmodium* à travers de multiples mutations, spécialement dans *P. falciparum*, le parasite le plus dangereux et le plus mortel. L'Artémisinine (Arte), encore bien efficace contre plusieurs souches de *Plasmodium*, est principalement utilisée pour le traitement du paludisme. Cependant, l'apparition de nouvelles souches de résistance à l'Arte a été reportée en Thaïlande. Afin d'y remédier, l'utilisation de Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) avec un autre agent antiplasmodial est recommandée par l'OMS pour fournir un remède efficace et retarder la résistance. Bien que des formulations en CTA ont été développées, leur libération de principes actifs est fréquemment immédiate et requiert de multiples doses avec des effets secondaires préjudiciables et efficacité encore à désirer. De plus, avec leur coût élevé, ces traitements sont peu accessibles par la plupart des populations impaludées issues des régions pauvres. En vue d'améliorer leur efficacité, des formulations à libération contrôlée ont été développées pour assurer une activité antiplasmodiale à long terme en associant l'Arte à un autre agent antiplasmodial naturel, l'extrait de la plante *Peschiera fuchsiaeifolia* (Pf). L'extrait de Pf (essentiellement composé d'alcaloïdes bisindoliques) a été complexé avec le carboxyméthylcellulose pour améliorer sa solubilité et sa stabilité. Pour les comprimés bilayer ("bicouche"), la cinétique de libération était de type libération immédiate de l'Arte, suivie par une libération lente et prolongée de Pf durant 10-12 h. Avec les comprimés monolithiques, les profils de libération montraient une libération soutenue et prolongée des deux agents actifs, environ 8 h pour Arte et 10 h pour Pf. Aussi, cette formulation assurait un chargement élevé des agents actifs, et une stabilité dans le milieu gastro-intestinal. Aucun effet significatif d'interaction entre les deux agents actifs n'a été détecté *in vitro*. Des méthodes de dosage simples et rapides ont également été développées pour quantifier ces agents bioactifs de la nouvelle association médicamenteuse dans des fluides biologiques.

Mots clés : Solubilité améliorée; Formulation à libération contrôlée; Combinaison Artémisinine-*Peschiera fuchsiaeifolia*; CTA (Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine); Libération différentielle

Antiplasmodial formulation of Artemisinin combined with *Peschiera fuchsiaefolia*
bis-indole alkaloids

K. V. Konan, C. Tien Le and M. A. Mateescu*

Department of Chemistry, Research Chair on enteric dysfunctions "Allerdys",
Pharmaqam and CERMO-FC Centers, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888,
Branch A, Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada

*Corresponding author

Phone: +1 (514) 987 4319

Facs: +1 (514) 987 4054

email: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

8.2 Abstract

Antimalarial agents used as monotherapy are increasingly ineffective due to the emergence of *Plasmodium* resistant strains, developed through multiple mutations in *Plasmodium*, especially *P. falciparum*, the most dangerous and the deadliest. Artemisinin (Arte), extracted from *Artemisia annua*, presents a good efficiency against the *Plasmodium* strains and is mainly used to treat malaria. To avoid the appearance of new resistance strains to artemisinin, the use of Artemisinin-based Combination Therapy (ACT) with another antimalaria agent is recommended by WHO to provide an effective cure and delayed resistance. Although several drug combination formulations with Artemisinin have been developed, their release is immediate and requires multiple doses with side detrimental effects and effectiveness still to be desired. Moreover, with their high costs, these treatments are less accessible by most malarious populations from poor areas. To improve its efficiency, controlled release formulations were developed to ensure long-term antiparasitic activity by combining Artemisinin with a natural antimalarial agent extract from *Peschiera fuchsiae* (Pf). The Pf extract (containing mostly low soluble alkaloids) was complexed with carboxymethylcellulose to improve its solubility and stability. Used under bilayer tablet dosage form, the kinetic release was characterized by an immediate release of Artemisinin, followed by a slow sustained release of Pf for 12 h. For monolithic tablet, the dissolution profile shows a simultaneous release of the two active agents, about of 10 h for Arte and 12 h for Pf. No marked interaction between the two active agents was detected *in vitro*.

Keywords: ACT (Artemisinin-based Combination Therapy); Alkaloid Complexed CMC; Artemisinin-*Peschiera fuchsiae* combination; Dual sustained release tablets; Enhancing solubility of alkaloids

8.4 Introduction

Malaria parasite, *Plasmodium*, infects hundreds of millions of people yearly and causes hundreds of thousands of deaths in various endemic areas, mainly in tropical and subtropical areas (Snow *et al.*, 2005; World Health Organization, 2010c, 2015, 2016, 2017c) endemic disease (Akinosoglou *et al.*, 2012; World Health Organization, 2010c, 2015). Although to a lesser extent, the Middle East and parts of Eastern Europe are also affected by this endemic disease (Akinosoglou *et al.*, 2012; Brabin, 2014). About half of the world's population is exposed to the female anophele mosquito (Dondorp et Von Seidlein, 2017; World Health Organization, 2016) which is the principal vector of *Plasmodium falciparum*, responsible for over 80 % of infections and about 90 % of deaths from malaria (Gething *et al.*, 2011; Hay *et al.*, 2008; Hay et Snow, 2006).

Despite many decades of research and development efforts, there is no commercially available malaria vaccine at the present time (World Health Organization, 2017a), so drugs remain the best way to control the infection.

The main therapy used for decades (i.e. Chloroquine) was confronted with an increasing resistance of *Plasmodium* strains and was abandoned in favor of Artemisinin (Arte) and its derivatives.

Used in monotherapy, Arte (Fig. 8.1) inhibits parasite metabolism faster and more effectively than other antimalarial drugs (Hien et White, 1993). However, Arte and its derivatives have short half-time (about 2 h) and are rapidly excreted (Gordi *et al.*, 2002) resulting in a recrudescence of malaria (Amaratunga *et al.*, 2012; Dondorp *et al.*, 2009; World Health Organization, 2005). Furthermore, the continuous use of oral Artemisinin-based monotherapies contributes to the development of resistance to this drug (Dondorp *et al.*, 2009; Fairhurst et Dondorp, 2016). Accordingly, WHO promoted

the use of Artemisinin-based Combination Therapies (ACTs) as the mainstay of antimalarial treatments (World Health Organization, 2010a, 2010b, 2014, 2017b). ACT consists to combine Arte with another antiplasmodial bioactive agent, preferably a drug possessing a long half-life to prolong antimalarial activity in order to enhance antiparasite efficacy and to reduce the risk of emergent new resistant strains (World Health Organization, 2010a). ACT forms have been already described with Artesunate and amodiaquine (Coarsucam®), Artemether and lumefantrine (Coartem®), (Blasco *et al.*, 2017; World Health Organization, 2018).

Fixed-dose formulations combining the two different active ingredients in one tablet are preferred and recommended over co-blistered, co-packaged or loose tablet combinations, since they facilitate the treatment and reduce the number of individual administration of components in monotherapy (World Health Organization, 2014, 2017b). Furthermore, the controlled release formulation for a long sustain-release of the associated antimalarial agent, is of interest for antiplasmodiale therapy.

Although, ACTs were considered effective in treating malaria (Adjei *et al.*, 2016; Bouchaud *et al.*, 2012; White, 1997; World Health Organization, 2017c; Zwang *et al.*, 2009). However, emergence of ACT resistant *Plasmodium falciparum* strains was recently observed (Ashley *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2017; World Health Organization, 2016). It was then considered suitable to associate Artemisinin with other antimalarial drugs with different mechanisms of action. One of the most promising is the association of artemisinin with a natural antimalarial agent extracted from *Apocynaceae* plant family, *Peschiera fuchsiaefolia* (Pf).

The bioactive agents of the Pf extract contain bisindolic alkaloid rings (Fig. 8.1) and are efficient against *Plasmodium* at its two stages of development, in the liver and the erythrocytes (Ramanitrahasimbola *et al.*, 2001). Its antimalarial activity is mainly attributable to voacamin (Ramanitrahasimbola *et al.*, 2001) which may act in concert

with one or more other indole alkaloids (Federici *et al.*, 2000) present in the extract such as voacamidine, affinisine and tabernamine. These bisindole alkaloids from Pf extracts (i.e. voacamine), may act as inhibitors of *p*-glycoprotein or analogue (Meschini *et al.*, 2003) produced by the malaria parasite as protection against any treatment. This *p*-glycoprotein inhibitory action could promote the bioavailability of Arte partner and prolong its half-life, which would increase its antiplasmodial activity, especially for the resistant strains of *Plasmodium* (Federici *et al.*, 2000; Meschini *et al.*, 2003).

The Pf extract is already used in traditional medicine to treat malaria in Sao Paulo (Brasilia) (Zocoler *et al.*, 2005), safe and approved for use in several countries as antimalarial drug (National Center for Biotechnology Information, 2017).

Pf is composed several alkaloids which are poorly soluble in aqueous media. To overcome the solubility barrier, Pf extract was complexed with carboxymethylated starch (CMS) which can increase its solubility and then its bioavailability (Konan *et al.*, 2018). Despite the advantageous features of CMS when used in oral drug delivery systems (Assaad et Mateescu, 2010; Le et Mateescu, 2017; Lemieux *et al.*, 2010), this starch derivative is difficult to validate due to large variation of degree of substitution and commercialized only to use as disintegrant agent and not for sustained released dosage forms. Since commercial carboxylated cellulose (CMC) exhibits several physicochemical properties similar to CMS, it was selected in this study. USP grade CMC is commercially available and easy to obtain with various viscosities at different degrees of substitution.

Like CMS, the CMC exhibits carboxyl groups. It is considered as an anionic polysaccharide with abilities to interact with cationic materials. As showed recently, carboxyl groups can interact with amine groups of Pf to form CMC-Pf complex, which could enhance Pf water-solubility (Konan *et al.*, 2018).

Also, CMC used as excipient may ensure similar properties of CMS, high loading of bioactive agent, gastric resistance, adequate intestinal delivery and long-term stability during storage (Anirudhan *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2015). CMC seems versatile with a large range of drugs and easy to manufacture by direct compression of the mixture of dried powders (CMC excipient and bioactive agent). Moreover, CMC is used as excipient for drug controlled release formulation to extend its contact time with the target, to reduce side effects and to improve the bioavailability of drugs (Le et Mateescu, 2017; Wen *et al.*, 2012).

In addition, CMC is already FDA approved, commercially available at low cost with various DS.

This report is aimed to develop sustained-release formulations under monolithic and bilayer tablet dosage forms by combining Arte with CMC-Pf (after enhancing of the solubility of Pf alkaloids by complexation with carboxymethylcellulose (CMC-Pf).

8.5 Materials and methods

Peschiera fuchsiaefolia (Pf) extract was provided by Yerbalatina Phytoactives (Colombo, Parana, Brazil) and Artemisinin by Changsha Inner Natural *Inc.*, (Changsha, Hunan, China).

Sodium carboxymethylcellulose (CMC, high viscosity) was purchased from Galenova (St-Hyacinthe, QC, Canada) and Maltodextrin (MD) was from Aldrich chemical Company Inc (Milwaukee, WI, USA). High amylose corn starch was from Ingredion (Hylon VII, Bridgewater, NJ, USA). The ABTS [2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] diammonium salt (purity 98 %), and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid) 97 % were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The (hydroxypropyl)methyl cellulose (HPMC) was from Dow Chemical Company (Midland, MI, USA).

All other reagents used were of analytical grade and used without further purification.

8.5.1 Preparation of polysaccharide complexes with Pf

CMS with different degrees of substitution was synthesized from high amylose starch (Hylon VII) as described by Assaad and Mateescu (Assaad et Mateescu, 2010) and the DS was determined by titrimetry (Le Tien *et al.*, 2004).

Briefly, an amount of 100 g of Hylon VII were dispersed in 250 mL distilled water. After hydration during 10 min at 50-60 °C, a volume of 200 mL of 4 M NaOH was added for gelatinization under continuous stirring for 1 h. Various quantities (60-100 g) of sodium monochloroacetate (solubilized in 120 mL water) were added in the mixture, always under continuous stirring for 24 h of reaction. After neutralization (pH 7.0) of the solution with acetic acid, the CMS was precipitated by adding an excess of ethanol/water (80:20, v/v) solution and was filtered on Whatman cellulose filter paper. Then, the CMS was dehydrated by washing three times with pure acetone and the CMS mass was air-dry for residual solvent elimination and obtaining of the powder.

The *Peschiera fuchsiaefolia* (Pf) pure extract was complexed respectively with CMC and CMS. Also, it was co-processed with maltodextrin (MD) to obtain respectively CMC-Pf, CMS-Pf complexes and the MD/Pf aggregating.

For the CMC-Pf and CMS-Pf complexes, they were obtained by mixing carboxyl polysaccharide solution with Pf previously dissolved in ethanol (60 %). After homogenization, CMC-Pf or CMS-Pf complex powders were obtained by spray-drying (Büchi Mini Spray Dryer B-290, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). Practically, the CMC or CMS was dispersed at 1 % in water. After homogenization, a volume of 400 mL of CMC suspension was slowly added in 480 mL ethanol 60 % containing 20 % of Pf. The final ratio Pf/carboxyl polymer (w/w) was respectively

about 96/4. These solutions were maintained under agitation at room temperature until spray-drying to obtain CMC-Pf or CMS-Pf complex powders. The spray-drying parameters were: i) inlet temperature 150 °C; ii) outlet temperature 100 °C; iii) spray flow 500 L/h, and iv) aspirator setting at 38 m³/h. During the drying process, the Pf/polymeric excipient suspension was gently stirred avoiding sedimentation. The concentration of CMC or CMS in the final product was approximately 4 %. The co-processed MD/Pf was obtained in the same conditions, but the MD/Pf (w/w) ratio used was 10/90; thus, concentration of MD used to co-process with Pf was 10 %.

8.5.2 Characterization

8.5.2.1 Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

For comparative study, different samples (CMC, CMS, CMC-Pf, CMS-Pf and MD/Pf) were analyzed before and after incubation in SGF (pH 1.5) for 2 h and in SIF (pH 6.8) for 2 h.

The spectra (FTIR) of different samples under tablet form (CMC, CMS, MD, CMC-Pf complex, CMS-Pf complex and MD/Pf aggregated) were performed in Thermo Scientific Nicolet 6700/Smart iTR (Madison, WI, USA). FTIR spectrometer equipped with a deuterated triglycinesulfate-KBr (DTGS-KBr) detector and a diamond smart attenuated total reflection (ATR) platform. Before taking each spectrum, the crystal was cleaned with ethanol and a background spectrum was acquired. Sample spectra were recorded at room temperature for 32 scans with a resolution of 4 cm⁻¹.

8.5.2.2 X-Ray Diffraction (X-RD)

The diffraction patterns of CMC, CMC-Pf, MD and MD/Pf were recorded using a Siemens D-5000 diffractometer (Munich, Germany) with a SOL-X detector and a Cobalt cathode in reflectance mode at a wavelength of 1.789 Å. The diffractograms

were registered over an angular range of 2θ from 0° to 30° and a scan rate of 2° per minute and treated using Diffracplus software.

8.5.2.3 Scanning electron microscopy (SEM)

The microstructures of Pf, MD, MD/Pf and CMS-Pf were taken with a JSM-6010LV InTouchScope TM (SEM) (JEOL, Tokyo, Japan) using a secondary electron image detector. An amount of 10 mg of powders was mounted on a metal stub with an adhesive and covered under vacuum with a fine layer of gold in a sputter coater BIO-RAD E5200 (Bio-Rad Laboratories Ltd., London, UK). The SEM microphotographs were obtained by accelerating voltages of 1.5 kV.

8.5.2.4 Thermogravimetry analysis

Thermogravimetric analyses (TGA) were conducted with TA Instruments TGA (Q500)/Discovery MS. Samples of CMC-Pf complex, CMC and Pf (1-10 mg), placed in platinum pans, were heated from 30 to 400°C at a temperature variation rate of $10^\circ\text{C}/\text{min}$, under a constant nitrogen flow ($100\text{ mL}/\text{min}$). Thus, thermogravimetric curves (thermogram) were obtained and the weight loss (%) was calculated.

8.5.3 Stability of CMC-Pf

Structural stability of CMC-Pf was evaluated after incubating in SGF and in SIF. Tablets of CMC-Pf obtained by direct compression of the powders ($2.0\text{ T}/\text{cm}^2$) under flat-faced round shape, were incubated (0-2 h at 37°C) in SGF and/or in SIF, then dried and the structure was analyzed by FTIR. On the other hand, sample was dissolved and incubated (0-2 h at 37°C) in SGF or SIF before antioxidant activity measurement (method described below).

8.5.4 Antioxidant properties

Antioxidant activity of CMC-Pf complex was evaluated and compared to CMS-Pf complex and Pf. Samples were dissolved in medium (nanopure water, SGF or SIF) and antioxidant properties evaluated by the improved TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) fast assay as described by Konan *et al* (Konan *et al.*, 2016). Indeed, a volume of 6.5 mL (140 μ M in 0.85 % NaCl) ABTS was electrolyzed (400 Volts, 10 mA) for 20 seconds to generate the ABTS^{•+} radical. The electrodes were in platinum, with 2 mm diameter x 25 mm length and the inter-electrode space was of 26 mm.

A volume of 950 μ L of ABTS^{•+} solution was mixed with 50 μ L of 0-200 mM Trolox (to establish standard curve) or 50 μ L of tested samples (Pf, MD/Pf or CMC-Pf) and the absorbance was read at 734 nm after 1 min. The decrease of absorbency due to the antioxidant capacity reflects the scavenging of the free radical (ABTS^{•+}). The ability of Pf, MD/Pf and Pf-CMS to scavenge the ABTS^{•+} radical cations were compared to that of Trolox (structural hydrosoluble analogue of vitamin E) used as reference antioxidant. The results are expressed in μ M or mM of Trolox equivalence per mass (mg) of product.

Each measurement consisted of at least five readings and the values represented the mean $\pm$ standard deviations.

8.5.5 Solubility assay

Solubility of CMC-Pf in different media (nanopure water, Simulated Gastric Fluid [SGF], Simulated Intestinal Fluid [SIF]) was evaluated as described by Konan *et al* (Konan *et al.*, 2018) approach. The solubility value (mg/mL) which is the maximal concentration (mg/mL) of sample in a medium after saturation was determined on basis of absorbency at 280 nm. An excess of CMC-Pf (approx. 2 g) in 10 mL of the medium

(nanopure water, SGF or SIF) was shaken at 37 ° C for 5h and the mixture was centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min. The supernatant was filtered with 0.45 μm Millipore filter. The effective concentration (mg/mL) of Pf in an aliquot (1 mL) was evaluated in UV at 280 nm (described in dissolution assay section) as a function of sample concentration (mg/mL) using a standard curve previously established.

8.5.6 Dosage methods of Pf and Arte

8.5.6.1 Determination of maximal absorption values of Pf and CMC-Pf complex

The UV-visible absorption spectra of Pf and CMC-Pf complex filtered solutions were acquired using a UV-Visible spectrometer (Genesys™ 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA) in the range of 190-700 nm.

8.5.6.2 Quantitation of Pf released from dissolution assay

Quantitation of Pf was done by UV-Vis spectrometry at 280 nm (Fig. 8.2A), based on indole nuclei of alkaloids (active agents) of Pf extract. An aliquot (1 mL) of released solution was filtered (pore diameter 0.45 μm) and the absorbance at 280 nm of 1 mL was read.

8.5.6.3 Quantitation of Artemisinin released from dissolution assay

A spectrophotometric method was used as described by Konan *et al* (Konan *et al.*, 2016). Indeed, it consists in using the chromogenic ABTS (initially colorless) reagent that was oxidized by the endoperoxide of Artemisinin in acidic medium (Sreevidya et Narayana, 2009) to form a radical cation ($\text{ABTS}^{\bullet+}$, Fig. 8.2B). The generated $\text{ABTS}^{\bullet+}$ green-blue color (measured at 734 nm) is directly proportional to the concentration of Artemisinin present in the medium.

Practically, an amount of 1 % sulfuric acid was added (in excess) to break the endoperoxide bond and liberate hydrogen peroxide (H_2O_2). This H_2O_2 reacted with ABTS reagent and developed the colored product, the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Fig. 8.2B) with a proportional intensity to the quantity of Artemisinin present in the sample.

Standard curves previously established in appropriate medium (nanopure water, SGF or SIF) permitted to determine the quantity of Pf and of Arte.

8.5.7 *In vitro* evaluation of Arte and Pf interaction

To examine the drug-drug interactions as well as their stabilities in gastric acidity, Artemisinin and Pf were incubated in SGF (pH 1.5, at 37°C) for 2 h and analyzed by FTIR, NMR and antioxidant capacity.

After incubation, Arte was separated from Pf by decantation, washed and dried before FTIR and RMN analyses whereas Pf (in presence or not of Arte) solutions were filtered and their antioxidant capacity was evaluated.

8.5.8 Formulation of Arte combined with CMC-Pf tablets

The one factor at a time (OFAT) approach was used to optimize the formulation and achieve the desired release percentage. This consists in varying one factor at a time and keeping in constant the other factors. The quantities of Arte and CMC-Pf (bioactive agents) were respectively fixed at 100 mg and 450 mg. Two dosage forms were developed: bilayer and monolithic tablets.

8.5.8.1 Bilayer tablet formulation

The Arte layer consisted in mixing of 100 mg of Arte with cross-linked sodium cellulose (Croscarmellose sodium, XC, 2-150 mg). The Pf layer was composed of 400 mg of CMC-Pf complex powders, mg of CMC (DS 80 %), 100 mg of hydroxypropyl

methycellulose (HPMC) and 15 mg of magnesium stearate. The bilayer tablet was obtained first by direct compression (Carver Press, Wabash, IN, USA) of CMC-Pf/excipients mixture at 1.3 T/cm², followed by filling of Artemisinin/XC mixture powders directly on the CMC-Pf layer and finally, compacted at 2.3 T/cm² to obtain bilayer tablet dosage form.

8.5.8.2 Monolithic tablet formulation

Monolithic tablet dosage form was obtained by compacting (in the flat-faced punches) of 100 mg of Arte, 10 mg of XC, 400 mg of Pf, 100 mg of HPMC, 200 mg of CMC and 15 mg of magnesium stearate.

8.5.9 Disintegration test

Approximate disintegration time of tablets was determined using an ED-2L disintegrator tester (Electrolab, India) according to USP 40/ 701 specifications (United States Pharmacopeial Convention, 2017b). Tablets (n=6) were placed in each basket of the disintegration test apparatus. The time required for disintegration was measured at 37± 2 °C at 25 rpm using first 900 mL SGF for one hour, then 900 mL SIF for total disintegration and the time was recorded.

8.5.10 Dissolution assay

Dissolution assay was done first in simulated gastric fluid (SGF, pH 1.5) for 2 h and then in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8) as referred by USP method 40 (U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35), 2017a). Release kinetics from different formulations were followed at 100 rpm and 37 °C using a Distek dissolution system 2100A (Betatek Inc., Markham, ON, Canada) with a Distek TCS 0200 (North Brunswick, NJ, USA). At predetermined intervals (0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 10 h), released Pf and Arte were quantified using the appropriate method (described above).

For Pf dosage, a volume (5 mL) was withdrawn from dissolution media, properly filtered (0.45 μ m) and diluted before absorbance measurement at 280 nm. To quantify released Arte, the insoluble precipitate was recuperated, washed several times to remove all Pf residues and quantified as previously described.

8.5.11 Mechanic properties of the tablets

8.5.11.1 Weight uniformity test

The uniformity of tablet weight according USP, was evaluated by randomly selecting 20 tablets and calculating the average weight; then the tablet weight limits (superior and inferior) were calculated based on the % error of tablets (which is function the weight of tablet):

$$\text{Superior limit of weight} = \text{Mean Weight} + (\text{Mean Weight} \times \% \text{ error})$$

$$\text{Inferior limit of weight} = \text{Mean Weight} - (\text{Mean Weight} \times \% \text{ error})$$

Because a tablet weight was superior to 324 mg, the % error = ± 5 % following the USP criteria (U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35), 2017b). Tablets used for different tests were those that have a weight in the range of inferior limit to superior limit.

8.5.11.2 Friability test

Tablets friability was determined based on USP/1216 (United States Pharmacopeial Convention, 2017a) using Friability Tester (Varian, Inc., Cary, NC, USA). Since the weight of one tablet was superior to 650 mg, ten (10) tablets were used. After cleaning, without dust, the tablets were weighed together, placed in the friabilator drum and were subjected to 100 revolutions at 25 rpm. The tablets were collected, cleaned, reweighed and their relative weight loss percent (% Friability) was calculated as:

$$\% F = (1 - W / W_o) \times 100$$

Where W_o is the weight of tablets before the test and W is the weight of tablets after the test.

8.5.11.3 Hardness assay

The hardness test was realized according USP/1217 (United States Pharmacopeial Convention, 2017c). The Tensile strength (T , Kg/cm²) of tablets was calculated using the following formula:

$$T = 2 F / \pi \times d \times t$$

F , d and t represented the crushing strength, the diameter and the thickness of tablet, respectively.

The crushing strength F (the force required to break a tablet in a diametric compression) was measured ($n=5$) using a VK 200 tablet hardness tester (Varian, Inc., Cary, NC, USA). Diameter and thickness were assessed using an Electronic Digital Caliper. The F was expressed in kilopond Kp (according to the hardness tester used) which is equivalent to Kg force.

Because tablets have oval shape, the crushing strength (F) was applied to the tablets by taking the length (d_l) or width (d_w) of tablet as diameter (d). The force (F) required to break the tablet during a diametric compression was recorded.

8.5.12 Statistical analysis

All experiments were conducted at least in triplicate and data were presented as the mean $\pm$ standard deviation.

8.6 Results

8.6.1 Characterization of MD/Pf and CMC-Pf complexes and stability in SGF and SIF

8.6.1.1 FTIR analysis

The IR spectral profile of MD showed absorption bands mainly at 3300, 1640 and 1010 cm^{-1} . The co-processed MD/Pf presented similar profile without considerable change, excepted a new band at 1725 cm^{-1} (Fig. 8.3A). Similar observation was noticed for CMC-Pf complex.

After incubation in SGF (2 h) and SIF (2 h), no marked differences in the FTIR patterns were found for MD/Pf (Fig. 8.3B). After incubation 2 h of CMC-Pf complex in SGF, an intensity reduction of the band at 1595 cm^{-1} was observed. In contrast, in SIF, its intensity was re-increased (Fig. 8.3B).

8.6.1.2 X-RD Analysis

X-ray diffractograms (Fig. 8.4) showed that maltodextrin (MD, alone) and Pf aggregated with maltodextrin (MD/Pf) presented a similar profile with a main band located at an angle 2θ 21°. After incubation of the MD/Pf in SGF and then in SIF, a new crystalline form appeared with a band at 14° whereas the band at 21° remained generally unchanged (Fig. 8.4).

In contrast, the CMC and CMC-Pf complex presented a different profile. For CMC alone, X-ray diffractogram showed two bands at 9° and 23°. The main band at 23° indicates that CMC possesses a higher crystalline structure. When complexed with Pf, its X-ray pattern is changed: the band at 9° shifted to 12° whereas the band at 23° showed a wide shoulder with marked loss in its intensity and crystallinity. These changes may explain why the CMC-Pf complex is more soluble. After incubation of

CMC-Pf complex in SGF and then in SIF, the band at 12° became broader whereas that located at 23° was almost lost (Fig. 8.4).

8.6.1.3 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM (at magnification 250, 500 and 1000X) of co-processed MD/Pf and CMC-Pf complex showed granules with spherical shape and variable sizes (Fig. 8.5). However, MD/Pf granules presented spherical smooth surfaces with only a few holes whereas the surface of CMC/Pf exposed numerous holes (Fig. 8.5).

8.6.1.4 Thermogravimetry analysis (TGA)

The thermograms (TG) of MD, CMC, co-processed MD/Pf and CMC-Pf complex are presented in Fig. 8.6. For all samples, a major weight loss from 210 °C was noticed. Generally, TG of MD and MD/Pf presented similar profiles while TG of CMC and CMC-Pf shown a difference. Indeed, CMC thermogram presented a thermal stability reached approximately at a temperature 300 °C whereas CMC-Pf complex was less stable, with a degradation started from 150 °C.

8.6.2 Antioxidant capacity

No major differences between MD/Pf and CMC-Pf were noticed, but these values varied according to the incubating fluids, simulated gastric or intestinal fluids (Fig. 8.7). The antioxidant activity was over expressed in SIF and then in nanopure water. In SGF (pH 1.5), the antioxidant activity decreased considerably, about one quarter of that in SIF (pH 6.8) and a third of values obtained in nanopure water (Fig. 8.7). For MD/Pf, antioxidant capacity values were 11.72 ± 0.49 , 3.66 ± 0.61 and 15.94 ± 1.90 Trolox Unit/mg of sample respectively in nanopure water, in SGF and in SIF versus 11.74 ± 0.71 , 4.12 ± 0.65 and 18.29 ± 0.97 Trolox Unit/mg of sample for CMC-Pf (Fig. 8.7).

8.6.3 Solubility assay

Better solubility was observed for CMC-Pf in different media (Fig. 8.8) which are 52.35 ± 0.99 , 62.49 ± 3.17 and 49.72 ± 1.43 mg/mL respectively in nanopure water, in SGF and in SIF.

8.6.4 Dosage methods of Pf and Arte

The UV-Vis absorption spectrum of CMC-Pf showed 3 maximal absorption bands at 200 nm, 230 nm and 280 nm (Fig. 8.9A). The standard curves of Pf (under CMC-Pf form at 280 nm) in nanopure water (Fig. 8.9B), in SGF (Fig. 8.9C) and in SIF (Fig. 8.9D) presented good linearity, as well as that of Arte (Fig. 8.9E) for quantification methods used. For Pf, quantification was done at 280 nm, whereas the dosage of Arte was realized by spectrophotometry at 734 nm after filtration and dissolving Arte in acetone/water (ratio 40:60) solvent containing ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate] acid), as described in material and methods section.

8.6.5 Interaction study between Arte and CMC-Pf

In vitro interaction of Arte with CMC-Pf was evaluated in SGF. In fact, Arte and CMC-Pf were incubated in SGF (pH 1.5, at 37 °C) separately or one in the presence of each other (Fig. 8.10).

The FTIR analysis showed no significant differences between untreated Arte, Arte incubated alone in SGF and Arte incubated in presence of CMC-Pf in SGF (Fig. 8.10A). Similarly, no significant difference was observed between CMC-Pf incubated in SGF alone or in the presence of Arte (Fig. 8.10B). Similar observation for ^1H NMR analysis was noticed (Fig. 8.10C). Moreover, Arte did not influence the antioxidant property of CMC-Pf (Fig. 8.10D).

8.6.6 *In vitro* study of release kinetics of Arte combined with CMC-Pf

8.6.6.1 Aspect and size of tablets

The tablets were formulated under bilayer and monolithic dosage forms (Fig. 8.11). The sizes of dosage forms are presented in the Fig. 8.11C (length, width and thickness values of the bilayer and monolithic tablets) and the Table 8.1 presents the disintegration times according to the type of tablets.

8.6.6.2 Release kinetic profile

For bilayer tablet, the Arte was immediately released (about of 10 min) in the SGF (Fig. 8.12A), whereas CMC-Pf was slowly released during about 10-12 hours (Fig. 8.12A). For monolithic tablet, the release kinetics of Arte (Fig. 8.12B) was about 51 % after 2 h in SGF and the completely released after 8 h in SIF whereas the CMC-Pf was slower and sustained for about 10-12 h (Fig. 8.12B).

8.6.7 Mechanical properties

Table 8.2 presents mechanical properties (weight uniformity, friability, hardness) of bilayer and monolithic tablet dosage forms.

8.7 Discussion

Peschiera fuchsiaefolia (Pf) is currently commercialized (Yerbalatina Phytoactives, Colombo, Brazil) under MD/Pf aggregated form for reasons such as storage stability and enhanced solubility. Although MD/Pf is soluble in water, but it is poorly soluble in SGF and then in SIF. In contrast, CMC-Pf complex is soluble not only in water, but also in simulated physiological media (SGF and SIF). Additionally, CMC-Pf complex presents several advantages such as low cost, easy to manufacture and more stable during storage.

It is of interest to mention that the the CMC derivative is already approved by FDA and currently available in the market with desired DS (0.7-0.8) which favor complexation (Anirudhan *et al.*, 2018; Le et Mateescu, 2017; Mandal *et al.*, 2017; Wen *et al.*, 2012) between the carboxylate and the amine groups of Pf.

In the FTIR spectrum of MD, absorption bands at 3300 and 1640 cm^{-1} were assigned to O-H groups, and that at 1010 cm^{-1} to C-O groups (Fig. 8.3A). With co-processed MD/Pf, the new absorption band at 1725 cm^{-1} was attributed to C=O groups from ester bonds of Pf (Fig. 8.3A).

For FTIR spectrum of CMC, absorption bands at 1590 and 1415 cm^{-1} were ascribed to asymmetric and symmetric stretching vibrations of carboxylate anions ($-\text{COO}^-$). After complexation with Pf, a new band at 1725 cm^{-1} was attributed to carboxylic ($-\text{COOH}$) and a band appeared at 1525 cm^{-1} (Fig. 8.3A) was ascribed to the ionic interaction between carboxylate groups from CMC and amine groups of Pf.

After incubation of CMC-Pf in SGF (Fig. 8.3B), the reduction in intensity of the absorption band may be related mainly to the protonation of carboxylate to carboxylic acid groups (Assaad et Mateescu, 2010). After transfer and incubation in SIF, a re-increase in intensity would be due to the deprotonation of carboxylic acid group (Le et Mateescu, 2017) in carboxylate groups ($-\text{COO}^-$).

The X-ray patterns (Fig. 8.4) indicated an organized and more stable structure of MD/Pf after incubation in SGF and SIF solutions. This stability of MD/Pf may explain its poor solubility in different media compared to CMC-Pf.

The loss in intensity of the X-ray band at angle $2\theta = 23^\circ$ (Fig. 8.4) means a reducing of CMC-Pf crystallinity. These suggests that complexes adopted a structure less crystalline (amorphous) which could enhance its solubility in SGF and SIF (Fig. 8.4).

The SEM analysis is consistent with this above assertion (Fig. 8.5). During complexation between CMC (carboxylate group) and Pf (amine group), certain

repulsive forces would reduce crystallinity on CMC-Pf surface (Fig. 8.5), resulting an amorphous structure. In fact, CMC is a polysaccharide composed of D-glucose units, of them carrying carboxylate groups. CMC is also hydrophilic and polar whereas Pf is partially hydrophobic (Fig. 8.13) and low polar feature. Opposite hydrophilic/hydrophobic characteristics can generate repulsive forces on certain granule areas, leading probably to the formation of holes (Fig. 8.13).

Maltodextrins possess good film forming properties and used to aggregate with Pf to increase its solubility. Due to its small size (3-20 units of glucose), it was able to cover only partially the Pf granules with less or no repulsive forces generating thus a good stabilization and explaining why co-processed MD/Pf exhibited a smooth surface (Fig. 8.5).

Under heating from 25 to 400 °C, the TGA minor weight loss (shown by the first stage) corresponded to the desorption of water from samples (loss of intramolecular and intermolecular water) around 50-110 °C. The second stage relates to the decomposition or deterioration or degradation (Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). All samples were decomposed (deteriorated) between 200 and 350 °C. The maximum deterioration temperatures (MDT) were respectively 332.8 ± 2.7 °C, 299.26 ± 2.26 °C, 320.43 ± 4.19 °C, 280.51 ± 8.71 °C for MD, CMC, MD/Pf and Pf-CMC.

Antioxidant capacity showed that Pf forms (MD/Pf and CMC-Pf) are good antioxidants compounds (Fig. 8.7). Results were expressed as mM of Trolox per mg of sample (Trolox mM/mg of sample). These antioxidant activity values were higher compared to those of several compounds, polyphenol, fruits, plant extract, wine and (Chaiyana *et al.*, 2017; Konan *et al.*, 2016; Rahaiee *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Difference were high and about 5.10^3 to 10^4 times.

Complexation of Pf with CMC enhanced solubility in different media (Fig. 8.8), and consequently the bioavailability. According to Pharmacopeia and US National Formulary Substances classification, MD/Pf aggregate and CMC-Pf complex may be

considered as soluble (33 mg/mL to 100 mg/mL) in basis on their solubility (maximal concentration value: volume of water, SGF or SIF required for one part of Pf powder [mg/mL]). Thus, Pf particularly under CMC-Pf complex form, was revealed as one of rare natural soluble compounds possessing high antioxidant activity. It could be used for several purposes.

The three peaks at wavelength of 200, 230 and 280 nm from UV-Vis absorption spectrum of CMC-Pf (Fig. 8.9A) could be used for Pf dosage. However, the readings at wavelength in region 200-230 nm could present interferences with the carbonyl (C=O) from the matrix. Consequently, the wavelength range 280 nm was selected for spectrophotometric quantification of Pf. The dosage of Arte was carried out by spectrophotometry at 734 nm based on the oxidized ABTS forming the blue-green ABTS^{•+} radical ($\lambda=734$ nm) with the hydrogen peroxide liberated from Arte in the presence of strong acid (Sreevidya et Narayana, 2009). Good linearities and regression values close to one (Fig 9B-E) permitted to the dosage of Pf and of CMC-Pf and CMS-Pf complexes (Konan *et al.*, 2016).

The Arte with an endoperoxide can be altered in gastric acidity leading to ring opening driven by protonation of the endoperoxide group which can subsequently be reduced to deoxyartemisinin or to 9,10-dihydroartemisinin (Haynes *et al.*, 1999). To examine the co-presence effect of the two active agents, as well as their stabilities in gastric acidity, Arte and CMC-Pf were incubated in SGF (pH 1.5, at 37 °C) for 2 h (Fig. 8.10). No degradation of Arte was observed in SGF in the presence of CMC-Pf neither of CMC-Pf in the presence of Arte (Fig. 8.10A-C). Furthermore, antioxidant activity of CMC-Pf was not affected by the presence of Arte (Fig. 8.10D). Generally, Arte is insoluble in majority of aqueous solvents, consequently stable in gastric acid. It was found to be more stable than its derivatives in the simulated gastric fluid (pH 1.5, 37°C), probably due its lower solubility (Baker *et al.*, 1993). Thus, no *in vitro* interaction between Arte and CMC-Pf was detected.

For release kinetic profiles (Fig. 8.12), two approaches were explored. The first consisted in a sequential kinetic release: an immediate release for Arte (fast action) and a sustained release for Pf as CMC-Pf complex (long lasting action). Such formulation for the combination therapy was obtained by a bilayer tablet dosage form (Fig. 8.11 and 8.12A). In this formulation, Arte is immediately released for fast action whereas Pf sustained release was expected to ensure an action for a long period of time. Since the required pharmaceutical combination was of total and immediate release for Arte (about 10 min) in SGF with a sustained release for Pf, only Pf release was quantified by withdrawal of samples at different times (0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 10 h). Arte layer was totally released in the first minutes (less of 10 min) avoiding the interference in dosage. Although bilayer tablet formulation fits well with the desired criteria of malaria combined therapy, the manufacturing of this dosage form is currently high cost and complicated. Furthermore, it requires special equipment due to multistep processing and longer operating time. For these reasons, it is preferable to develop a monolithic tablet dosage form (Fig. 8.11B). Because its manufacture is simply by direct compaction of API and excipient powder mixture. The monolithic formulation was conceived to allow a prolonged and simultaneous release of the two active agents at different rates. The liberation pattern was a sustained release of about 10-12h for the monolithic tablet containing the two active ingredients (Arte combined with CMC-Pf) and using CMC as matrix (Fig. 8.11 and 8.12B). The two bioactive agents would act concomitantly with different target on the parasite. Another benefic effect when used Pf combined with Arte is due to its capacity to inhibit the P-glycoprotein (Meschini *et al.*, 2003). So, Arte would benefit from this ability by Pf. In fact, an analog of P-glycoprotein is product by *Plasmodium* to protect itself against any treatment. The inhibitory action of P-glycoprotein by Pf would favor the bioavailability of drugs (Arte and Pf) and probably extend their half-life, increasing thus their antiplasmodial activity, especially for resistant strains. Mechanism of alkaloids from Pf extract (Federici *et al.*, 2000) would be conducted by alkylation of proteins or a change in pathogen agent

membrane permeability, causing cell death (Federici *et al.*, 2000; Meschini *et al.*, 2003). Such formulations will contribute to improve the bioavailability, minimize the drug accumulation at long-term use, reduce fluctuations in drug level, enhance safety by decreasing side effects and increase patient compliance.

All tablets used for different test had uniform weights (Table 8.2) for each formulation (bilayer and monolithic). The results of each mechanical test are therefore consistent and conform to USP standards (Podczek, 2012).

The hardness was evaluated using as diameter either the length and the width because the shape of tablets was oval. The high crushing and tensile strengths (Table 8.2) showed tablets with good mechanical properties and more resistance to capping, fracture and abrasion. This revealed the ability of formulated tablets to withstand the stress of packaging, transportation, handling. Additional, friability percents of tablets from different formulations (Table 8.2) were lower than 1 %, the limit of maximum allowable loss (Podczek, 2012; United States Pharmacopeial Convention, 2017d) which are conforms with USP norms. To confirm, an *in vivo* study of CMC-Pf/Arte combination is necessary to highlight its availability in comparing with MD/Pf and its effectiveness comparing with the conventional combination and controlled released interest for antimalarial strategy.

8.8 Conclusion and perspectives

Controlled release anti-malarial based on ACT was formulated by combination of Arte and Pf extract (natural antimalarial agent extracted from plant) previously complexed with CMC as CMC-Pf). These sequential and differential release formulations ensured a long duration of antiplasmodial activity, as requested for long lasting action. It was possible to complex CMC with Pf, generating interactions between amine (Pf) and carboxylate (CMC) resulting CMC-Pf complex. These interactions allowed to enhance solubility, consequently bioavailability, to increase stability in SGF and to prevent

undesirable interactions or antagonistic effects with other bioactive ingredients, particularly, in our case, with Arte. Pf biological activity, principally antioxidant activity was preserved after complexation.

8.9 Figures and tables

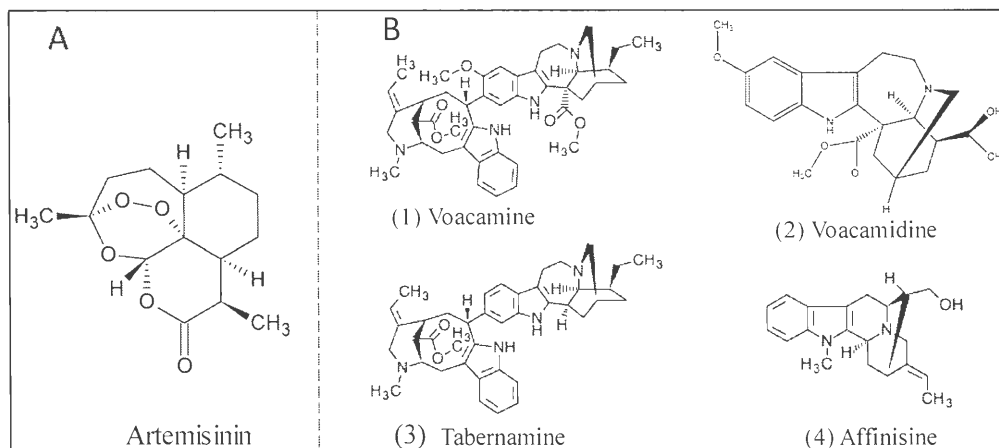


Fig. 8.1: Chemical structures of: A) Artemisinin and B) some alkaloids from Pf extract.

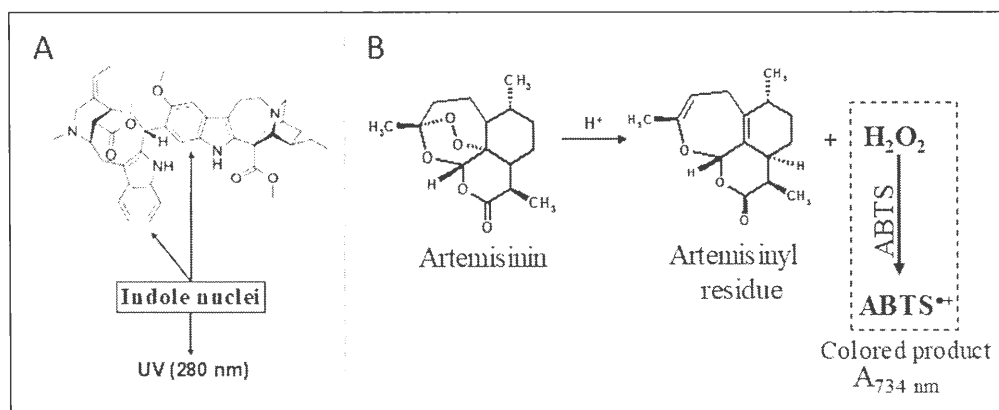


Fig. 8.2: Dosage methods of: A) Pf (*i.e.* voacamin) by UV Spectrophotometric method; B) Arte: Scission of Artemisinin endoperoxide bond generating hydrogen peroxide which may react with ABTS to produce $ABTS^{\bullet+}$ (colored product, $A_{734\text{ nm}}$).

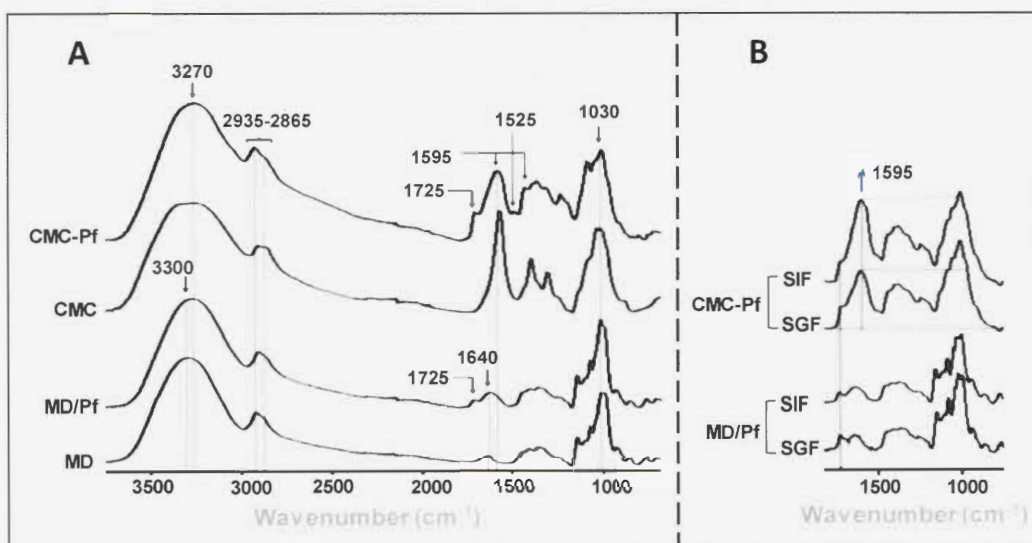


Fig. 8.3: FT-IR spectra of: A) MD and CMC free and complexed with Pf; B) MD/Pf and CMC-Pf after incubation in simulated gastric fluid (SGF) and then in simulated intestinal fluid (SIF).

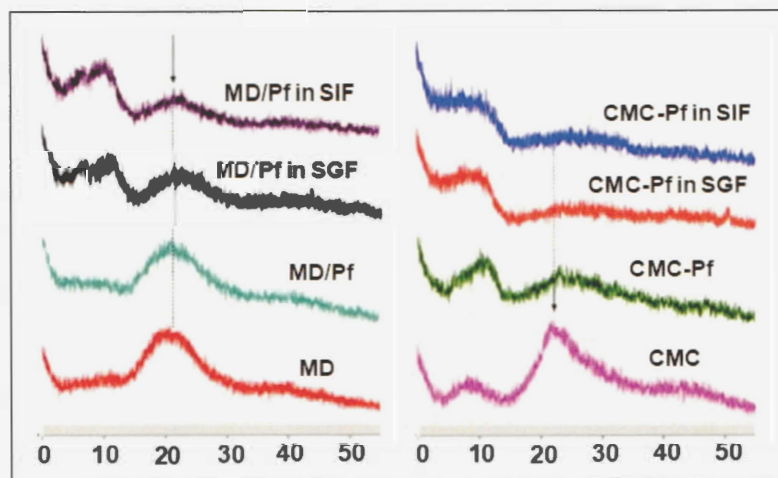


Fig. 8.4: X-ray diffractograms of MD, CMC and of co-processed MD/Pf and CMC-Pf complexes before and after incubation in SGF and in SIF.

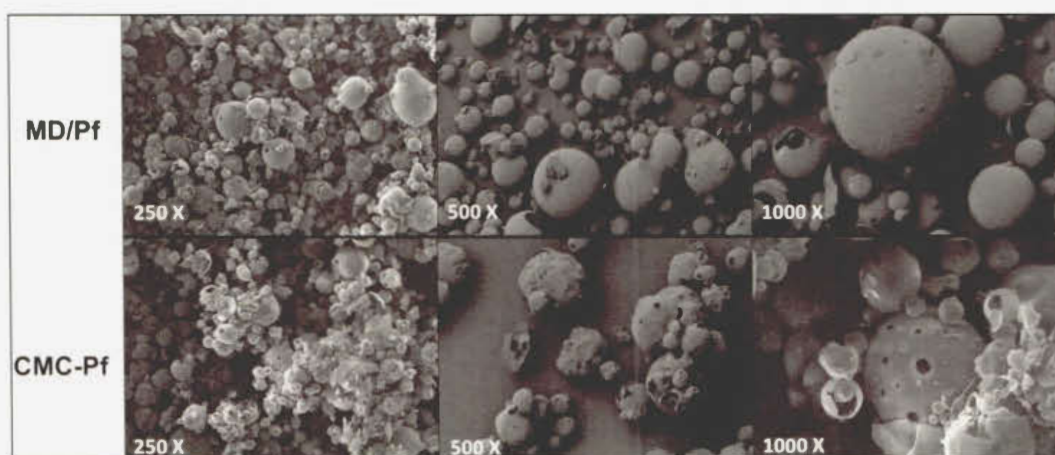


Fig. 8.5: Scanning Electron Microscopy of MD/Pf aggregates and of CMC-Pf complexes

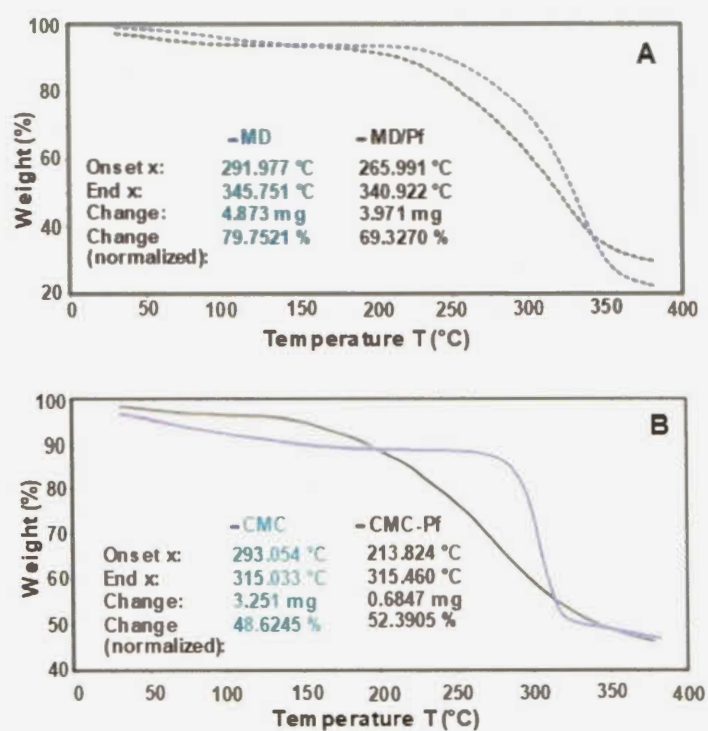


Fig. 8.6: Thermograms of A) maltodextrin (MD) and co-processed MD/Pf; B) CMC and CMC-Pf complex

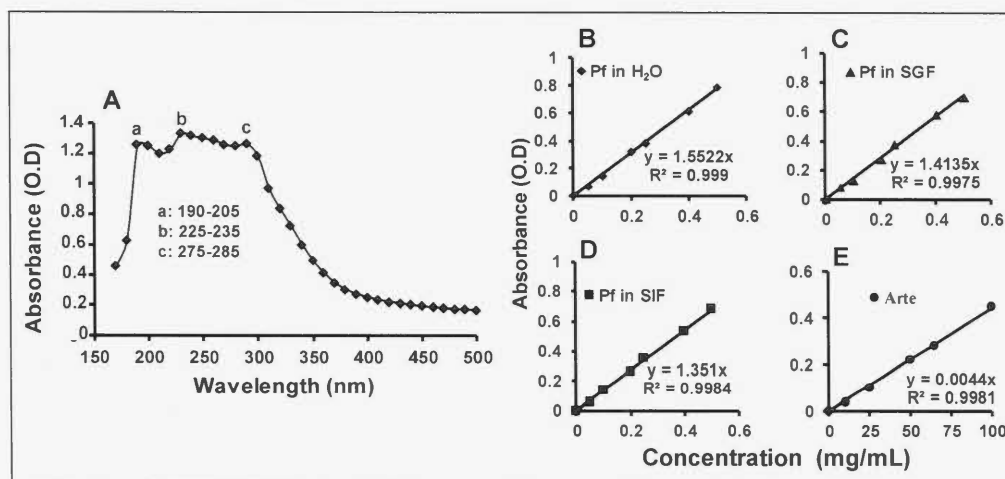


Fig. 8.9: Quantification methods. A) UV-Vis absorption spectrum of CMC-Pf complex; B-D) Standard curve of Pf by Spectrophotometric at 280 nm; E) Standard curve of Arte by ABTS reagent.

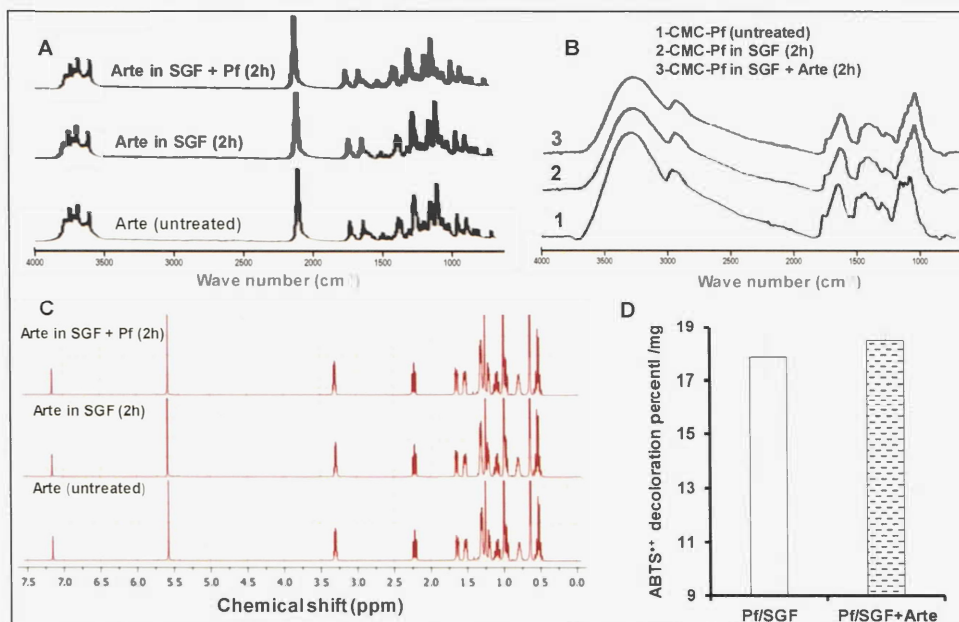


Fig. 8.10: Behavior of Arte (or CMC-Pf) in the presence of CMC-Pf (or Arte) after incubation first in SGF and then in SIF, one in the presence or no of the other: A) FTIR spectra of Arte; B) FTIR spectra of CMC-Pf; C) ¹HNMRSpectra of Arte and D) Antioxidant capacity of CMC-Pf in the presence or not of the Artemisinin.

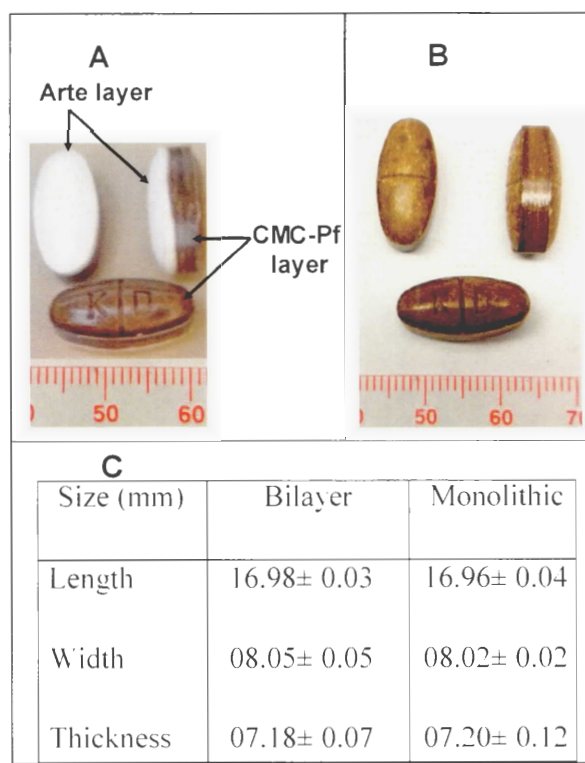


Fig. 8.11: Pictures of bilayer (A) and monolithic (B) tablets for ACT with Arte and CMC-Pf and (C) size of tablets (length, width and thickness).

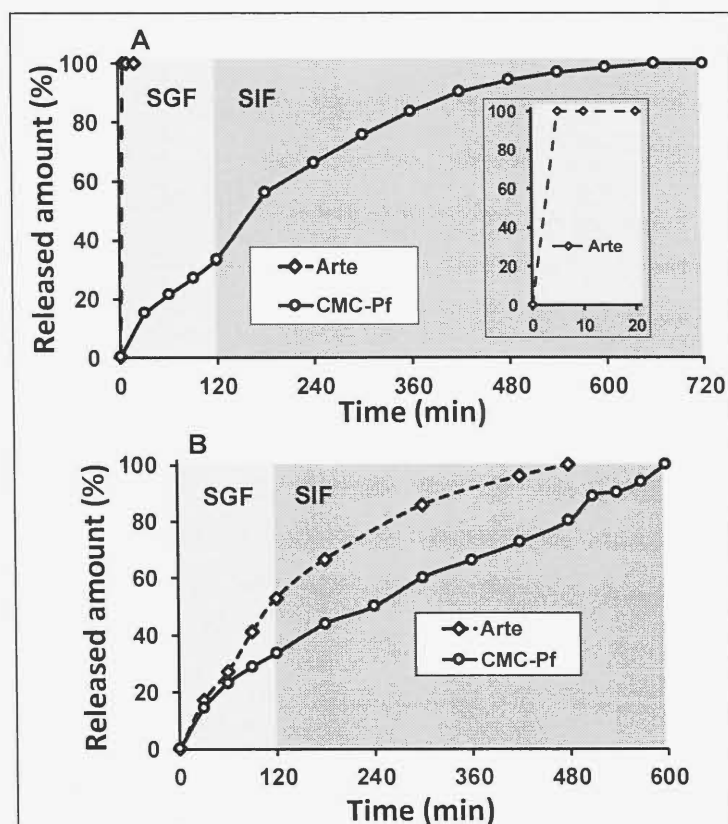


Fig. 8.12: Kinetic release profiles of combined Artemisinin and CMC-Pf tablet under: A) bilayer and B) monolithic dosage forms

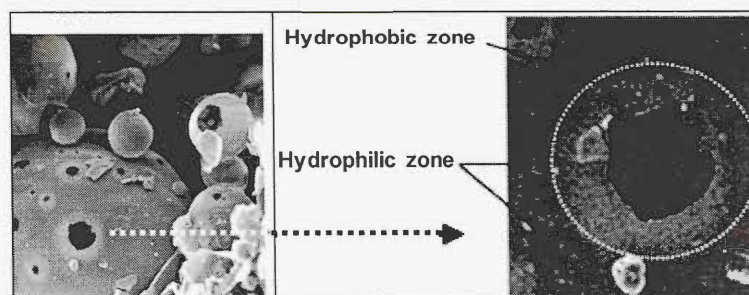


Fig. 8.13: SEM schematic presentation of hydrophobic and hydrophilic zones of CMC-Pf complex

Table 8.1: Type of tablet and disintegration time

Tablets	Disintegration time (hours)	Observations
Bilayer:	(Arte) 0.17 ± 0.03	In SGF - Arte layer: total disintegration - Pf layer: no evidence of disintegration, no capping, no fissuring.
	(Pf) 10.25 ± 1.2	In SIF Pf layer: total disintegration
Monolithic	10.50 ± 1.5	In SGF: no evidence of disintegration, no capping, no fissuring. In SIF: total disintegration

Table 8.2: Mechanical properties of the tablets

Tablet form	Weight uniformity (interval, mg)	Friability (% mass)	Hardness	
			crushing strength (Kg)	Tensile strength, T (Kg/cm ²)
Bilayer	[780.60;862.77]	0.756 ± 0.00	$d_l = l \quad 35.00 \pm 1.25$	$d_l = l \quad 1.80 \pm 0.05$
			$d_w = w \quad 35.00 \pm 1.33$	$d_w = w \quad 1.83 \pm 0.02$
Monolithic	[771.27;852.45]	0.622 ± 0.01	$d_l = l \quad 34.58 \pm 0.94$	$d_l = l \quad 0.086 \pm 0.00$
			$d_w = w \quad 30.39 \pm 2.14$	$d_w = w \quad 0.111 \pm 0.01$

Length (l) and width (w) were taken as diameter ($d_l = l$ or $d_w = w$) for applying of the crushing strength.

Acknowledgements

Support from NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council) of Canada (RDC program) granted to Prof. M.A.M for this project is gratefully acknowledged.

8.10 References

- Adjei A., Narh-Bana S., Amu A., Kukula V., Nagai R.A., Owusu-Agyei S., Oduro A., Macete E., et al., 2016. *Malar J.*, 15, 43-51
- Akinosoglou K.S. Solomou E. E et Gogos C.A, 2012. *Hematology.* 17, 106-114.
- Amaratunga C., Sreng S., Suon S., Phelps E.S., Stepniewska K., Lim P., Zhou C., Mao S., Anderson J.M., et al., 2012. *Lancet Infect. Dis.*, 12, 851-858.
- Anirudhan T.S., Nair A.S. et Gopika S.S., 2017. *Int. J. Biol. Macromol.*, 8130, 31945-31951.
- Ariey F., Witkowski B., Amaratunga C., Beghain J., Langlois A-C., Khim N., Kim S., Duru V., Bouchier C., Ma L., Lim P., et al., 2014. *Nature*, 505, 50-55.
- Ashley E.A., Dhorda M., Amaratunga C., Lim P., Suon S., Sreng S., Anderson J.M., Mao S., Sam B., Sopha C., et al., 2014. *N. Engl. J. Med.*, 371, 411-423.
- Assaad E. and Mateescu M.A., 2010. *Int J Pharm.*, 15, 75-84.
- Baker, J.K., Mc Chesney, J. D., Chi, H.T. 1993. *Pharm. Res.*, 1993, 10, 56-62.
- Balser K., 1985. Polysaccharides, W. Burchard (Ed.), *Springer*, Berlin (1985), 84-110.
- Bouchaud O., Mühlberger N., Parola P., Calleri G., Matteelli A., Peyerl-Hoffmann G., Mechai F., Gautret P., Clerinx J., et al., 2012. *Malar J.*, 11, 212-230.
- Chaiyana W., Punyoyai C., Somwongin S., Leelapornpisid P., Ingkaninan K., Waranuch N., Srivilai J., Thitipramote N., et al., 2017. *Nutrients* 9, 1105-1122.
- Chang R-K., Mathias N., Hussain M., 2017. *AAPS J.*, 19, 1348-1358
- Chen X., Wu S-H., Zeng X-B., Jiang X-W., Chen X-P., Yuan J., Lu B-H., Li J., 2013. *Afr J. Tradit Complement Altern Med.*, 10, 261-266
- Corobea M.C., Muhulet O., Miculescu F., Antoniac I.V., Vuluga Z., Florea D., Vuluga D.M., Butnaru M., Ivanov D., et al., 2016. *Polym. Adv. Technol.*, 27, 1586-1595.

- Dabbagh M.A., Ford J.L., Rubinstein M., Hogan J.E., Rajabi-Siahboomi A., 1999. *Pharm Dev Technol.*, 4, 313-24.
- Dondorp A.M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyto A.P., Tarning J., Lwin K.M., Arie F., Hanpithakpong W., Lee S.J., et al., 2009. *N. Engl. J. Med.*, 361, 455-467.
- Federici E, Palazzino G, Nicoletti M et Galeffi C, 2000. *Planta Med.*, 66, 93-95.
- Gething P.W, Patil A.P, Smith D.L, Guerra A.C, Elyazar I.R.F, Johnston G.L, Tatem A.J et Hay S.I, 2011. *Malaria J.*, 10, 378.
- Gordi T, Huong D.X, Hai T.N, Nieu N.T et Ashton M, 2002. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46, 1026-31.
- Hay S.I and Snow R.W, 2006. *PLoS Med.*, 3, 473.
- Hay S.I, Smith D.L et Snow R.W, 2008. *Lancet Infect Dis*, 8, 369-378.
- Haynes, R.K., Hung-On Pai, H., Voerste, A. 1999. *Tetrahedron Lett.*, 40, 4715-4718.
- Hien T.T, White N.J, 1993. Artemisinin. *Lancet*, 6, 603-608.
- Holmberg M., Berg J., Stemme S., Ödberg L., Rasmusson J., Claesson P., 1997. *J. Colloid Interface Sci.*, 186, 369-381.
- Junka K., Sundman O., Salmi J., Osterberg M., Laine J., 2014. *Carbohydr Polym.*, 108, 34-40.
- Konan K.V., Le Tien C. and Mateescu M.A., 2016. *Anal. Methods*, 8, 5638-5644.
- Le T.C., and Mateescu A.M., 2017. *Drug Deliv Transl Res.*, 7, 516-528.
- Le Tien C, Lacroix M., Ispas-Szabo P et Mateescu M.A, 2003. *J. Control. Rel.*, 93, 1-13.
- Li X., Gao W-Y, Huang L-J, Wang Y-L, Huang L-Q, Liu C-X., 2010. *Carbohydr Polym.*, 47, 768-773.

- Liu A., Berglund L.A., 2012. *Carbohydr Polym.* 87, 53-60.
- Lu F., Culleton R., Zhang M., Ramaprasad A., Von Seidlein L., Zhou H., Zhu G., Tang J., Liu Y., Wang W., Cao Y., et al., 2017. *N. Engl. J. Med.*, 376, 991-993.
- Mandal B., Rameshbabu A.P., Soni S.R., Ghosh A., Dhara S., Pal S., 2017. *ACS Appl Mater Interfaces.*, 9, 36583-36595.
- Medronho B., Romano A., Miguel M.G., Stigsson L., Lindman B., 2012 *Cellulose*, 19, 581-587.
- Meng X., Edgar K.J., 2015. *Prog. Polym. Sci.*, 53, 52-85.
- Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Federici E, Galeffi C et Arancia G., 2003. *Int J Oncol.*, 23, 1505-13.
- Munoz J., Rojo-Marcos G., Ramírez-Olivencia G., Salas-Coronas J., Treviño B., Perez A.J.L., et al. 2015. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 33, 1-13.
- NCBI, 2017. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=11953931, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11953931> (accessed Nov. 10, 2017).
- Noedl H., Se Y., Schaecher K., Smith B.L., Socheat D., Fukuda M.M., 2008. *N. Engl. J. Med.*, 359, 2619-2620.
- Nordgren N., Eronen P., Österberg M., Laine J., Rutland M.W., 2009. *Biomacromolecules*, 10, 645-650.
- WHO, 2005. Susceptibility of *Plasmodium Falciparum* to Antimalarial Drugs: Report on Global Monitoring: 1996-2004. Geneva, Switzerland: *World Health Organization*, 2005.
- Palmer D., Levina M., Mokhodchi A., Douroumis D., Farrell T., Rajabi-Siahboomi A., 2011. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 12, 862-871.
- Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P., 2009. *Prog. Polym. Sci.*, 34, 641-678.
- Podczec F., 2012. *Int. J. Pharm.*, 436, 214-232.

- Rachtanapun P., Luangkami S., Tanprasert K., Suriyatem X., 2012. *LWT - Food Sci Technol.*, 48, 52-58.
- Rahaiee S., Moini S., Hashemi M., Shojaosadati S.A., 2015. *J Food Sci Technol.*, 52, 1881-1888.
- Ramanitrahasimbola D, Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Federici E, Palazzino G, Galeffi C et Nicoletti M, 2001. *Phytother. Res.*, 15, 30-33.
- Rao Z., Ge H., Liu L., Zhu C., Min L., Liu M., Fan L., Li D., 2017. *Int J Biol Macromol.*, S0141-8130.
- Riippi M., Antikainen O., Niskanen T., Yliruusi J., 1998. *Eur. J. Pharma. Biopharm.*, 1998, 46, 339-345.
- Snow R.W, Guerra C.A, Noor A.M, Myint H.Y et Hay S.I, 2005. *Nature* 434, 214-217.
- Sreevidya T.V and Narayana B, 2009. *Eurasian J. Anal. Chem.*, 4, 119-126.
- Thakur V.K., Voicu S.I., 2016. *Carbohydr Polym.*, 146, 148-165.
- USP, 2017. U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35). Vol 1. Rockville, Md, USA: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2016. Description and Relative solubility of USP and NF Articles; p. 2453-2454.
- Wang Q., Zhang R., Lu M., You G., Wang Y., Chen G., Zhao C., Wang Z., Song X., Wu Y., Zhao L., Zhou H., 2017. *Biomacromolecules*, 2017, 18, 1333-134.
- Wen H., Dong C., Dong H., Shen A., Xia W., Cai X., Song Y., Li X., Li Y., Shi D., 2012. *Small*, 8, 760-769.
- White N.J., 1997. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 1413-1422.
- WHO, 2010a. World Malaria Report 2010. World Health Organization, Geneva (2010).
- WHO, 2010b. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance 2000-2010. World Health Organization, Geneva (2010).

- WHO 2010c. Regulatory action needed to stop the sale of oral artemisinin-based monotherapy. *WHO Drug Information*, 24, 2010, Geneva.
- WHO, 2014. Essential medicines: Intensified efforts required to withdraw oral artemisinin-based monotherapies. *WHO Drug Information*, 28, 135-144.
- WHO, 2015a. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2015.
- WHO, 2015b. World Malaria Report 2015. World Health Organization, 2015. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/> (Accessed Nov 08th2017).
- WHO, 2016. World Malaria Report 2016. World Health Organization, Geneva (2016).
- WHO, 2017a. World Malaria Report 2017. The global figures. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/malaria-report-response/en>
- WHO, 2017b. World Health Organization. Malaria vaccine development: status of vaccine development. In World malaria report 2017. <http://www.who.int/malaria/areas/vaccine/en> (Accessed Dec 19th, 2017).
- WHO, 2017c. Withdrawal of oral artemisinin-based monotherapies. http://www.who.int/malaria/areas/treatment/withdrawal_of_oral_artemisinin_based_monotherapies/en/ (accessed November 6th 2017).
- Yadav M., Rhee K.Y., Park S.J., 2014. *Carbohydr. Polym.*, 110, 18-25.
- Yan L.F., Chen J., Bangal P.R., 2007. *Macromol Biosci.*, 7, 1139-1148.
- Yeung S., Socheat D., Moorthy V.S., Mills A.J., 2009. *Lancet*, 374, 1418-1419.
- Zhang B., Tao H., Wei B., Jin Z., Xu X., Tian Y., 2014. *PLoS One*, 9, e114634.
- Zocoler M.A, De Oliveira A.J.B, Sarragiotto M.H, Grzesiuk V.L, Vidotti G.J, 2005. *J. Braz. Chem. Soc.*, 16, 1372-1377.
- Zwang J., Olliaro P., Barennes H., Bonnet M., Brasseur P., Bukirwa H., Cohuet et al., 2009. *Malar J.*, 8, 203-221.

CHAPITRE IX

ARTICLE 3: PRÉCOMPRESSION DE POUDRES SÈCHES D'AGENTS BIOACTIFS DE VÉGÉTAUX POUR OPTIMISER LA DENSITÉ ET LA COMPACTITÉ: LE CAS DE LA *PESCHIERA FUCHSIAEFOLIA*

Article publié dans la revue scientifique *Powder Technology*. Sa référence complète est sous la forme :

Konan, K.V., Le, T.C. & Mateescu, M.A. Precompression of dry vegetal bioactive agents to optimize density and compactness: Case of *Peschiera fuchsiaefolia* powdered materials. *Powder Technol.*, 2019, 347, 85-92

Contributions des (co) auteurs

Kouadio Victorien Konan : Expérimentation, analyse des résultats, montage des figures, recherche bibliographique, rédaction et correction du manuscrit.

Tien Canh Le : Supervision des travaux, analyse des résultats et révision du manuscrit

Mircea Alexandru Mateescu : Supervision du projet et révision du manuscrit

9.1 Résumé

Les produits naturels provenant des végétaux sont souvent utilisés pour le traitement de plusieurs pathologies, sans une purification préalable des principaux agents bioactifs. Les extraits sont directement utilisés sous forme de poudres pour diverses formulations pharmaceutiques ou nutraceutiques en présence ou en absence d'autres agents bioactifs. Ces extraits naturels, particulièrement les extraits de plantes, ont une disparité de taille. Ce qui était le cas de l'extrait de la *Peschiera fuchsiae* (Pf). Cet extrait de plante, développé pour le traitement du paludisme, a été complexé avec du carboxyméthylcellulose (CMC), formant le complexe CMC-Pf. Cette poudre était peu dense et légère, entraînant un état volumineux. Ceci est un problème majeur rendant difficile la production des comprimés à l'échelle micropilote ou industrielle avec les moules dans les appareils à multicompression et automatiques. Une procédure de précompression de la poudre du complexe CMC-Pf avant toute utilisation, facilitant les manipulations pour les procédures suivantes, spécialement pour la formulation et la compression en vue de l'obtention des comprimés a été proposée. Cette approche consiste à exercer une force limitée sur la poudre (25 Kg/g d'échantillon), permettant d'enlever l'air emprisonné dans les granules en brisant la morphologie sphéroïdale de Pf. Ainsi, la réduction du volume des poudres pourrait favoriser le remplissage du moule de la presse automatique pour la formulation des comprimés. Cet ajustement a fourni une bonne compacité et distribution uniforme des particules de la poudre. Cette méthode semble appropriée, considérant qu'en dehors de la morphologie, aucun changement significatif de la structure des groupements fonctionnels, de la solubilité, de l'activité antioxydante et de la stabilité de CMC-Pf n'était observé. Également, aucune différence significative pour la cinétique de libération des agents actifs à partir des comprimés formulés avec le CMC-Pf précompressé (pCMC-Pf) par rapport au complexe non précompressé (CMC-Pf) n'était détectée. Cette méthode de précompression est peu onéreuse, simple, rapide, facile à opérer et avantageuse, particulièrement, considérant qu'aucun ingrédient additionnel n'était ajouté dans la formulation.

Mots clés: Compacité de *Peschiera fuchsiae*; Densification d'extrait d'alcaloïdes; Réduction du volume de poudre duveteuse; Cinétique de libération de médicament; Précompression de poudre d'agents bioactifs; Processus de fabrication de comprimés

Powder Technology, 2019, vol. 347, 85-92

Precompression of dry vegetal bioactive agents to optimize density and compactness:
case of *Peschiera fuchsiaefolia* powdered materials

Kouadio Victorien Konan, Tien Canh Le and Mircea Alexandru Mateescu*

Department of Chemistry, Research Chair on enteric dysfunctions "Allerdys",
Pharmaqam and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888,
Branch A, Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada

*Corresponding author

Phone: +1 (514) 987 4319

Facs: +1 (514) 987 4054

email: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

9.2 Abstract

Natural products of vegetable origin, some of them manufactured as extracts, are largely used for treatment of several pathologies. This report describes an extract of *Peschiera fuchsiaefolia* (Pf) developed for treatment of malaria. This Pf extract contains low soluble indolic alkaloids. To improve its solubility, the Pf extract was complexed by spray-drying coprocessing with carboxymethylcellulose (CMC), obtaining the CMC-Pf complex. The ionic complexation of Pf cationic alkaloids with the highly soluble anionic CMC improved the Pf solubility favoring its bioavailability and absorption. The spray-dried powder was light, fluffy and voluminous. These features may constitute a major difficulty during the compression of tablets at micro-pilot or at industrial scale with punches for multi-compression. The aim of this report was to investigate the precompression conditions of such low-density powdered materials (i.e. CMC-Pf complex), prior to further processing, for final tablet compression. A moderate force exerted on the powder (25 Kg/g of sample) provoked the removal of air trapped in Pf granules by breaking down spheroidal morphology. Also, the powder volume was reduced favoring the fill-up the powder mixture in the die of the automatic press for further tablet compression. This adjustment provided a good compactness and uniform distribution of powders. The method seems appropriate for various bioactive agents. Except the morphology, no significant changes of structural characteristics (functional group, solubility, stability), neither of the biological activity of CMC-Pf, were found. Furthermore, no significant differences in terms of release kinetic profiles from tablets formulated with uncompressed or with precompressed CMC-Pf, were detected. This precompression method is not expensive, and is simple, fast and easy to apply. It is worth to mention that no extra ingredients were added in the formulation.

Keywords: *Peschiera fuchsiaefolia* compactness; Alkaloid extract densification; Fluffy powder volume reduction; Drug release kinetics; Powder precompression; Tablet manufacturing process.

9.4 Introduction

Plant extracts are currently exploited as powder forms of bioactive agents to formulate tablet dosage forms (Byeon *et al.*, 2018; Daddy *et al.*, 2017; Jain *et al.*, 2018; Santana *et al.*, 2018). These dry extracts are often processed using multi-compression press for continuous manufacture of tablets (Barimani et Kleinebudde, 2018; Vargas *et al.*, 2018). However, a large majority of plant dry extract doesn't possess initially the required characteristics. In general, dry plant extracts are complex, light, fluffy, non-homogeneous and have low density and poor physico-mechanical properties (Tong *et al.*, 2008). The natural products provide remarkable and varied quantity of bioactive substances (Mushtaq *et al.*, 2018; Proestos *et al.*, 2018). These extracts present important biological properties (Chu *et al.*, 2019; Kaur *et al.*, 2018). However, they are unstable with poor pharmacokinetic properties. Therefore, spray-drying may be used to produce a concentrated extract with improved stability (Ostroschi *et al.*, 2018). It is increasingly used (Fernandes *et al.*, 2018) instead to extraction of bioactive agents (Cui *et al.*, 2018; Papillo *et al.*, 2018), avoiding large solvent intervention and separation of component with additive, synergic or complementary action.

This is the case of *Peschiera fuchsiaefolia* (Pf) extract, obtained from bark of the *Peschiera* plant (Braga *et al.*, 1984; Meschini *et al.*, 2005). As previously described (Konan *et al.*, 2019), for better solubility, stability and improved pharmacokinetic properties, the Pf extract was complexed with carboxymethylcellulose (CMC) by spray-dry processing to form the CMC-Pf complex powder. The CMC is a water-soluble derivative of cellulose, obtained by substitution of hydroxyl groups (in position 2, 3 or 6) with carboxymethyl groups (Heinze *et al.*, 2018; Panchan *et al.*, 2018). CMC is biologically and environmentally compatible, biodegradable, non-toxic and low-cost (Aguilera *et al.*, 2019; Karimi et Naimi-Jamal, 2018). Also, it is widely employed as a natural component in several technological applications including cosmetics (Tan, Z.

et al., 2018), food (Duhoranimana *et al.*, 2018) and pharmaceutical formulations (Arca *et al.*, 2018; Nejabat *et al.*, 2018), especially due to its polyanionic character. CMC is largely used as excipient in drug delivery system (Jiao *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018), and as complexing agent via its anionic carboxylate ($-\text{COO}^-$) groups (Chen *et al.*, 2015; Kayitmazer, 2017) with cationic compounds. Thus, CMC was able to complex amine group to form polyelectrolyte systems (Luciani-Giacobbe *et al.*, 2017). It was now of interest to investigate the complexation of anionic CMC with positively charged Pf extract. Such ionic complexation of carboxymethylstarch with Pf was recently proposed to improve the solubility of Pf indolic alkaloids (Konan *et al.*, 2019). Indeed, Pf extract, mainly composed of bisindole alkaloids, particularly voacamine and other indole alkaloids such as voacamidine, affinisine, tabernamine (Federici *et al.*, 2000), exhibits positively charged amine groups which may interact with carboxylate groups of CMC (Duhoranimana *et al.*, 2018; Luciani-Giacobbe *et al.*, 2017) to form the CMC-Pf complex. This spray-dried Pf extract is now investigated as co-formulated in Artemisinin-based Combination Therapy (ACTs) recommended by WHO for an efficient treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. The manufacturing of tablets at micro-pilot scale with punches for multi-compression may be a major issue because of the CMC-Pf light and fluffy character of powder that may cause high wall friction properties, remoteness of the particles from each other and occupation of high volume of container (Fig. 9.1), resulting in a low density (g/mL) and reduced flowability of CMC-Pf complex. These properties are important in handling and processing operations (Ortega-Rivas, 2003; Silva, 2000) and for a continuous manufacturing tablets (Allison *et al.*, 2015; Barimani et Kleinebudde, 2018; Vargas *et al.*, 2018). Generally, formulation ingredients (active principles, excipients) for dry direct compression into solid dosage forms, must produce good tablet surfaces and strength, even in case of automatic tableting equipment. These materials must be flowable, compressible and contained into the dies even at high speed tableting machines. Since the dosage of active material is related to the weight of the tablet, mass variations

caused by improper flow must be avoided. The CMC-Pf powders may cause several drawbacks for the production due to: i) low density and poor flowability; ii) hard to fill completely the mixing powders in the die (Fig. 9.1); and iii) difficulties for automatic press compaction to obtain tablets.

A pre-treatment (*i.e* granulation) may be necessary prior to the direct compression for tableting procedures (Kleinebudde, 2004; Walker *et al.*, 2006). Granulation processes are common techniques (Kallakunta *et al.*, 2019; Khorasani *et al.*, 2016; Osorio-Fierros *et al.*, 2017). Because spray-dried powders of plant extract are sensible to moisture, the dry granulation is an adequate process used instead to the wet granulation which requests additional binders (Khorasani *et al.*, 2016; Thapa *et al.*, 2017), making this process improper for CMC-Pf complex. Consequently, it was hypothesized that precompression of spray-dried CMC-Pf complex would maintain the structural integrity of Pf alkaloids, even under the form of ionic complex.

A precompression approach was considered as appropriate for CMC-Pf spheroidal dry complex. This process was hypothesized to ameliorate flowability and to improve the compaction. Historically, precompression was used as the first compaction step (before main-compaction) in the tableting continuous process (Abdel-Hamid et Betz, 2011; Al-Karawi *et al.*, 2018). In the present study, the precompression of powder, prior to further operation, was proposed with the aim to eliminate intraparticulate air, bring closer the particles, reduce the occupied volume and thus to increase the powder density and flowability. This study was aimed to investigate conditions to improve the density of the CMC-Pf powder, but with no influence on the complexation bond, stability, biological and pharmacokinetic properties. More precisely, to improve processing, it was important to determine the routine compression force (suitably adjusted) to densify the complex powders (*i.e* CMC-Pf complex powder). After precompression of the CMC-Pf at various forces as self-standing operation (not as step of continuous

tableting), the volume, density, solubility, antioxidant activity and dissolution profiles from monolithic tablets were evaluated. Data from precompressed pCMC-Pf complex were compared to those of uncompressed CMC-Pf samples.

9.5 Materials and methods

Peschiera fuchsiaeifolia (Pf) extract was purchased from Yerbalatina Phytoactives (Colombo, PR, Brazil) and Artemisinin from Changsha Inner Natural Inc. (Changsha, Hunan, China). Sodium carboxymethylcellulose high viscosity (CMC) was provided by Galenova (St-Hyacinthe, QC, Canada). The ABTS [2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] diammonium salt (purity 98 %), and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid) 97 % were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) was purchased from Dow Chemical Company (Midland, MI, USA).

All other reagents used were of analytical grade and used without further purification.

9.5.1 Preparation of CMC-Pf complex

The CMC-Pf complex powders were obtained by spray-drying processing. The CMC (with a substitution degree about 80 %) was dispersed at 1 % in water. After homogenization, a volume of 400 mL of CMC suspension was slowly added in 480 mL of Pf 20 % dissolved in ethanol 60 %. This suspension was maintained under agitation at room temperature for solubilization and then spray-dried (Büchi Mini Spray Dryer B-290, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) to obtain CMC-Pf complex powder. During the spray-drying process, the Pf/CMC suspension was continuously gentle stirred avoiding sedimentation. The spray-dry parameters were:

inlet temperature 150 °C, outlet temperature 100 °C, spray flow 500 L/h and aspirator setting at 38 m³/h.

9.5.2 Precompression of CMC-Pf powder

Precompression consisted to exert various forces on the powdered samples. For instance, an amount of CMC-Pf sample powder (20 g) was put in a resistant cotton bag (70 mm diameter and 40 cm length), closed and submitted to an initial precompression at 0.5-2.0 tons. Precompressed CMC-Pf powder form were retained, and the volumes and masses of powders were determined for each applied force. According to the reduction of the powder volume, the sample of interest, hereto called precompressed (pCMC-Pf) complex, was selected for further use.

9.5.3 Determination of tapped volume: Tap density assay

Initial and tapped volume (mL) of CMC-Pf and of pCMC-Pf powders were measured before and after tap density (TD) assay, through a transparent 50 mL graduated cylinder. The tap density assay was realized by cylinder method (Beg *et al.*, 2016; Chokshi *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 1988), using the Vankel tap density apparatus (Varian, Inc. Cary, NC, USA). Tap density assay were carried out with a fixed mass (3 g) of CMC-Pf or pCMC-Pf during 30 to 210 seconds until obtaining a constant volume. The tap density (g/mL) was calculated as follows:

$$TD = m / V_T$$

Where m is the mass of powder and V_T is the tapped volume.

9.5.4 Characterization of CMC-Pf and pCMC-Pf complexes

9.5.4.1 Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

The FTIR spectra of CMC-Pf complex were acquired before and after pre-compaction (as pCMC-Pf). The spectra of CMC-Pf and of pCMC-Pf complexes were obtained on a Thermo Scientific Nicolet 6700/Smart iTR (Madison, WI, USA) FTIR spectrometer equipped with a deuterated triglycine sulfate-KBr (DTGS-KBr) detector and a diamond smart attenuated total reflection platform. The crystal was cleaned with ethanol and a background spectrum was acquired, before all assays. All analyses were carried out at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) using as parameters: number of scans, 32; resolution, 4 cm^{-1} .

9.5.4.2 X-Ray Diffraction (X-RD)

The diffraction patterns of CMC-Pf and pCMC-Pf complexes were recorded using a Siemens D-5000 diffractometer (Munich, Germany) with a SOL-X detector and a Cobalt cathode in reflectance mode at a wavelength of $1.789\text{ \AA}$. The diffractograms were registered over an angular range of 2θ from 0° to 30° at a scan rate of 2° per min and treated using the Diffracplus software.

9.5.4.3 Scanning electron microscopy (SEM)

Micrographs of the microstructures of CMC-Pf and pCMC-Pf complexes were taken with a JSM-6010LV InTouchScope™ (SEM) (JEOL, Tokyo, Japan) using a secondary electron image detector. A small amount of powder was placed on a metal stub with an adhesive and covered with a fine layer of gold in a sputter coater BIO-RAD E5200 (Bio-Rad Laboratories Ltd., London, UK) under vacuum. The micrographs were obtained by accelerating voltages of 1.5 kV and high vacuum.

9.5.4.4 Thermogravimetry analysis (TGA)

Thermogravimetric analyses were performed with a TA Instruments TGA (Q500)/Discovery MS. Samples of CMC-Pf and pCMC-Pf (1-10 mg), placed in Pt pans, were heated from 30 to 1000 °C at a temperature variation rate of 10 °C/min, under a constant nitrogen flow (100 mL/min). Then, thermogravimetric curves were obtained and the weight loss (%), the onset and the end of sample deterioration were determined.

9.5.5 Solubility assay

Solubility of CMC-Pf and pCMC-Pf were evaluated according to Konan *et al* (Konan *et al.*, 2019) approach, in different media: nanopure water, Simulated Gastric Fluid (SGF, pH 1.5) or Simulated Intestinal Fluid (SIF, pH 6.8). The SGF (1 L) was obtained (following US-Pharmacopeia) by adding 2 g NaCl and 7 mL HCl 37% in 500 mL distilled water and then completing with distilled water up to 1 L (final pH 1.5). The SIF (1 L) was obtained by solubilizing 6.8 g monobasic potassium phosphate in 190 mL NaOH (0.2 M) and then completing with distilled water up to 1 L (final pH 6.8) (U.S Pharmacopoeia, 2017a).

The solubility determination (Konan *et al.*, 2019) was based on a distinctive property of the tested sample (*i.e* absorbency at 280 nm) to evaluate solubility (mg/mL); it corresponds to the maximal concentration (mg/mL) of sample in a solvent after saturation. Excess of CMC-Pf or of pCMC-Pf complexes (2 g) was added carefully in 10 mL of the solvent. The obtained saturated solution was shaken at 37 °C for 5 h and the mixture was centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min. The supernatant was filtered with 0.45 µm millipore filter. Then, the effective concentration (mg/mL) of Pf in an aliquot (1 mL) was evaluated by UV-spectrophotometry at 280 nm which is the maximum absorption wavelength of Pf (Konan *et al.*, 2019) using the Pf absorbance standard curve at 280 nm, as a function of sample concentration (mg/mL).

9.5.6 Antioxidant properties

The antioxidant activity of CMC-Pf were evaluated by the improved TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) rapid assay as described by Konan *et al* (Konan *et al.*, 2016), before and after precompression. To generate the ABTS^{•+} radical probe, a volume of 6.5 mL of 140 μ M ABTS (in 0.85 % NaCl) was electrolyzed (400 Volts, 10 mA) for 20 seconds. The two electrodes were in platinum, with 2.12 mm diameter, 25.33 mm length and inter-electrode space of 25 mm. For determination of antioxidant capacity, the ABTS^{•+} solution (950 μ L) was mixed with 50 μ L of 0-200 mM Trolox (positive control and standard) or 50 μ L of the tested samples (CMC-Pf or pCMC-Pf in each assay medium) and the absorbance at 734 nm was measured at 1 min after the initial mixture with the electrolysis-induced ABTS^{•+}. The decrease of absorbency due to the antioxidant capacity reflects the scavenging of the free radical (ABTS^{•+}). The ability of CMC-Pf or precompressed pCMC-Pf to scavenge the ABTS^{•+} radical cations was compared to that of Trolox (structural hydrosoluble analogue of vitamin E) used as reference antioxidant. The Trolox equivalence corresponds to the Trolox concentration having the same scavenging activity as the tested sample at a given concentration. The samples were dissolved in the medium (nanopure water, SGF or SIF) and filtered (0.45 μ m millipore filter) before testing. The results are expressed in mM of Trolox equivalence per mass (mg) of sample.

Each measurement consisted of at least five readings and the values represented the mean $\pm$ standard deviation.

9.5.7 Formulation of monolithic dosage forms and dissolution assay

An antimalarial Artemisinin-based Combination Therapy (ACT) tablet as previously formulated with Artemisinin (Arte) and using CMC-Pf complex (K.V. Konan, T.C. Le and M.A. Mateescu, manuscript in preparation 2019) was also obtained with pCMC-

Pf. These monolithic tablet dosage forms contained 100 mg of Arte and 400 mg of CMC-Pf or pCMC-Pf as active ingredients and 50 mg of croscarmellose cellulose (XC), 100 mg of HPMC, 200 mg of CMC, 15 mg of magnesium stearate as excipients. Each formulation was directly compacted in the flat-faced punches to obtain monolithic tablets.

Dissolution assays were followed for each tablet first in simulated gastric fluid (pH 1.5) for 2 h and then continued in simulated intestinal fluid (pH 6.8) as referred by USP method 40 (U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35), 2017). Release kinetics from both formulation types (containing CMC-Pf or pCMC-Pf) were followed using a Distek dissolution system 2100A (Betatek Inc., Markham, ON, Canada) with a Distek TCS 0200 (North Brunswick, NJ, USA) at 100 rpm and 37 °C. At predetermined intervals (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h), released Pf and Arte from tablets were quantified by UV-spectrophotometry at 280 nm (for Pf) and at 734 nm (for Arte, using ABTS^{•+} radical as probe reagent). Practically, for Pf dosage, an established volume (5 mL) was withdrawn from dissolution medium, properly filtered (0.45 µm) and the absorbance was measured at 280 nm.

For Arte release profile, one monolithic tablet containing CMC-Pf and Arte as active ingredients was used for each dissolution time. The content of dissolution cells was filtered at each dissolution time and the Arte retained on the filter (together with other insoluble excipients) was washed to eliminate Pf residue (eliminating thus eventual interferences of Pf antioxidant properties) and dried. Then Arte was quantified for the release profile, based on the spectrophotometric method using ABTS reagent (Konan *et al.*, 2016). An amount of 3 mg of dry Arte containing sample was solubilized in 2 mL of 140 µM native (non-oxidized) ABTS solution. A volume of 5 mL of 1% sulfuric acid was added to the sample solution in order to favor the breakdown of the endoperoxide bond of Arte (Sreevidya et Narayana, 2009; Wells *et al.*, 2015).

Consequently, the liberated hydrogen peroxide (H_2O_2) will oxidize the ABTS reagent (initially colorless) to form the radical cation $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (green-blue color) with an absorbance value proportional to the quantity of Arte present in the sample. Coloration intensity of the $\text{ABTS}^{+\bullet}$ cation solution was measured at 734 nm (Pająk *et al.*, 2019; Sokamte *et al.*, 2019).

9.5.8 Mechanic properties of the tablets

9.5.8.1 Friability test

Friability of tablets was determined according to USP/1216 (U.S Pharmacopoeia, 2017b) using a tablet friability tester (Varian, Inc., Cary, NC, USA). Ten (10) tablets weighed together, were placed in the friabilator drum and subjected to 100 revolutions at 25 rpm. Then, tablets were cleaned (dust-free), reweighed and their relative weight loss percentage (% Friability) was calculated as:

$$\% F = (1 - W / W_0) \times 100$$

Where F is friability, W_0 is the weight of tablets before and W is the weight of tablets after the test.

9.5.8.2 Hardness assay

The hardness test was realized according to USP/1217 (U.S Pharmacopoeia, 2017b). The Tensile strength (T) of tablets was:

$$T = 2 F / \pi \times d \times t$$

F, d and t denotes crushing strength, diameter, and thickness of tablet, respectively.

The crushing strength F (the force required to break a tablet in a diametric compression) was measured using a VK 200 tablet hardness tester (Varian, Inc., Cary, NC, USA).

Diameter and thickness were assessed using an Electronic Digital Caliper (Docap Corp., St-Laurent, Quebec, Canada) for the range 0-200 mm with readings at a precision of tens of microns. F was expressed in kilopond Kp, equivalent to Kg force or 9.81 Newton (N).

Tablets were oval, so the crushing strength was applied to the tablets by taking the length (l) and width (w) of tablet as diameter. In each case, with both diameters as length (d_l) and width (d_w), five tablets were used. The force required to break the tablet by a diametric compression was recorded.

9.5.9 Antioxidant properties

All experiments were realized at least in triplicate and statistical significance was calculated by one-way ANOVA. Data were presented as mean $\pm$ standard deviation.

9.6 Results and discussion

In order to reduce the density and volume occupied by *Peschiera fuchsiaefolia* (under complexed CMC-Pf form) for antimalaria ACT tablet formulation, the fluffy powder was submitted to a precompression process.

Fig. 9.2 presents the volumes (2A) and tap densities (2B) of initial (CMC-Pf) and precompressed (pCMC-Pf) powders. The volume of CMC-Pf powder was markedly reduced with about 60 % and a corresponding increase of tap density of CMC-Pf powder was noticed when it was precompressed at 25, 50 or 100 Kg/g (Fig. 9.2A). No additional improvement was found at compression forces higher than 25 Kg/g. Fig. 9.3 shows volumes of CMC-Pf and of pCMC-Pf precompressed at different forces, at various tapping times. A reduction of volumes was found for both CMC-Pf and pCMC-Pf even at short tapping time (30 sec) with no further decrease of volume at longer tapping times up to 210 sec.

Tap density (TD) assay permitted to measure volume (Fig. 9.3) without intergranular and intraparticulate air. After tapping, the ratio of precompressed pCMC-Pf volume to CMC-Pf was approximately one third. Precompression would reduce air in the CMC-Pf powder. Practically, there is more inter and intraparticulate air in CMC-Pf than in pCMC-Pf. Constant tapped volumes were obtained after 30 sec of tapping for different pCMC-Pf as for native CMC-Pf (uncompressed). The TD values (Fig. 9.2B) were calculated with a constant tapped volume showing that pCMC-Pf were three times denser than untreated CMC-Pf.

It appeared that precompression even at moderated-low force of 25 Kg/g markedly reduced the massic volume of CMC-Pf powder and this process was continued for further formulations.

The FTIR spectra (Fig. 9.4), X-RD diffractograms (Fig. 9.5) and the TGA diagrams (Fig. 9.6) showed no differences between precompressed pCMC-Pf and uncompressed CMC-Pf complexes. Thus, it possible to conclude that precompression did not affect the chemical structure and the crystallinity of the CMC-Pf extract.

Characteristic FTIR peaks of CMC-Pf complex were preserved after the precompression (Fig. 9.4). Peaks at 1725 cm^{-1} and 1525 cm^{-1} attributed to carboxylic ($-\text{COOH}$) groups (Capanema *et al.*, 2018; Gautam *et al.*, 2018; Oun et Rhim, 2017) from CMC, were found in both CMC-Pf and precompressed pCMC-Pf FTIR patterns, as well as the bands at 1720 cm^{-1} assigned to acid and $\text{C}=\text{O}$ ester bonds from Pf.

Furthermore, for both CMC-Pf and precompressed pCMC-Pf, asymmetric (1590 cm^{-1}) and symmetric (1415 cm^{-1}) stretching vibrations were found for carboxylate anions ($-\text{COO}^-$) (Trevisol *et al.*, 2019), irrespective of the precompression force.

Similarly, all FTIR patterns in region $1600\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ ascribed to aromatic C=C symmetric stretching, N-H and C-N vibration from Pf component of the CMC-Pf complex, were also found for pCMC-Pf. Also, bands in the region $2935\text{--}2863\text{ cm}^{-1}$, attributable to C-H stretching groups were found for each sample, as well as the broad band in the $3700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ region assigned to O-H vibration of CMC (Dankar *et al.*, 2018).

Regarding X-RD patterns (Fig. 9.5), a similar crystallinity was showed through with 2 main bands ($2\text{-}\theta$ angles at 14° and 22°), corresponding to the organization of CMC for uncompressed CMC-Pf and precompressed pCMC-Pf (Fig. 9.5).

TGA analysis (Fig. 9.6) showed almost no differences between thermal stability (mass loss, onset and endset) of precompressed pCMC-Pf and uncompressed CMC-Pf. Under heating, two steps of mass loss were observed ($50\text{--}110^\circ\text{C}$ and $200\text{--}350^\circ\text{C}$). The first step ($50\text{--}110^\circ\text{C}$) was associated to a minor mass loss, probably related to the desorption of intra and intermolecular water, as previously observed for other materials (Iqbal *et al.*, 2011). The second step ($200\text{--}350^\circ\text{C}$), with major mass loss, was related to the decomposition or degradation of samples (Cuinica et Macêdo, 2018; Zhang, Jiafu *et al.*, 2014) with the release of volatile products such as CO_2 and CO (Iqbal *et al.*, 2011).

Since all the patterns are similar in terms of FTIR spectra, diffractograms and TGA patterns appearing that precompression of CMC-Pf complex at $25\text{--}100\text{ Kg/g}$ did not change their chemical structure, neither their crystallinity. The precompression at higher forces ($25\text{--}100\text{ Kg/g}$) did not show major effects on the structure of CMC-Pf. This observation was in agreement with the results of Adolfsson *et al* (Adolfsson *et al.*, 1997), showing that the compaction does not affect the structure of the pharmaceutical ingredients. In fact, this range of forces is largely lower than those causing structural transitions. However, they were good enough to considerably reduce the volume. Even

at much higher forces, as those requested for tableting processes (Skelbæk-Pedersen *et al.*, 2018), no modification of chemical structures of ingredients were found (Malipeddi *et al.*, 2017; Tan, S. *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2018). In general, molecular materials subjected to high pressure (order of hundreds of gigapascal, GPa), undergo structural changes (Zhang, Jianyi *et al.*, 2018) generating drastic effects on physical and chemical properties and crystallinity, with the formation of new classes of materials (Hemley, 2000). This is not the case of precompression, such as supported by the absence of differences in the FTIR and X-RD patterns of pCMC-Pf.

Compression at moderate-low forces of spray-dried plant extracts was found to favor granulation and to improve density and flowability (Soares *et al.*, 2005). The principal effect of pressure is a reduction in volume and a particle rearrangement (Patel *et al.*, 2006) which lead to a better compaction and to an increase in density, still maintaining structural characteristics of the complex, as seen in this study. This is a major advantage for further processing because Pf is more soluble under its complexed form as CMC-Pf.

Since no additional improvement was found with precompression forces higher than 25 Kg/g of sample, this value was selected as precompression force and used for further processing.

Images from the SEM (Fig. 9.7) showed that the spheroidal morphology of CMC-Pf was broken by the precompression. In fact, the complexation of Pf with CMC by spray dry processing generated CMC-Pf powder with lots of spheroidal granules with intraparticulate air, resulting in a fluffy and dispersive powder. The precompression would produce the break of spheroidal shape expelling the intragranular air (Fig. 9.7), favoring the stacking and pushing together the resulted non-spherical particles with densification. The precompression from 25 Kg/g to 100 Kg/g of CMC-Pf did not affect

the solubility of CMC-Pf (Fig. 9.8A), nor the antioxidant capacity (Fig. 9.8B). The enhanced solubility due to complexation of Pf with CMC as CMC-Pf complex in different media (water, SGF and SIF) was maintained after precompression of the samples (Fig. 9.8A). It is of interest to note a higher solubility of CMC-Pf in gastric acidity, when a lower solubility was expected, due to protonation and compaction of carboxylic groups in SGF (Assaad et Mateescu, 2010). The actual higher solubility seems due to the complexation of part of carboxylic groups with amine groups of Pf, preventing CMC protonation and compaction. No marked changes in antioxidant properties of CMC-Pf were induced by the precompression (Fig. 9.8B). The precompressed pCMC-Pf exerted its scavenging capacity at the same level as the uncompressed CMC-Pf, with the highest values in the SIF followed by values in the nanopure water, fitting well with data of Herraiz et *al* (Herraiz et Galisteo, 2004), showing the most efficient antioxidant activity of alkaloids at around physiological pH 6.8. Same complexation may explain lower antioxidant capacity of Pf as CMC-Pf in simulated gastric acidity where probably the Pf is protonated and strongly linked to the CMC. In the simulated intestinal fluid, the CMC is probably deprotonated and ionized, liberating, at least in part, the Pf, able to exert its antioxidant activity, which is not affected at all by precompression. This form of CMC-Pf was found to facilitate the formulation of oral tablet dosage forms allowing an extended release time. The release profiles of CMC-Pf and Arte in the ACT from monolithic tablet formulation (Fig. 9.9) are not affected by precompression. Also, properties of monolithic tablets in terms of mechanical characteristics were preserved after precompression of CMC-Pf (Fig. 9.10).

In the two formulations (Fig. 9.9), Arte was released about 51 % after 2 h in SGF and the complete release was achieved after 8 h. Differently, Pf as CMC-Pf and the pCMC-Pf was slowly released during 10-12h. Practically, no significant differences in terms of release patterns were observed for Arte formulated with precompressed pCMC-Pf in comparison with the uncompressed CMC-Pf. Furthermore, the size, shape and

weight of the tablets remained almost unchanged using uncompressed or precompressed CMC-Pf complexes. In terms of friability (Fig. 9.10A), the weight loss was in the frame of the tolerated limit 1 % (Podczek, 2012) for both series of tablets with CMC-Pf and pCMC-Pf. The tensile strengths were also maintained when using precompressed pCMC-Pf (Fig. 9.10B). Thereby, tablets would resist to crushing, capping, fracture, cracking, cleavage, breakage or abrasion before use. They would withstand to the stress of handling, packaging and transportation.

9.7 Conclusion

Precompression from 25 Kg/g of CMC-Pf powder favored a marked reduction of the powder volume. It permitted to preserve the chemical (functional groups, structure), biological (antioxidant activity) and pharmacokinetic (solubility, release kinetic profile) characteristics of tablets. Only the morphology of particles was affected. The precompression in the range 25-100 Kg/g was appropriate to eliminate the air trapped in the Pf granules and to improve the compactibility and flowability of CMC-Pf powder. This precompression is a simple, rapid and not expensive procedure that can be realized with no sophisticated equipment and particularly with no extra ingredients added in the formulation. It will facilitate the use of CMC-Pf complexes in antimalarial formulation and can be extended to different pharmaceutical formulations confronted with ingredients presenting intraparticular air.

9.8 Figures

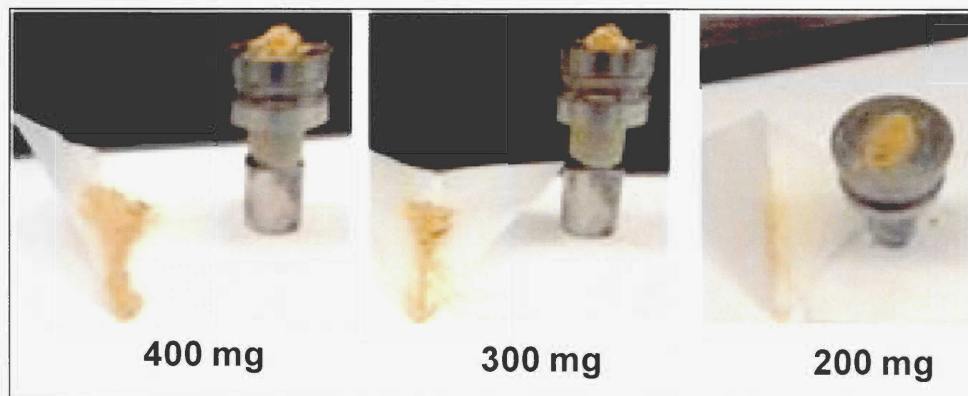


Fig. 9.1: Different quantities (200-400 mg) of CMC-Pf complex powder (without excipient) in the die.

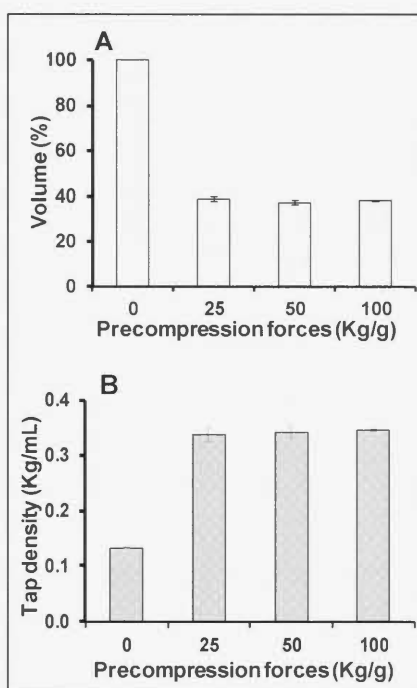


Fig. 9.2: The influence of the precompression forces on volume (A) and tap density (B) of precompressed CMC-Pf powders. The initial volume of uncompressed CMC-Pf powder was considered as 100%.

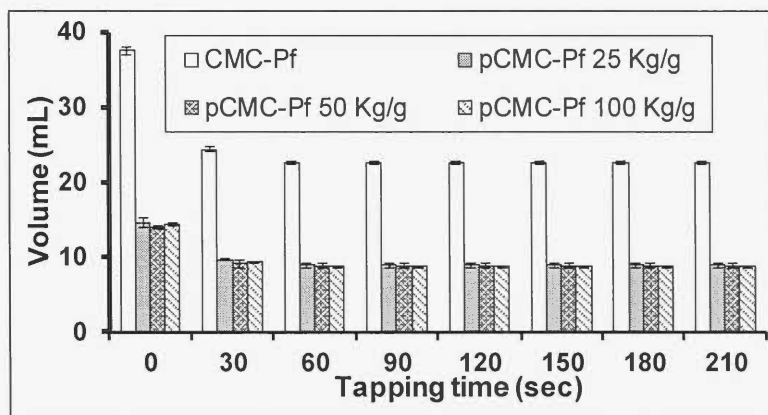


Fig. 9. 3: Influence of tapping time on volumes of pCMC-Pf precompressed at different forces (25, 50 and 100 Kg/g).

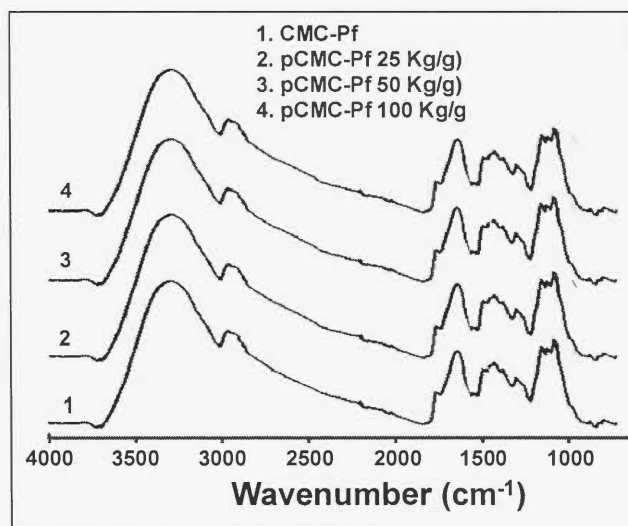


Fig. 9. 4: FTIR of CMC-Pf and pCMC-Pf at different precompression forces.

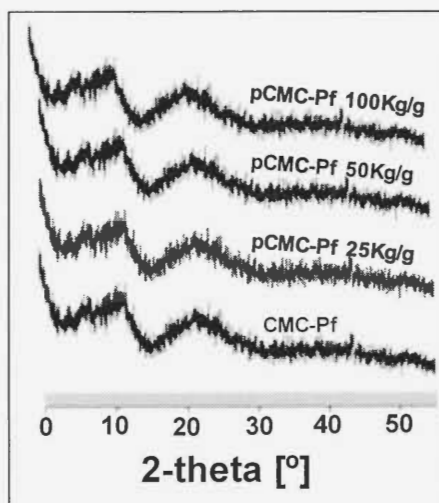


Fig. 9.5: X-RD diffractograms of CMC-Pf and of pCMC-Pf complexes precompressed at various forces.

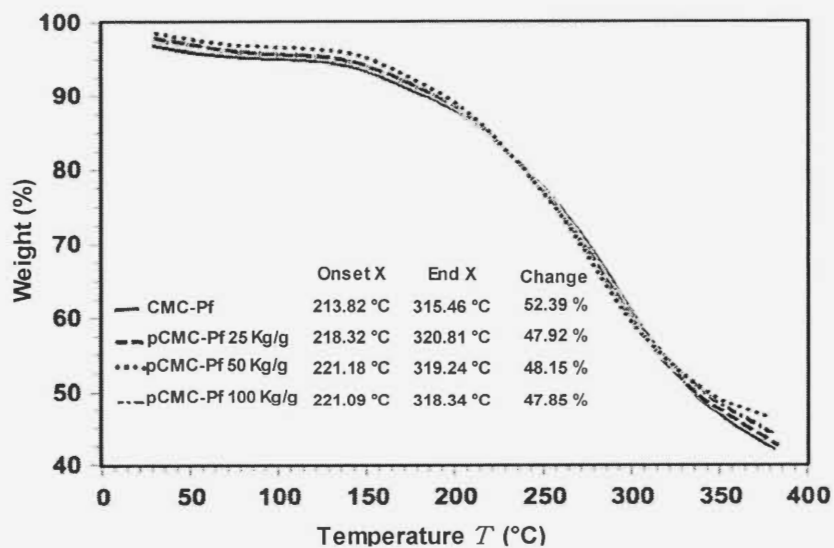


Fig. 9.6: TGA diagrams and TG parameters of CMC-Pf and of pCMC-Pf submitted at different precompression forces.

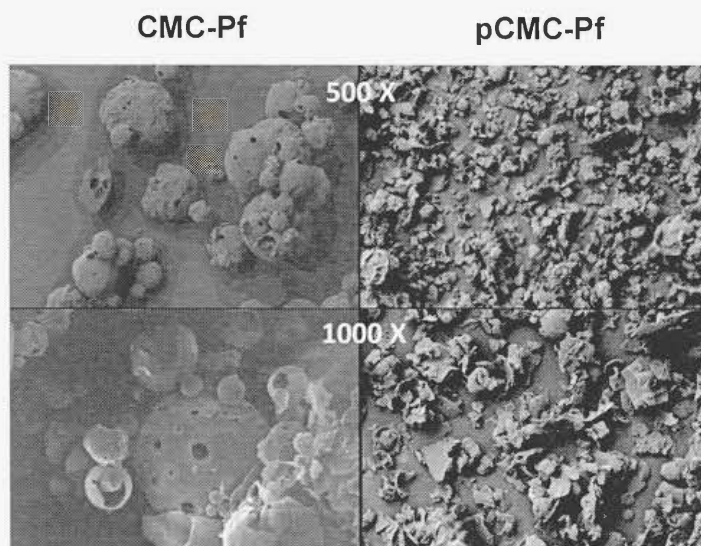


Fig. 9.7: SEM micrographs of CMC-Pf and of pCMC-Pf (CMC-Pf precompressed at 25 Kg/g).

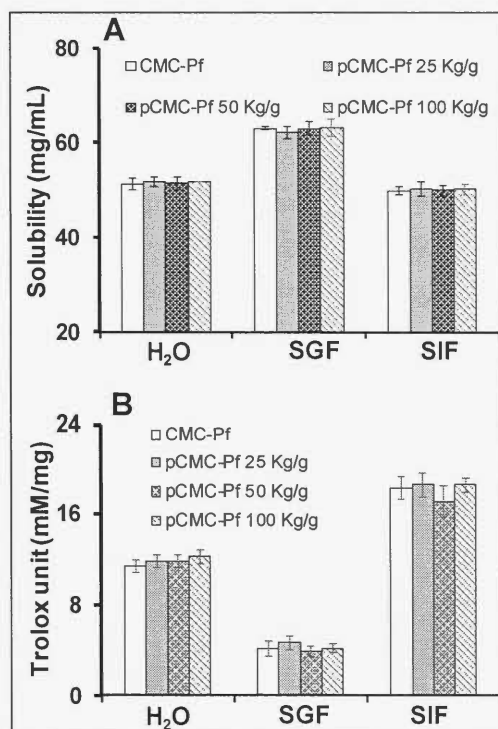


Fig. 9.8: Solubility (A) and antioxidant activity (B) of CMC-Pf and of pCMC-Pf precompressed at various forces in aqueous media, simulated gastric (SGF) and intestinal (SIF) fluids.

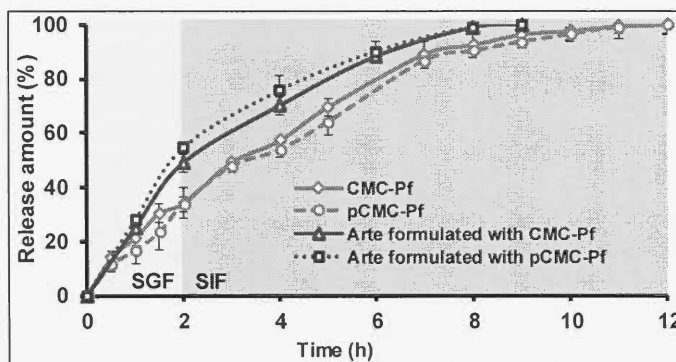


Fig. 9.9: Release profiles of CMC-Pf, pCMC-Pf and Arte from ACT monolithic tablet dosage forms as bitherapeutic agents.

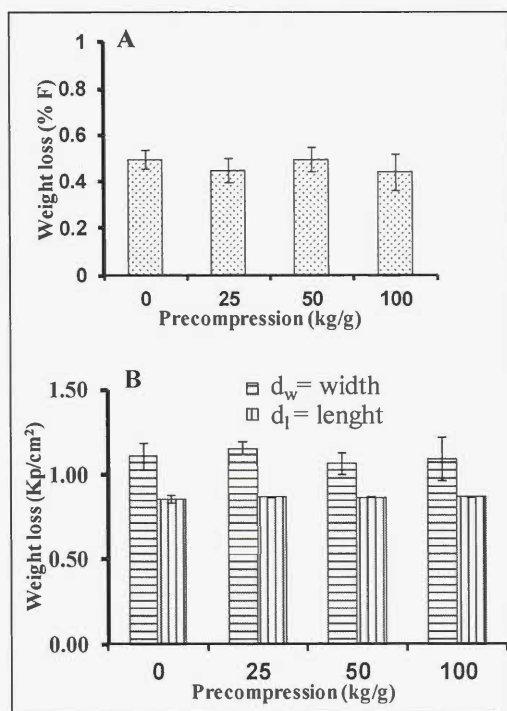


Fig. 9.10: Mechanical properties: A) Friability and B) Hardness determined taking the length (l) or the width (w) of the tablet as diameter (d_l and d_w). Different tablets were obtained using (as active ingredient) the pCMC-Pf precompressed at various forces (0, 25, 50 and 100 Kg/g).

Acknowledgements

Support from NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council) of Canada (RDC program) granted to Prof. M.A.M for this project is gratefully acknowledged.

9.9 References

- [1] A. Jain, S. Bhargav, S. Jain, Development of antidiabetic poly herbal sustained release formulation composed of traditional Indian plant extract with their protective effect on antioxidant enzyme, *Pancreatology*, 18 (2018) S38-S39.
- [2] C.P. Santana, F.D. Medeiros, L.P. Correia, P.H.G.D. Diniz, G. Vêras, A.C.D. Medeiros, Dissolution and uniformity of content of tablets developed with extract of *Ximenia americana* L, *PloS one*, 13 (2018) e0197323.
- [3] N.B. Daddy, L.M. Kalisya, P.G. Bagire, R.L. Watt, M.J. Towler, P.J. Weathers, *Artemisia annua* dried leaf tablets treated malaria resistant to ACT and iv artesunate, *Phytomedicine*, 32 (2017) 37-40.
- [4] J.C. Byeon, J.B. Ahn, W.S. Jang, S.-E. Lee, J.-S. Choi, J.-S. Park, Recent formulation approaches to oral delivery of herbal medicines, *J Pharm Investig*, 49 (2018) 17-26.
- [5] S. Barimani, P. Kleinebudde, Optimization of a semi-batch tablet coating process for a continuous manufacturing line by design of experiments, *Int J Pharm*, 539 (2018) 95-103.
- [6] J.M. Vargas, S. Nielsen, V. Cárdenas, A. Gonzalez, E.Y. Aymat, E. Almodovar, G. Classe, Y. Colón, E. Sanchez, R.J. Romañach, Process analytical technology in continuous manufacturing of a commercial pharmaceutical product, *Int J Pharm*, 538 (2018) 167-178.
- [7] H.H.Y. Tong, S.Y.S. Wong, M.W.L. Law, K.K.W. Chu, A.H.L. Chow, Anti-hygroscopic effect of dextrans in herbal formulations, *Int J Pharm*, 363 (2008) 99-105.
- [8] S. Mushtaq, B.H. Abbasi, B. Uzair, R. Abbasi, Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents, *EXCLI J.*, 17 (2018) 420-451.
- [9] C. Proestos, P. Zoumpoulakis, V.J. Sinanoglou, Isolation and Characterization of Phenolic Compounds From Selected Foods of Plant Origin Using Modern Spectroscopic Approaches, *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 57 (2018) 203-220.

- [10] Y. Chu, T. Xu, C. Gao, X. Liu, N. Zhang, X. Feng, X. Liu, X. Shen, X. Tang, Evaluations of physicochemical and biological properties of pullulan-based films incorporated with cinnamon essential oil and Tween 80, *Int J Biol Macromol*, 122 (2019) 388-394.
- [11] H. Kaur, H.M. Mukhtar, A. Singh, A. Mahajan. Antiplasmodial Medicinal Plants: A Literature Review on Efficacy, Selectivity and Phytochemistry of Crude Plant Extracts, *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 8 (2018) 272-294.
- [12] L.C. Ostroschi, V. Brito de Souza, M.A. Echalar-Barrientos, F.L. Tulini, T.A. Comunian, M. Thomazini, J.C.C. Baliero, G. Roudaut, M.I. Genovese, C.S. Favaro-Trindade, Production of spray-dried proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract as a potential functional ingredient: Improvement of stability, sensory aspects and technological properties, *Food Hydrocoll*, 79 (2018) 343-351.
- [13] M.R.V. Fernandes, L.M. Kabeya, C.R.F. Souza, A.P. Massarioli, S.M. Alencar, W.P. Oliveira, Antioxidant Activity of Spray-Dried Extracts of *Psidium guajava* Leaves, *J Food Res*, 7 (2018) 141-148.
- [14] Q. Cui, J.-Z. Liu, L.-T. Wang, Y.-F. Kang, Y. Meng, J. Jiao, Y.-J. Fu, Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves, *J Clean Prod*, 184 (2018) 826-835.
- [15] V.A. Papillo, M. Locatelli, F. Travaglia, M. Bordiga, C. Garino, M. Arlorio, J.D. Coisson, Spray-dried polyphenolic extract from Italian black rice (*Oryza sativa* L., var. Artemide) as new ingredient for bakery products, *Food Chem.*, 269 (2018) 603-609.
- [16] R.M. Braga, H.F. Leitão Filho, F.D.A.M. Reist, ¹³C NMR analysis of alkaloids from *Peschiera fuchsiaefolia*, *Phytochemistry*, 23 (1984) 175-178.
- [17] S. Meschini, M. Marra, M. Condello, A. Calcabrini, E. Federici, M.L. Dupuis, M. Cianfriglia, G. Arancia, Voacamine, an alkaloid extracted from *Peschiera fuchsiaefolia*, inhibits P-glycoprotein action in multidrug-resistant tumor cells, *Int J Oncol*, 27 (2005) 1597-1603.
- [18] K.V. Konan, T.C. Le, M.A. Mateescu, Enhanced solubility of alkaloids by complexation with polycarboxylic materials for controlled release formulations: case of *Peschiera fuchsiaefolia*, *AAPS PharmSciTech*, (2019). DOI: 10.1208/s12249-12019-11315-12241.

- [19] T. Heinze, O.A. El Seoud, A. Koschella, Etherification of Cellulose, in: T. Heinze, O.A. El Seoud, A. Koschella (Eds.) *Cellulose Derivatives: Synthesis, Structure, and Properties*, Springer International Publishing, 2018, pp. 429-477.
- [20] N. Panchan, C. Niamnuy, P. Dittanet, S. Devahastin, Optimization of synthesis condition for carboxymethyl cellulose-based hydrogel from rice straw by microwave-assisted method and its application in heavy metal ions removal, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 93 (2018) 413-425.
- [21] G. Aguilera, C.C. Berry, R.M. West, E. Gonzalez-Monterrubio, A. Angulo-Molina, Ó. Arias-Carrión, M.Á. Méndez-Rojas, Carboxymethyl cellulose coated magnetic nanoparticles transport across a human lung microvascular endothelial cell model of the blood–brain barrier, *Nanoscale Adv.*, 1 (2019) 671-685.
- [22] M. Karimi, M.R. Naimi-Jamal, Carboxymethyl cellulose as a green and biodegradable catalyst for the solvent-free synthesis of benzimidazoquinazolinone derivatives, *J. Saudi Chem. Soc.*, 23 (2018) 182-187.
- [23] Z. Tan, M.G. Lynch, M. Sestrick, N. Yaranossian, Stabilizer Composition of Microcrystalline Cellulose and Carboxymethylcellulose, Method for Making, and Uses, US Patent 9,826,763, 2017.
- [24] E. Duhoranimana, J. Yu, O. Mukeshimana, I. Habinshuti, E. Karangwa, X. Xu, B. Muhoza, S. Xia, X. Zhang, Thermodynamic characterization of Gelatin–Sodium carboxymethyl cellulose complex coacervation encapsulating Conjugated Linoleic Acid (CLA), *Food Hydrocoll.*, 80 (2018) 149-159.
- [25] H.C. Arca, L.I. Mosquera-Giraldo, V. Bi, D. Xu, L.S. Taylor, K.J. Edgar, Pharmaceutical Applications of Cellulose Ethers and Cellulose Ether Esters, *Biomacromolecules*, 19 (2018) 2351-2376.
- [26] M. Nejabat, M. Mohammadi, K. Abnous, S.M. Taghdisi, M. Ramezani, M. Alibolandi, Fabrication of acetylated carboxymethylcellulose coated hollow mesoporous silica hybrid nanoparticles for nucleolin targeted delivery to colon adenocarcinoma, *Carbohydr. Polym.*, 197 (2018) 157-166.
- [27] Z. Jiao, B. Zhang, C. Li, W. Kuang, J. Zhang, Y. Xiong, S. Tan, X. Cai, L. Huang, Carboxymethyl cellulose grafted graphene oxide for efficient antitumor drug delivery, *Nanotechnology Rev.*, (2018) 291-301.
- [28] V. Singh, S. Joshi, T. Malviya, Carboxymethyl cellulose-rosin gum hybrid nanoparticles: An efficient drug carrier, *Int J Biol Macromol.*, 112 (2018) 390-398.

- [29] N. Chen, Z. Tong, W. Yang, A.B. Brennan, Biocomposites with tunable properties from poly(lactic acid)-based copolymers and carboxymethyl cellulose via ionic assembly, *Carbohydr. Polym.*, 128 (2015) 122-129.
- [30] A.B. Kayitmazer, Thermodynamics of complex coacervation, *Adv Colloid Interfac*, 239 (2017) 169-177.
- [31] L.C. Luciani-Giacobbe, M.V. Ramírez-Rigo, Y. Garro-Linck, G.A. Monti, R.H. Manzo, M.E. Olivera, Very fast dissolving acid carboxymethylcellulose-rifampicin matrix: development and solid-state characterization, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 96 (2017) 398-410.
- [32] E. Federici, G. Palazzino, M. Nicoletti, C. Galeffi, Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaefolia*, *Planta Med.*, 66 (2000) 93-95.
- [33] E. Ortega-Rivas, Review and research trends in food powder processing, *Powder Handl Process.*, 15 (2003) 18-25.
- [34] S.R.d. Silva, Particle Characterisation-Characterisation of Particulate Materials. A Challenge for the Bulk Solids Fraternity, *Powder Handl Process.*, 12 (2000) 355-364.
- [35] G. Allison, Y.T. Cain, C. Cooney, T. Garcia, T.G. Bizjak, O. Holte, N. Jagota, B. Komar, E. Korakianiti, D. Kourti, Regulatory and quality considerations for continuous manufacturing, *J. Pharm. Sci.*, 104 (2015) 803-812.
- [36] G.M. Walker, G. Andrews, D. Jones, Effect of process parameters on the melt granulation of pharmaceutical powders, *Powder Technol.*, 165 (2006) 161-166.
- [37] P. Kleinebudde, Roll compaction/dry granulation: pharmaceutical applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 58 (2004) 317-326.
- [38] A. Osorio-Fierros, K. Cronin, D. Ring, A. Méndez-Zavala, L. Morales-Oyervides, J.C. Montañez, Influence of granulation process parameters on food tablet properties formulated using natural powders (*Opuntia ficus* and *Chlorella* spp.), *Powder Technol.*, 317 (2017) 281-286.
- [39] V.R. Kallakunta, H. Patil, R. Tiwari, X. Ye, S. Upadhye, R.S. Vladyka, S. Sarabu, D.W. Kim, S. Bandari, M.A. Repka, Exploratory studies in heat-assisted continuous twin-screw dry granulation: A novel alternative technique to conventional dry granulation, *Int J Pharm.*, 555 (2019) 380-393.
- [40] M. Khorasani, J.M. Amigo, P. Bertelsen, C.C. Sun, J. Rantanen, Process optimization of dry granulation based tableting line: extracting physical material characteristics from granules, ribbons and tablets using near-IR (NIR) spectroscopic measurement, *Powder Technol.*, 300 (2016) 120-125.

- [41] P. Thapa, A.R. Lee, D.H. Choi, S.H. Jeong, Effects of moisture content and compression pressure of various deforming granules on the physical properties of tablets, *Powder Technol.*, 310 (2017) 92-102.
- [42] S. Abdel-Hamid, G. Betz, Study of radial die-wall pressure changes during pharmaceutical powder compaction, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 37 (2011) 387-395.
- [43] C. Al-Karawi, T. Cech, F. Bang, C.S. Leopold. Investigation of the tableting behavior of Ibuprofen DC 85 W, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 44 (2018) 1262-1272.
- [44] B.E. Jones, H. Seager, M.E. Aulton, S.S. Morton, M.E. Aulton, *Pharmaceutics: the science of dosage form design*, Edinburgh, Churchill Livingstone: *Longman Group*, 322 (1988).
- [45] S. Beg, O.P. Katare, S. Saini, B. Garg, R.K. Khurana, B. Singh, Solid self-nanoemulsifying systems of olmesartan medoxomil: Formulation development, micromeritic characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation, *Powder Technol.*, 294 (2016) 93-104.
- [46] M.M. Chokshi, M.M. Gupta, M. Gupta, Formulation development and evaluation of gastroretentive floating tablet of ciprofloxacin hydrochloride, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 8 (2016) 148-152.
- [47] U.S Pharmacopoeia, U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35), Gastric and Intestinal fluids, Simulated, United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, Md, USA, 2017, pp. 2415-2420.
- [48] K.V. Konan, T.C. Le, M.A. Mateescu, Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay, *Anal. Methods*, 8 (2016) 5638-5644.
- [49] U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35), Dissolution, United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, Md, USA, 2017, pp. 588-610.
- [50] T.V. Sreevidya, B. Narayana, A simple and rapid spectrophotometric method for the determination of artesunate in pharmaceuticals, *Eurasian J Anal Chem.*, 4 (2009) 119-126.
- [51] T.N.C. Wells, R.H. Van Huijsduijnen, W.C. Van Voorhis, Malaria medicines: a glass half full?, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 14 (2015) 424-442.
- [52] P. Pająk, R. Socha, J. Broniek, K. Królikowska, T. Fortuna, Antioxidant properties, phenolic and mineral composition of germinated chia, golden flax, evening primrose, phacelia and fenugreek, *Food Chem.*, 275 (2019) 69-76.

- [53] T.A. Sokamte, P.D. Mbougung, N.L. Tatsadjieu, N.M. Sachindra, Phenolic compounds characterization and antioxidant activities of selected spices from Cameroon, *S. Afr. J. Bot.*, 121 (2019) 7-15.
- [54] U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35), United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, Md, USA, 2017, pp. 1749-1750.
- [55] N.S.V. Capanema, A.A.P. Mansur, A.C. de Jesus, S.M. Carvalho, L.C. de Oliveira, H.S. Mansur, Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications, *Int J Biol Macromol.*, 106 (2018) 1218-1234.
- [56] V. Gautam, K.P. Singh, V.L. Yadav, Preparation and characterization of green-nano-composite material based on polyaniline, multiwalled carbon nano tubes and carboxymethyl cellulose: For electrochemical sensor applications, *Carbohydr. Polym.*, 189 (2018) 218-228.
- [57] A.A. Oun, J.-W. Rhim, Characterization of carboxymethyl cellulose-based nanocomposite films reinforced with oxidized nanocellulose isolated using ammonium persulfate method, *Carbohydr. Polym.*, 174 (2017) 484-492.
- [58] T.C. Trevisol, A.R.M. Fritz, S.M.A.G.U. de Souza, A.C.K. Bierhalz, J.A.B. Valle, Alginate and carboxymethyl cellulose in monolayer and bilayer films as wound dressings: Effect of the polymer ratio, *J. Appl. Polym. Sci.*, 136 (2019) 46941.
- [59] I. Dankar, A. Haddarah, F.E.L. Omar, M. Pujolà, F. Sepulcre, Characterization of food additive-potato starch complexes by FTIR and X-ray diffraction, *Food Chem.*, 260 (2018) 7-12.
- [60] M.S. Iqbal, J. Akbar, S. Saghir, A. Karim, A. Koschella, T. Heinze, M. Sher, Thermal studies of plant carbohydrate polymer hydrogels, *Carbohydr. Polym.*, 86 (2011) 1775-1783.
- [61] L.G. Cuinica, R.O. Macêdo, Thermoanalytical characterization of plant drug and extract of *Urtica dioica* L. and kinetic parameters analysis, *Therm Anal Calorim.*, 133 (2018) 591-602.
- [62] J. Zhang, L. Feng, D. Wang, R. Zhang, G. Liu, G. Cheng, Thermogravimetric analysis of lignocellulosic biomass with ionic liquid pretreatment, *Bioresour Technol.*, 153 (2014) 379-382.
- [63] Å. Adolfsson, H. Olsson, C. Nyström, Effect of particle size and compaction load on interparticulate bonding structure for some pharmaceutical materials studied by compaction and strength characterisation in butanol, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 44 (1997) 243-251.

- [64] A. Skelbæk-Pedersen, A.S.N. Nordisk, T. Vilhelmsen, V. Wallaert, J. Rantanen, Quantification of fragmentation of pharmaceutical materials after tableting, *J. Pharm. Sci.*, (2018) 1246-1253.
- [65] V.R. Malipeddi, R. Awasthi, K. Dua, Formulation and evaluation of controlled-release matrix systems of ciprofloxacin, *Polim Med.*, 47 (2017) 101-106.
- [66] H. Wen, X. Li, Y. Li, H. Wang, Y. Wang, T. Wang, W. Pan, X. Yang, In vitro and in vivo evaluation of controlled-release matrix tablets of highly water-soluble drug applying different mw polyethylene oxides (PEO) as retardants, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 44 (2018) 544-552.
- [67] S. Tan, A. Ebrahimi, T. Langrish, Controlled release of caffeine from tablets of spray-dried casein gels, *Food Hydrocoll.*, 88 (2019) 13-20.
- [68] J. Zhang, C.-Y. Wu, D. Storey, G. Byrne, Interfacial strength of bilayer pharmaceutical tablets, *Powder Technol.*, 337 (2018) 36-42.
- [69] R.J. Hemley, Effects of high pressure on molecules, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 51 (2000) 763-800.
- [70] L.A.L. Soares, G. González Ortega, P.R. Petrovick, P.C. Schmidt, Dry granulation and compression of spray-dried plant extracts, *AAPS PharmSciTech*, 6 (2005) E359-E366.
- [71] S. Patel, A.M. Kaushal, A.K. Bansal, Compression physics in the formulation development of tablets, Critical Reviews™ in *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 23 (2006). 1-66.
- [72] E. Assaad, M.A. Mateescu, The influence of protonation ratio on properties of carboxymethyl starch excipient at various substitution degrees: Structural insights and drug release kinetics, *Int. J. Pharm.*, 394 (2010) 75-84.
- [73] T. Herraiz, J. Galisteo, Endogenous and dietary indoles: a class of antioxidants and radical scavengers in the ABTS assay, *Free Radic. Res.*, 38 (2004) 323-331.
- [74] F. Podczek, Methods for the practical determination of the mechanical strength of tablets-From empiricism to science, *Int. J. Pharm.*, 436 (2012) 214-232.

CHAPITRE X

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Face aux différentes formes de résistance de son agent pathogène (*Plasmodium*) aux traitements, surtout en monothérapie, seuls les traitements en Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine (CTA) sont recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2017). Actuellement, seulement un nombre limité (6) de médicaments antipaludiques sont utilisés pour le traitement du nombre élevé de cas palustres, dont l'infection diffère (espèce de *Plasmodium*, gravité, la forme de résistance) régulièrement d'une région à l'autre. D'où l'exploration de nouvelles molécules à activité antipaludéenne dont l'extrait de la plante *Peschiera fuchsiaefolia* (Pf). Essentiellement composé d'alcaloïdes bisindoliques (Zocoler et al., 2005), l'extrait de Pf doit son importance dans le traitement contre paludisme à ses propriétés antioxydantes qui seraient à la base de son action contre les *Plasmodium* (Federici et al., 2000; Frederich et al., 2008; Chowdhury et al., 2017). Toutefois, sa capacité à inhiber la P-glycoprotéine (P-gp, protéine ATP-dépendante responsable de la multirésistance aux médicaments) dont un analogue est produit par le *Plasmodium* et augmente sa défense contre les xénobiotiques (Meschini et al., 2005; Chowdhury et al., 2017), serait un autre de ses atouts dans le traitement du paludisme. L'extrait de Pf, auparavant formulé en monothérapie pour le traitement du paludisme dans plus de treize pays (Stella et Cissé, 2007; Condello et al., 2014), fut délaissé bien qu'ayant eu de bons résultats *in vivo*. Plusieurs raisons pourraient justifier l'abandon de ce traitement sous l'appellation de *MMH Malarex* et *MMH 18*; ce sont, le développement

de résistance, la faible solubilité de Pf (comme tout alcaloïde) et les difficultés liées à sa formulation en raison du coût élevé des méthodes de dosage disponibles, de l'exigence d'une longue durée pour l'évaluation de ses propriétés responsables de son activité antiplasmodiale, ses propriétés antioxydantes, etc.

Il convenait donc d'améliorer les méthodes de dosage des activités biologiques des agents biopharmaceutiques existants, en l'occurrence, l'évaluation de la capacité antioxydante de la *Peschiera fuchsiaefolia*, dont en dépend son efficacité antiplasmodiale. Cette préoccupation a d'emblée été abordée dans ce projet de doctorat au chapitre VI; il s'agit du 1^{er} article (Konan et *al.*, 2016) proposant une méthode rapide pour évaluer la capacité antioxydante de certains agents bioactifs.

Les alcaloïdes, dont l'extrait de la *Peschiera fuchsiaefolia*, sont réputés pour leurs haute perméabilité et faible solubilité (classe II du SCB). L'amélioration de leur solubilité, sans toutefois affecter leur bioactivité convoitée pour leur utilisation comme agent pharmaceutique actif dans les formulations a été l'un des objectifs du projet. Un atout serait de faciliter la formulation en forme de dosage solide à administration orale pour une libération contrôlée (prolongée, soutenue et/ou retardée, etc.), eu égard à la persistance de forme de résistance de plusieurs pathologies. Les études de la cinétique de libération d'un composé nécessitent des méthodes spectrométriques adéquates, mais aucune n'est disponible pour l'extrait de *Peschiera fuchsiaefolia*, essentiellement composé d'alcaloïdes bisindoliques dont la voacamine, la voacamidine, tabernamine, l'affinisine, etc.

Le second axe (chapitre VII : article 2) se propose de répondre aux attentes d'amélioration de la solubilité de l'extrait de la Pf, favorisant une formulation à libération prolongée, et de développer une méthode de dosage de cet extrait.

Au nombre des pathologies confrontées de plus en plus à des formes de résistance s'inscrit le paludisme dont les formulations thérapeutiques à base d'Artémisinine doivent être associées à un autre agent antipaludique (OMS, 2017). En effet, l'utilisation de l'Arte en monothérapie, malgré son efficacité initiale, est source de développement de diverses formes de résistance du *Plasmodium*, surtout du *Plasmodium falciparum*, la forme la plus dangereuse et létale. L'Arte ayant une action rapide et une demi-vie courte, le second agent antipaludique pour la CTA devra pouvoir maintenir l'activité antipaludique par une livraison soutenue et prolongée. Afin de faciliter le développement d'une formulation antipaludique en CTA associant l'Arte à l'extrait de Pf, objet de cette étude, l'utilisation d'ingrédients inactifs (excipients) préalablement approuvés par *Food and Drug Administration* (FDA, USA) est la voie priorisée. C'est dans ce sens que s'inscrivait le troisième axe (chapitre VIII : manuscrit en soumission pour publication) de cette thèse de doctorat.

Le quatrième et dernier axe (chapitre IX : article 3) s'est voulu faciliter la manipulation de l'extrait de Pf à l'échelle pilote et industrielle pour obtenir des comprimés antipaludiques en CTA en associant l'Arte à l'extrait de Pf à solubilité améliorée et à densité optimisée, permettant une meilleure compacité.

10.1 Activation rapide de l'ABTS par électrolyse sans interférence dans l'évaluation de la capacité antioxydante par la méthode *TEAC*

L'extrait de la Pf a été sollicité dans ce projet principalement pour ses propriétés antipaludiques basées sur sa capacité antioxydante. L'intérêt pour cette capacité au niveau des biomolécules est en croissance en raison de leurs potentiels thérapeutiques ou protecteurs dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour la prévention ou le traitement de plusieurs maladies (Pinar et *al.*, 2017; Li, W. et *al.*, 2018; Abdel-Daim et *al.*, 2018). Cependant, la méthode *in vitro* recommandée pour

l'évaluation de la capacité antioxydante: la méthode TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) ou test de décoloration du réactif radicalaire ABTS^{•+} (*azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*) requiert un long temps de réalisation. Cet inconvénient est dû au temps nécessaire (environ 16 h) pour l'activation chimique (avec le persulfate de potassium: K₂S₂O₈) du réactif ABTS (solution incolore) en radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu vert (Miller et *al.*, 1996; Re et *al.*, 1999), facilement détectable au spectrophotomètre à 734 nm. La méthode TEAC est basée sur l'habilité d'agents antioxydants donneurs d'électrons de piéger le radical ABTS^{•+} (Miller et *al.*, 1993). Cette réaction engendre une décoloration de la solution d'ABTS^{•+}, permettant de calculer la capacité antioxydante de l'échantillon au moyen du pourcentage de décroissance de l'absorbance à 734 nm, comparé à celui du Trolox (analogue hydrosoluble de la vitamine E) utilisé comme antioxydant de référence (pour établir la courbe standard). Pour déterminer la capacité antioxydante de la Pf, il était d'intérêt de réduire le temps de réalisation de ce test, principalement le temps d'activation du réactif qui était de 16 h avec du K₂S₂O₈. L'introduction de la nouvelle procédure d'activation rapide de l'ABTS par électrolyse (ELS) en 20 sec (Chapitre VI : Konan et *al.*, 2016) au lieu de 16 heures avec le potassium persulfate est une avancée en termes de gain de temps pour les laboratoires d'analyse. Cette nouvelle procédure permet aussi l'augmentation de la stabilité du réactif (Fig. 6.3) pour 7-8 jours (lorsqu'il est activé par ELS) *versus* 3 jours de stabilité dans le cas de l'activation classique (avec le K₂S₂O₈). Ce nouveau test « TEAC rapide » n'a influencé aucunement les valeurs de la capacité antioxydante des échantillons analysés, d'où sa compatibilité avec la méthode TEAC classique, à la seule différence et avantage qui est sa rapidité et sa réalisation facile (chapitre VI : Konan et *al.*, 2016).

En effet, l'oxydation de l'ABTS avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈) pour générer le radical cationique ABTS^{•+} requiert le transfert d'un électron. Lorsque les conditions de cette réaction sont prolongées, le radical généré peut être transformé en dication

ABTS²⁺ avec un changement de la coloration (Venkatasubramanian et Maruthamuthu, 1989 ; Branchi et *al.*, 2005). Un phénomène identique est obtenu avec la nouvelle approche d'activation en prolongeant le temps d'ELS, et est associé à une décoloration et à un déplacement de la longueur d'onde maximale d'absorption de 734 nm à 514 nm (Chapitre VI : Konan et *al.* 2016).

Différemment de l'activation classique (16 h avec le K₂S₂O₈), avec l'ELS, l'ABTS était rapidement converti par oxydation en radical cationique ABTS^{•+} avec le développement de la couleur bleu-vert caractéristique en quelques secondes avec une oxydation maximale de l'ABTS atteinte en seulement 15 à 35 secondes d'ELS (Fig. 6.2). Au-delà, la solution se décolore avec une réduction de l'absorbance à 734 nm, assignée non pas à une dégradation du radical cationique ABTS^{•+} mais à sa conversion en dication ABTS²⁺ non radicalaire, aussi observée lors de l'oxydation par voie chimique (Venkatasubramanian et P. Maruthamuthu, 1989 ; Branchi et *al.*, 2005). Cette hypothèse est soutenue par le fait que le noyau aromatique de l'ABTS électrolysé (ABTS^{•+}) semble rester intact, suite à l'évaluation de l'absorbance à 280 nm. Aucune différence n'a été observée lorsque les valeurs ont été comparées avec celles de la solution d'ABTS non électrolysée, suggérant que les noyaux aromatiques de l'ABTS^{•+} sont demeurés préservés (Fig. 6.7) à l'ELS (400V, 10 mA).

Le A_{max} à 734 nm était attribué à l'ABTS^{•+} tandis que le shift de l'absorbance maximale de 734 nm à 514 nm était dû à la formation du dication ABTS²⁺ (Scott et *al.*, 1993) à un temps d'ELS prolongé, mais avec le maintien de l'absorbance à 280 nm.

Dans le cas de l'activation rapide de l'ABTS par ELS, il aurait des espèces oxydantes (*i.e.* acide hypochloreux) générées durant l'ELS. Après l'arrêt de l'ELS, la génération d'électron s'arrête aussi et aucun agent accumulé ne pourrait influencer la stabilité du radical ABTS^{•+} généré. Différemment, avec la méthode classique, la présence de résidu

de persulfate de potassium dans la solution d'ABTS^{•+} pourrait favoriser la récupération de l'électron cédé à l'ABTS, rendant la conversion de l'ABTS en cation radicalaire ABTS^{•+} lentement réversible, d'où la limitation de la stabilité à seulement 3 jours.

Après l'obtention de la solution d'ABTS^{•+}, la capacité antioxydante des échantillons a été suivie par l'abaissement de l'absorbance à 734 nm comme mesure de la capacité de piégeage du cation radicalaire ABTS^{•+}. Les deux solutions de réactifs radicalaires d'ABTS^{•+} (solutions obtenues par activation classique et par électrolyse) ont été utilisées séparément pour différents tests.

Étant le même composé (ABTS^{•+}), bien qu'obtenu par différents procédés, il semble que les réactivités des solutions d'ABTS^{•+} en présence de différentes concentrations de Trolox sont similaires, sans différences remarquables entre les valeurs de la capacité antioxydante en équivalents de Trolox avec la solution d'ABTS^{•+} obtenue par l'activation classique (avec le persulfate de potassium) et par ELS (Tableau 6.1). En plus de la bonne linéarité de la réponse en termes de quantités de Trolox, la méthode d'activation rapide semble compatible avec la méthode classique.

Les paramètres de voltage (400 V) et d'intensité (10 mA) étaient utilisés précédemment (Dumoulin et *al*, 1996; Jackson et *al*, 1986) pour générer des dommages oxydatifs simulant la reperfusion post-ischémie sur des cœurs isolés de rats. Le temps d'ELS dépend de ces deux paramètres (voltage et intensité).

Dans notre cas, avec des voltages et intensités plus élevés que 400 V et 10 mA, la quantité de charges électriques par unité de temps augmenterait. De ce fait, l'ABTS s'oxyderait encore plus rapidement, en moins de 20 secondes et possiblement avec la formation de dications indésirées. Le temps optimal d'ELS dépend aussi des diamètres des électrodes utilisées et de la concentration de la solution initiale d'ABTS. Toutefois, pour cette méthode *TEAC*, le réactif chromophore (solution cationique radicalaire

d'ABTS^{•+}) devra être dilué afin d'avoir une absorbance de 0,7 ($\pm$ 0,02) à 734 nm avant utilisation. Une concentration faiblement modérée (0.14 mM) de l'ABTS natif permet d'atteindre cette intensité.

10.2 Amélioration de la solubilité des alcaloïdes bisindoliques de type Pf et leurs formulations à administration orale

Les applications thérapeutiques des alcaloïdes (Murphy, 2017; Chowdhury et *al.*, 2017; Tasiu, 2017) sont particulièrement limitées par leur faible solubilité dans l'eau (Fan et *al.*, 2016; Huang et *al.*, 2017). L'extrait de la Pf, essentiellement composé d'alcaloïdes bisindoliques se trouve confronté à ces limitations. Pourtant, il est perçu comme un bon candidat dans le traitement du paludisme (Frederich et *al.*, 2008; Komlaga et *al.*, 2017).

L'amélioration de la solubilité des agents bioactifs concourt à prolonger leur temps de demi-vie dans le sang, à réduire les effets indésirables dans les organes non ciblés, et à faciliter la concentration du médicament sur le site de la maladie (Khan et Gurav, 2018). La solubilité étant l'un des deux paramètres (Fig. 4. 5) pour la classification biopharmaceutique (Amidon et *al.*, 1995; FDA, 2000; Yu et *al.*, 2002), son amélioration facilite la formulation pour une libération contrôlée, plus avantageuse pour une meilleure observance et efficacité du traitement. Elle permet aussi une adaptabilité pour d'éventuelles formulations en bithérapie. Actuellement, il n'y a pas de formulation à libération prolongée de l'extrait de la Pf et il n'existe aucune méthode rapide pour sa quantification, principalement durant le test de dissolution *in vitro*. Un défi du projet a été le choix de matrice appropriée pour une livraison contrôlée, pour la protection des agents actifs contre l'acidité dans l'estomac et pour le transport à leur site d'absorption dans le tractus intestinal. Une telle formulation améliore la biodisponibilité, réduit les fluctuations de la quantité de l'agent bioactif, augmente la sécurité en diminuant les effets secondaires et accroît l'observance du patient.

Notre approche pour l'amélioration de la solubilité de Pf a été sa complexation avec du carboxyméthylamidon (CMS, *carboxymethylstarch*), formant le complexe CMS-Pf. Une comparaison a été faite avec l'extrait initial de Pf et avec la Pf associée à l'excipient commercial maltodextrine (MD/Pf), la forme précédemment stabilisée de Pf.

10.2.1 Pf facilement quantifié par dosage UV à 280 nm

L'élaboration d'une méthode de quantification rapide de l'extrait de la Pf était utile pour suivre son profil cinétique de libération nécessaire pour les formulations à libération prolongée.

La Pf et ses différentes formes, le CMS-Pf (forme complexée avec le CMS) et le MD/Pf (association de la Pf avec la maltodextrine) ont été quantifiées par spectrophotométrie UV à 280 nm, avec une bonne linéarité.

Le principe était basé sur les noyaux indoliques des composants de la Pf (Zocoler et *al.*, 2005; Frederich et *al.*, 2008) et l'évitement de toute interférence avec l'absorption des composés associés (CMS dans le complexe CMS-Pf et MD dans la MD/Pf co-processée). Des trois longueurs d'onde ayant montré un pic d'absorption en UV-Visible (Fig. 8. 9A), celle de 280 nm a été retenue. L'intervalle 190-205 nm fut écarté pour la probable absorption des monomères de D-glucose (présents dans le CMS et dans la MD). Celui de 225-235 nm le fut pour sa proximité au pic d'absorption des groupements carbonyle (C=O) et pour éviter d'éventuelle interférence avec l'absorption des excipients susceptibles d'être utilisés comme système de livraison pour la formulation de comprimés. Les agents actifs dans l'extrait de la Pf (alcaloïdes bisindoliques) contiennent des noyaux aromatiques dont leurs longueurs d'absorption maximale sont autour de 238 et 282 nm, justifiant le choix de 280 nm pour la quantification spectrophotométrique de la Pf et ses dérivés.

10.2.2 Évaluation de la solubilité au moyen d'une propriété spécifique du composé d'intérêt dans un échantillon

La solubilité représente un des facteurs clés dans la formulation des médicaments, déterminante pour atteindre la concentration désirée de médicament en circulation pour la réponse pharmacologique (Chaudhary, 2012; Savjani *et al.*, 2012). En plus, la connaissance de la solubilité des agents pharmaceutiques solides est importante pour la purification, la production, la synthèse du médicament et surtout pour la formulation et la biodisponibilité (Constable *et al.*, 2007; Grodowska et Parczewski, 2010).

L'approche basée sur la mesure du poids sec contenu dans un volume de la solution à saturation (Cano-Chauca *et al.*, 2005), semblait inappropriée pour les complexes, les mélanges ou les associations d'échantillons non homogènes (avec plusieurs composés à solubilité différente), dont le complexe CMS-Pf et l'association MD/Pf.

Les contradictions dans certaines valeurs de la solubilité (mg/mL) des différents échantillons (Fig. 7.10) furent observées à travers les intensités de coloration des solutions saturées des différents échantillons (Fig. 10.1). Pour toute solution colorée visible, il est évident que la coloration s'intensifie proportionnellement avec la concentration. Cette évidence n'a pu être confirmée par calorimétrie, principalement dans le cas du complexe CMS-Pf et de l'association MD/Pf (Fig. 7.7 et 9.1). En plus, certaines de ces valeurs de solubilité (pour CMS-Pf et MD/Pf) obtenues avec cette approche (détermination par poids sec de l'échantillon) n'étaient pas en accord avec les profils des rayons-X (Fig. 7.4) et la morphologie des échantillons CMS-Pf et MD/Pf (Fig. 7.6). Une structure mieux organisée ne corrélait pas avec une plus grande stabilité et une plus basse solubilité de l'échantillon (Fig. 7.7).

L'approche courante, consistait à déterminer la masse du soluté (par pesage), après séchage d'un volume connu de la solution saturée et filtrée (Cano-Chauca *et al.*, 2005). Dans le cas du complexe CMS-Pf et de l'association MD/Pf, les masses mesurées

n'étaient pas seulement celles de Pf mais aussi provenant des agents additifs de revêtement (MD) ou de complexation (CMS). La MD étant un oligosaccharide composé d'unités de D-glucose, elle est hydrophilique et a une solubilité plus élevée que les alcaloïdes. De ce fait, durant le processus de dissolution à saturation, une grande quantité de MD serait facilement dissoute et ainsi contribuant largement à la masse mesurée de Pf sous sa forme MD/Pf. Différemment, le CMS qui était impliqué dans la complexation avec Pf est moins soluble que la MD. Ainsi, au niveau du complexe CMS-Pf, cette masse pourrait contenir du CMS libre, non complexée à Pf, augmentant aussi la masse de soluté. Également, dépendamment des milieux de dissolution, les sels issus de ceux-ci (FGS, FIS) peuvent influencer les résultats.

Ces raisons ont suscité la proposition de la nouvelle approche pour évaluer la solubilité (mg/mL) d'un seul composant : l'analyte dans un échantillon complexe, en se basant sur une propriété spécifique de l'agent analysé. Le principe consiste à déterminer la quantité effective du composé d'intérêt (Pf) en se basant sur une capacité (ou activité) intrinsèque de l'agent concerné, après obtention de la solution saturée filtrée (Chapitre VII).

Avec la Pf, l'association MD/Pf et le complexe CMS-Pf, l'absorption des noyaux indole à 280 nm et leurs activités antioxydantes ont été valorisées pour évaluer leur concentration (mg/mL) en solution saturée (la solubilité). Ainsi, tous les résultats obtenus étaient en accord avec l'intensité de coloration des solutions saturées (Fig. 7.S1), ainsi qu'avec les analyses des profils de diffraction de rayon X (Fig. 7.4) et la morphologie de tous les échantillons (Fig. 7.5), contrairement à la précédente approche basée sur le séchage et la pesée du poids sec de la solution saturée de l'échantillon analysé. Dans la pratique, la différence avec la précédente approche réside dans le procédé de détermination de la quantité de soluté dissoute à saturation. La nouvelle approche a la faveur de l'économie du temps (éviter 24 h d'incubation et 6 h de

séchage), de l'utilisation de petit volume de solution saturée et surtout de la précision de détermination de la quantité de l'analyte.

10.2.3 L'amélioration de la solubilité des alcaloïdes de Pf par complexation avec le carboxyméthylamidon facilite leur formulation à administration orale pour une libération prolongée.

En vue d'améliorer sa solubilité, la Pf a été complexée au carboxyméthylamidon (*carboxymethylstarch*, CMS), formant le complexe CMS-Pf. L'option de la complexation avec ce polymère semi-synthétique anionique visait non seulement l'amélioration de la solubilité, mais aussi à faciliter sa formulation à administration orale avec une libération prolongée de la Pf. Le choix de cet excipient (CMS) se justifie aussi par ses avantages lorsqu'il est utilisé comme matrice pour la livraison d'agent bioactif. Il est capable d'assurer une charge élevée de principe actif, d'offrir une résistance gastrique, une livraison adéquate et une stabilité à long terme (Calinescu *et al.*, 2008; Le Tien et Mateescu, 2017; Zhang *et al.*, 2017). En plus, il a d'excellentes caractéristiques de biodégradabilité et de biocompatibilité (Meskinfam *et al.*, 2011), est moins onéreux, abondant et facile à obtenir. Le CMS a donc été utilisé à la fois comme agent de complexation pour l'amélioration de la solubilité de la Pf et comme matrice pour la formulation à libération contrôlée de la Pf sous sa forme complexée CMS-Pf (Fig. 7.9).

Les groupements carboxylates du CMS auraient interagi avec les groupements amines de Pf, via une interaction ionique, pour former le complexe CMS-Pf (Fig. 7.2-7.4). Du fait de l'intervention des groupements amines dans ces interactions, leur réactivité est donc minimisée, prévenant les interactions indésirables avec d'autres ingrédients bioactifs, particulièrement dans la formulation de Pf avec l'Artémisinine dans le cas des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine, pour le traitement du paludisme comme recommandé par l'OMS (OMS, 2017). La complexation n'affecte que les propriétés physiques de l'extrait de Pf et non sa capacité antioxydante (Tableau

7. 2) responsable de son activité antiplasmodiale (Frederich et *al.*, 2008; Chowdhury et *al.*, 2017). Cet extrait s'est révélé comme un des rares composés naturels à activité antioxydante très élevée (Fig. 7.6). En effet, les alcaloïdes indoliques réagissent de manière non spécifique et piègent le radical ABTS^{•+}, mais plus efficacement à un pH physiologique (Herraiz et Galisteo, 2004), comme montré au Tableau 7.2. Ces hautes activités antioxydantes s'expliqueraient par la composition de l'extrait de la Pf, essentiellement des noyaux bisindole (Zocoler et *al.*, 2005; Frederich et *al.*, 2008).

La complexation de la Pf avec le CMS a largement amélioré la solubilité de cet extrait (Fig. 7.8). Selon les termes de description USP-NF de la solubilité (USP, 2017b), ce procédé a fait passer la solubilité de Pf de « peu soluble » à « soluble » dans l'eau et dans le fluide gastrique simulé (FGS), et à « largement "*freely*" soluble » dans le fluide intestinal simulé (FIS) (Tableau 3.3). L'association de la Pf avec la maltodextrine (MD/Pf) a aussi amélioré la solubilité de Pf, mais les valeurs obtenues avec le complexe CMS-Pf étaient significativement plus élevées (Tableau 7.3). Du fait de la protonation de CMS dans le FGS avec une perte de solubilité (Assaad et Mateescu, 2010), une solubilité plus élevée dans ce milieu était inattendue. La solubilité élevée du complexe CMS-Pf dans ce milieu est une preuve de la complexation de Pf avec le CMS, puisque les groupements carboxyliques complexés avec les groupements amine de Pf sont incapables de se protoner en milieu gastrique. Les valeurs de solubilité basses de Pf (sans association ni complexation) comparées à celles du complexe CMS-Pf représentent une autre preuve montrant que la forte augmentation de la solubilité de Pf est due à sa complexation avec le CMS, formant le complexe CMS-Pf.

Les complexes CMS-Pf obtenus, servant de principe actif, ont été formulés avec des excipients CMS (différents DS) pour obtenir quatre différentes formulations monolithiques (comprimés) avec des cinétiques de libération prolongées, allant jusqu'à 12 h (Fig. 7. 12). La libération de Pf dépendait du DS de CMS utilisé d'une part comme

agent de complexation (CMS-Pf) et d'autre part comme excipient (CMS). Les profils de libération *in vitro* de ces formulations indiquent clairement que le complexe CMS-Pf ainsi que le CMS utilisé comme matrice sont capables de fournir une libération lente de la Pf dans le milieu gastrique pendant 2h, suivie d'une libération soutenue durant 9-12 h dans le milieu intestinal, dépendamment du DS de CMS et de la quantité de l'agent liant (HPMC) utilisés (Fig. 7.9). Ceci n'a été facilité qu'après l'amélioration de la solubilité de la Pf par complexation avec du CMS. Une telle libération est susceptible d'assurer une action soutenue de la Pf.

10.3 L'extrait de Pf à solubilité améliorée sous forme de complexe CMC-Pf est priorisé pour la formulation en combinaison à libération contrôlée des deux principes actifs

Les formulations d'antipaludiques en combinaison thérapeutique à base d'Artémisinine (CTA) sont celles encore efficaces et recommandées pour le traitement contre le paludisme (Adjei, 2016; OMS, 2018c). Actuellement, seul un nombre limité (*i.e.* Artésunate-amodiaquine, Artémether-luméfantrine) est commercialement disponible (Blasco et *al.*, 201 ; OMS, 2018c), malgré l'ampleur du paludisme à travers tous les continents, surtout en Afrique subsaharienne (OMS, 2017b; CDC, 2017a; Kushitor et Boatemaa, 2018). L'extrait de Pf est perçu comme un bon candidat pour son association à l'Artémisinine (Arte), en vue de formulations bithérapeutiques en CTA. Le double mécanisme d'action de ces extraits de plantes contre le *Plasmodium* (alkylation du *Plasmodium* et inhibition compétitive de l'analogue de la P-gp) (Meschini et *al.*, 2003; Chowdhury et *al.*, 2017) est un de ses atouts. Son action inhibitrice contre cette pompe d'efflux de xénobiotiques ATP-dépendante favorise la biodisponibilité de l'Arte (le partenaire bioactif associé), prolonge sa demi-vie et accroît son activité antiplasmodiale, spécialement contre les souches résistantes de *Plasmodium*. En général, l'Arte a une biodisponibilité limitée (à cause de l'efflux) mais

produit un effet thérapeutique rapide lorsqu'elle est utilisée comme agent actif (Sethi *et al.*, 1984).

L'extrait de la Pf dont la solubilité fut améliorée par complexation avec le CMS (Chapitre VII), pouvait facilement être utilisé pour la formulation avec l'Arte comme ingrédients pharmaceutiques actifs pour une CTA. Cependant, pour cette formulation de comprimés CTA, la Pf utilisée était une forme complexée au carboxyméthyl cellulose (CMC-Pf), au lieu du CMS-Pf qui avait pourtant permis la formulation de Pf uniquement en forme de dosage solide à libération prolongée avec de nombreux avantages (Chapitre VI). Ce choix est soutenu par plusieurs raisons. En effet, le CMS utilisé comme système de livraison orale de médicament est difficile à valider parce que cet excipient n'est pas encore approuvé par la *FDA* (l'Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments) comme excipient commercial pour la formulation des médicaments à libération contrôlée. Le CMC possède plusieurs propriétés similaires au CMS et répond aux questionnements susmentionnés.

Le CMC est obtenu (comme le CMS) par étherification de la cellulose (Balser., 1985) qui est la ressource de biopolymère renouvelable et le plus abondant dans la nature. Du CMC est commercialement disponible et facilement accessible avec des viscosités variées à des DS élevés (0.7-0.8) qui ont favorisé des interactions considérables avec Pf (Fig. 8.3, 8.4 et 8.5) pour former le complexe CMC-Pf. Comme obtenue avec le CMS-Pf (Chapitre VII), la solubilité fut largement améliorée (Fig. 8.8) avec la conservation de la bioactivité d'intérêt (activité antioxydante) dans ce projet (Fig. 8.6). La quantification de la libération de Pf formulée avec le complexe CMC-Pf a aisément été réalisée par UV à 280 nm avec une très bonne linéarité (Fig. 8.9).

Le CMC, aussi capable d'assurer un chargement élevé d'agent bioactif, une résistance gastrique et intestinale, une livraison adéquate et une stabilité à long terme (Anirudhan,

2017; Mandal, 2017), a été à la fois utilisé comme agent complexant et matrice pour les formulations de comprimés. Les deux types de formulations (comprimés bilayer et monolithique) développés étaient basés sur deux approches de traitement différentes (Chapitre VIII). Avec le comprimé bilayer, la couche Arte fut immédiatement libérée (Fig. 8.11 et 8.12A), en vue d'exercer son action rapide contre le *Plasmodium* pour un traitement immédiat. Ensuite la libération lente et prolongée de la couche CMC-Pf (10-12h) procurerait une action antiplasmodiale durable. Une telle forme de dosage "bicouche" engendre un coût de production industrielle élevé du fait de l'utilisation d'équipements spéciaux de compression et de long temps de fonctionnement dû au processus en plusieurs étapes. Ainsi, la forme "bilayer" serait difficilement accessible aux personnes des régions à faible revenu (OMS, 2017b ; Kushitor et Boatemaa, 2018). Par conséquent, une forme de dosage de comprimé monolithique avec une approche thérapeutique différente a été développée. Le coût de sa production est moindre comparé à celui de la formulation de comprimé bilayer. La libération prolongée et concomitante (Fig. 8.12) des deux agents bioactifs avec des mécanismes d'action différents sur le parasite (Chapitre VIII) est fortement recommandée contre les formes de résistance de *Plasmodium* (WHO, 2010b et 2017c; Dondorp et *al.*, 2009). La présence simultanée de Arte et de Pf serait bénéfique à l'action d'Arte de par l'inhibition de la P-glycoprotéine par les alcaloïdes bisindoliques contenus dans l'extrait de la Pf, particulièrement la voacamine (Meschini et *al.*, 2003; Chowdhury et *al.*, 2017). Des conséquences de cette action inhibitrice et de l'absence d'interaction entre les deux agents actifs (Fig. 8.10c, 8.10d) sont l'accroissement de leur biodisponibilité (Arte et Pf) et l'extension de leur demi-vie qui augmenteraient l'activité antiplasmodiale de la formulation. Une telle formulation contribue aussi à réduire les fluctuations de la quantité de l'agent thérapeutique et augmente l'observance du patient et la sécurité du traitement en diminuant les effets secondaires.

Les comprimés (bilayer et monolithique) issus de ces formulations avaient de bonnes caractéristiques mécaniques (Table 8.4), montrant leur résistance aux fractures et brisures, l'habilité de résister au stress de l'emballage, du transport et de la manipulation (USP, 1995; Podczeck, 2012) sans affecter leur profil cinétique de libération (Riippi et *al.*, 1998). Cependant, pour la compression directe de ces formulations, il était difficile de remplir en un trait le moule avec la poudre issue des différentes formulations, principalement à cause du caractère duveteux de Pf (aussi sous ses formes CMS-Pf et CMC-Pf) entraînant une faible densité. Leur introduction complète dans le moule avait donc été faite à la main et une presse manuelle a servi à la compression pour obtenir les comprimés. Cependant, ce procédé n'est possible que dans les laboratoires pour une production journalière de seulement quelques dizaines de comprimés mais pas à l'échelle pilote ou industrielle. Ce problème a été abordé et résolu afin de permettre une production de comprimés avec ces formulations en utilisant une presse automatique.

10.4 L'extrait de Pf sous forme précompressée (pCMC-Pf) est plus avantageux pour la production des comprimés à plus grande échelle

La poudre de Pf (CMC-Pf) a un caractère duveteux avec une faible densité et volumineuse, entraînant un faible écoulement. Ces caractéristiques de la Pf, comme ingrédient pharmaceutique actif, sont différentes de celles requises dans l'industrie pharmaceutique, des presses automatiques et des presses à compression multiple pour la fabrication en continu des comprimés (Vargas et *al.*, 2018; Barimani et *al.*, 2018). D'où la nécessité d'un prétraitement préalable à leur compression directe (Kleinebudde, 2004; Walker, 2006) pour la production des comprimés.

Dans le cas du complexe CMC-Pf, une précompression de 25 Kg/g à 100 Kg/g (Chapitre IX) a suffi pour densifier considérablement cette poudre (Fig. 9.2). Ce

procédé a permis une manipulation plus aisée et une libre introduction de cet extrait dans le moule pour compression (Chapitre IX). Comparativement au CMC-Pf, l'échantillon issu de la précompression (pCMC-Pf) présentait une différence morphologique (Fig. 9.7), mais aucun changement au niveau structural n'a été observé (Fig. 9.4 et 9.5). Du fait que le CMC est demeuré lié avec la Pf après la précompression, la solubilité (mg/mL) du complexe pCMC-Pf était égale à celle de CMC-Pf (Fig. 8.7A). Aussi, son activité antioxydante fut conservée (Fig. 8.7B), ainsi que les cinétiques de libération à partir des comprimés issus des différentes formulations (Fig. 9.9). En plus, ces comprimés présentent de bonnes caractéristiques mécaniques (Fig. 9.10), comme le fut avec l'utilisation de CMC-Pf (chapitre VIII). Dès lors, la Pf précompressée (pCMC-Pf) se présente comme la forme la plus avantageuse pour élaborer des comprimés à administration orale. De ce fait, les formulations en CTA de la Pf sont susceptibles d'être utilisées pour une production industrielle des comprimés, en utilisant la forme précompressée, le pCMC-Pf.

10.5 Conclusion et perspectives

Malgré les efforts continuellement fournis pour la lutte contre le paludisme, cette infection parasitaire continue d'endeuiller, de se propager, de résister à un grand nombre de traitements autrefois efficaces et de s'imposer dans plusieurs régions. Seulement un petit nombre de formulations en CTA pour administration orale est disponible pour le traitement contre cette pandémie. Cependant, de nombreux extraits de plantes se sont révélés efficaces *in vivo*, mais abandonnés à cause des difficultés de formulation liées à leur faible solubilité et à leur caractère duveteux. Aussi les études de dissolution de la plupart de ces extraits nécessite des frais par l'utilisation de procédures analytiques hautement sophistiquées.

Ce projet doctoral s'était donné pour mission de contribuer à la résolution de cette problématique, en utilisant l'extrait de Pf. Les travaux ont permis l'élaboration de

formulation en forme de dosage de comprimés monolithiques de l'extrait de Pf avec une libération prolongée (10-12h). Pour y parvenir aisément, il était nécessaire d'améliorer la solubilité de cet extrait de plante. Sa complexation avec du CMC ou du CMS, formant les complexes CMC-Pf et CMS-Pf, a permis une amélioration considérable. Dès lors, il a aussi été possible d'élaborer des formulations de formes de dosage de comprimés (bilayer et monolithique) en CTA, associant l'Arte à chacune des formes complexées de Pf (CMC-Pf et CMS-Pf) pour des libérations séquentielles ou simultanées, mais différentielles avec des cinétiques de libération prolongées (10-12 h). Une telle étude avec l'extrait de Pf étant nouvelle, une méthode de dosage spectrophotométrique a été développée pour sa quantification sous ses différentes formes, surtout pour la détermination *in vitro* de la cinétique de libération des comprimés formulés. Ainsi, la Pf a pu être aisément quantifiée par dosage en UV à 280 nm, en se basant sur l'absorption des noyaux indole (aromatique) des alcaloïdes de cet extrait.

Il ressort aussi que la précompression des complexes de Pf (CMC-Pf et CMS-Pf) est appropriée pour sa densification, étape indispensable pour la production automatique et industrielle des comprimés de Pf, et des extraits de plante en général (duveteux et volumineux). Ce procédé n'affecte pas la complexation, ni la formulation et encore moins la cinétique de libération des formes de dosages des comprimés.

Pour l'évaluation de la bioactivité d'intérêt de Pf dans ce projet (activité antioxydante), la méthode *TEAC* utilisant le cation radicalaire ABTS^{•+} comme réactif chromophore a été améliorée pour une réduction du temps de dosage. L'activation rapide de l'ABTS (20 sec au lieu de 16 h) n'influence pas les valeurs de la capacité antioxydante, mieux elle augmente sa durée de stabilité. L'extrait de Pf sous ses différentes formes s'est révélé comme un des rares composés naturels et solubles avec une activité antioxydante élevée.

Comme perspectives, des études *in vivo* et/ou cliniques pourraient être envisagées avec les formulations élaborées afin d'évaluer leur efficacité. Aussi, la voie des formulations

pédiatriques en CTA et des formulations pour le traitement du paludisme cérébral sont à considérer. L'extrait de Pf, soupçonné être efficace contre des bactéries, son activité antibactérienne pourrait être évaluée à des fins d'utilisation comme agent antimicrobien vert (d'origine naturelle) dans les fermes d'élevage sans risque de développer des souches résistantes aux antibiotiques. De plus, la Pf pourrait être utilisée dans des approches bithérapeutiques anticancéreuses comme inhibiteur de la P-gp pour une efficacité améliorée du traitement. Il est aussi envisageable de l'utiliser comme supplément ou additif alimentaire pour ses bonnes capacités antioxydantes.

ANNEXE A

CONTROLLED RELEASE FORMULATION FOR THE TREATMENT
OF MALARIA

Demande de Brevet d'invention, *US Patent application*, 62/739,394 (2018)

Inventeurs : Kouadio Victorien Konan, Mircea Alexandru Mateescu



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
 United States Patent and Trademark Office
 Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
 P.O. Box 1450
 Alexandria, Virginia 22313-1450
 www.uspto.gov

APPLICATION NUMBER	FILING or PRIORITY DATE	OR PART UNIT	FIL.FEE REC'D	ATTY. DOCKET NO.	TOT CLAIMS	END CLAIMS
62/739,394	10/01/2018		140	P4596US01		

CONFIRMATION NO. 1095
 UPDATED FILING RECEIPT

76753
 Benoit & Cote Inc.
 300-560 Cremazie E.
 Montreal, QC H2P 1E8
 CANADA



Date Mailed: 02/05/2019

Receipt is acknowledged of this provisional patent application. It will not be examined for patentability and will become abandoned not later than twelve months after its filing date. Any correspondence concerning the application must include the following identification information: the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF APPLICANT, and TITLE OF INVENTION. Fees transmitted by check or draft are subject to collection. Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. **If an error is noted on this Filing Receipt, please submit a written request for a Filing Receipt Correction. Please provide a copy of this Filing Receipt with the changes noted thereon. If you received a "Notice to File Missing Parts" for this application, please submit any corrections to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections**

Inventor(s)

Konan VICTORIEN, Montreal, CANADA;
 Mircea Alexandru MATEESCU, Montreal, CANADA;

Applicant(s)

KARICI DIAGNOSTICS INC., Laval, CANADA;

Power of Attorney:

Mathieu Miron--69840

Permission to Access Application via Priority Document Exchange: Yes

Permission to Access Search Results: Yes

Applicant may provide or rescind an authorization for access using Form PTO/SB/39 or Form PTO/SB/69 as appropriate.

Projected Publication Date: None, application is not eligible for pre-grant publication

Non-Publication Request: No

Early Publication Request: No

**** SMALL ENTITY ****

Title

CONTROLLED RELEASE FORMULATIONS FOR THE TREATMENT OF MALARIA

Statement under 37 CFR 1.55 or 1.78 for AIA (First Inventor to File) Transition Applications: No

ANNEXE B

ALCALOÏDES BISINDOLIQUES COMME AGENTS ANTIBACTÉRIENS D'ORIGINE NATURELLE

Les résultats préliminaires ont été présentés sous forme d'affiche au 11^e symposium annuel du CRIPA (Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Aviaire) du 15 au 16 juin 2018 à la Faculté de médecine vétérinaire, UdeM à Saint-Hyacinthe (Québec), Canada.

Alcaloïdes bisindoliques comme agents antibactériens d'origine naturelle

K. Victorien Konan^{1,3}, Tien Canh Le^{1,3}, Carl Gagnon^{2,3}, M. A. Mateescu^{1,3}

¹Département de Chimie et Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, H3C3P8 (Qc), Canada. ²Groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale (GREMIP), Faculté de médecine vétérinaire et ³Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6 (Qc), Canada

Introduction



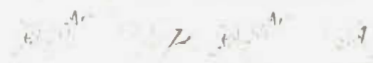
Maladies infectieuses: brucellose, salmonellose, rouget, entérites hémorragiques

Antibiotiques: utilisation de plus en plus proscrite due à l'apparition de souches résistantes, nécessitant des doses administrées de plus en plus élevées.

Méthodes alternatives: utilisation de produits naturels d'origine végétale, préférable pour les consommateurs et les fermes d'élevage.

Extrait de *Peschiera fuschiaefolia* (Pf), arbre de la famille des *Apocynaceae* semble être un bon candidat.

Composés majoritaires: alcaloïdes bisindoliques



Utilisation précédente: contre la leishmaniose, la bilharziose, l'amibiase, la paludisme (Brésil).

Efficacité soupçonnée contre des agents pathogènes comme *E. coli*, *Listeria* et *Salmonella*

Mécanisme: alkylation des protéines ou changement de la perméabilité membranaire des agents pathogènes entraînant la mort cellulaire.

Objectif: Évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait de Pf et développer des formulations sous forme de comprimés monolithiques pour une libération prolongée.

Méthodologie

Propriétés antibactériennes: diffusion radiale



Détermination de la CMI: tests de dilutions



Formulation, test de dissolution et dosage de Pf



Résultats & Discussion



Fig. 1: Zones d'inhibition de l'extrait de Pf sur différents micro-organismes

Tableau 1: CMI de Pf sur les différents micro-organismes

	<i>E. coli</i>	<i>Strept. thermo.</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
CMI (mg/mL)	07 ± 1	03 ± 0,5	05 ± 0,5

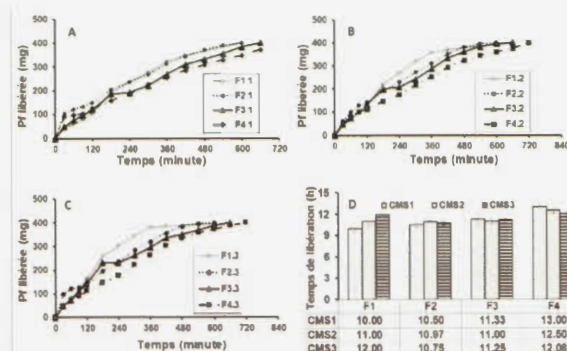


Fig. 2: A-C) Profil de libération de l'extrait de *Peschiera*. Comprimés (755-855 mg); matrice: 100 mg CMS (CMS1-A, CMS2-B, CMS3-C); lubrifiant: 15 mg magnésium stearate; différentes quantités de HPMC (agent liant) dans la formulation F1 (100 mg), F2 (120 mg), F3 (150 mg), F4 (200 mg), avec 450 mg de Pf (P.A); D) Durée totale de libération des différentes formulations.

Conclusion & Perspectives

Efficacité de la Pf contre *Escherichia Coli* BL21 DE3 (Bacille Gram négatif), *Streptococcus Thermophilus* (Cocci Gram positif) et *Saccharomyces Cerevisiae* (levure).

Possible livraison de la Pf au niveau du côlon chez les animaux, à partir de comprimés monolithiques contenant l'extrait de Pf

En cours: Tests contre des bactéries pathogènes telles que *E. coli* H7:O157 et *Listeria monocytogenes*

En vue: Tests *in vivo* sur des modèles aviaires pour le traitement préventif et/ou curatif contre des virus tel que celui de la grippe aviaire

Remerciements

Références

1. Ramanitrahimbola *et al.*, 2001. *Phytother. Res.*, 15, 30-33.
2. Meschini *et al.*, 2003. *Int. J. Oncol.*, 23, 1505-1513
3. USP, 2017. U.S Pharmacopoeia-National Formulary (USP 40 NF 35) Vol 1, United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2016. Dissolution; p. 588-610.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, R., Childress, A. C., Nagraj, P., Rolke, R., Berry, S. A. et Palumbo, D. R. (2018). Relative bioavailability of methylphenidate extended-release chewable tablets chewed versus swallowed whole. *Clin. Ther.*, 40(5), p. 733-740
- Abdel-Daim, M., Abushouk, A. I., Reggi, R., Yarla, N. S., Palmery, M. et Peluso, I. (2018). Association of antioxidant nutraceuticals and acetaminophen (paracetamol): Friend or foe? *J Food Drug Anal*, 26(2S), p. S78-S87
- Abe, H., Yasui, S., Kuwata, A. et Takeuchi, H. (2009). Improving powder flow properties of a direct compression formulation using a two-step glidant mixing process. *Chem. Pharm. Bull.*, 57(7), p. 647-652
- Agnandji, S. T., Fernandes, J. F., Bache, E. B. et Ramharter, M. (2015). Clinical development of RTS,S/AS malaria vaccine: a systematic review of clinical Phase I-III trials. *Future Microbiol.*, 10(10), p. 1553-1578
- Agnandji, S. T., Lell, B., Fernandes, J. F., Abossolo, B. P., Methogo, B. G. N. O., Kabwende, A. L., . . . Vansadia, P. (2012). A phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine in african infants. *N. Engl. J. Med.*, 367(24), p. 2284-2295
- Agrawal, M., Saraf, S., Saraf, S., Antimisiaris, S. G., Hamano, N., Li, S.-D., . . . Alexander, A. (2018). Recent advancements in the field of nanotechnology for the delivery of anti-Alzheimer drug in the brain region. *Expert Opin Drug Deliv.*, 15(6), p. 589-617
- Aikawa, R., Nagai, T., Tanaka, M., Zou, Y., Ishihara, T., Takano, H., . . . Komuro, I. (2001). Reactive Oxygen Species in Mechanical Stress-Induced Cardiac Hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289(4), p. 901-907
- Akhood, B. A., Singh, K. P., Varshney, M., Gupta, S. K., Shukla, Y. et Gupta, S. K. (2014). Understanding the mechanism of atovaquone drug resistance in *Plasmodium falciparum* Cytochrome b mutation Y268S using computational methods. *PLoS One*, 9(10): e110041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110041>
- Akinosoglou, K. S., Solomou, E. E. et Gogos, C. A. (2012). Malaria: a haematological disease. *Hematology*, 17(2), p. 106-114

- Akinrinde, A. S., Afolayan, A. J. et Bradley, G. (2018). Phytochemical Composition and Antioxidant Activities of *Dianthus Thunbergii* Hooper and *Hypoxis Argentea* Harv Ex Baker: Plants Used for the Management of Diabetes Mellitus in Eastern Cape, South Africa. *Pharmacognosy Magazine*, 14(54), p. 195-202
- Alderborn, G., Pasanen, K. et Nyström, C. (1985). Studies on direct compression of tablets. XL Characterization of particle fragmentation during compaction by permeametry measurements of tablets. *Int J Pharm.*, 23(1), p. 79-86
- Alderton, W. K., Cooper, C. E. et Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.*, 357(3), p. 593-615.
- Alharbi, K., Ghoneim, A., Ebid, A., El-Hamshary, H. et El-Newehy, M. H. (2018). Controlled release of phosphorous fertilizer bound to carboxymethylstarch-g-polyacrylamide and maintaining a hydration level for the plant. *Int J Biol Macromol.*, 116, p. 224-231
- Alonso, P. L., Smith, T., Schellenberg, J. R., Masanja, H., Mwankusye, S., Urassa, H., . . . Menendez, C. (1994). Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet*, 344(8931), p. 1175-1181
- Aly, A. S. I., Vaughan, A. M. et Kappe, S. H. I. (2009). Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Ann Rev Microbiol.*, 63(1), p. 195-221
- Amidon, G. L., Lennernaes, H., Shah, V. P. et Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm. Res.*, 12(3), p. 413-420
- Anderson, T. J. C., Nair, S., Qin, H., Singlam, S., Brockman, A., Paiphun, L. et Nosten, F. (2005). Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (pfcrt) and multidrug resistance gene (pfmdr) associated with antimalarial drug resistance?. [Erratum to document cited in CA143:167447]. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(9), p. 2180-2188
- Andriantsoanirina, V., Ratsimbaoa, A., Bouchier, C., Tichit, M., Jahevitra, M., Rabearimanana, S., . . . Menard, D. (2010). Chloroquine clinical failures in *P. falciparum* malaria are associated with mutant Pfmdr-1, not Pfcrt in Madagascar. *PLoS One*, 5(10): e13281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013281>
- Antoine, T., Fisher, N., Amewu, R., O'Neill, P. M., Ward, S. A. et Biagini, G. A. (2014). Rapid kill of malaria parasites by artemisinin and semi-synthetic endoperoxides involves ROS-dependent depolarization of the membrane potential. *J. Antimicrob. Chemother.*, 69(4), p. 1005-1016

- Antony, H. A., Parija, S. C., Das, S. et Padhi, S. (2016). Sequence analysis of *pfprt* and *pfmdr1* genes and its association with chloroquine resistance in Southeast Indian *Plasmodium falciparum* isolates. *Genom Data*, 8, p. 85-90
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. et Karademir, S. E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.*, 52(26), p. 7970-7981
- Ariyasu, A., Hattori, Y. et Otsuka, M. (2016). Delay effect of magnesium stearate on tablet dissolution in acidic medium. *Int J Pharm.*, 511(2), p. 757-764
- Armstrong, N. A. et Palfrey, L. P. (1989). The effect of machine speed on the consolidation of four directly compressible tablet diluents. *J Pharm Pharmacol*, 41(3), p. 149-151
- Arnao, M. B., Cano, A. et Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.*, 73(2), p. 239-244
- Arnaud, P., Gianazza, E. et Miribel, L. (1988). Ceruloplasmin. *Methods Enzymol*, 163, p. 441-452
- Askling, H. H., Bruneel, F., Burchard, G., Castelli, F., Chiodini, P. L., Grobusch, M. P., . . . Schlagenhauf, P. (2012). Management of imported malaria in Europe. *Malaria J.*, 11, p. 328-328
- Asmawi, A. A., Salim, N., Ngan, C. L., Ahmad, H., Abdulmalek, E., Masarudin, M. J. et Abdul Rahman, M. B. (2018). Excipient selection and aerodynamic characterization of nebulized lipid-based nanoemulsion loaded with docetaxel for lung cancer treatment. *Drug Delivery Transl. Res.*, p.1-12
- Assaad, E., Wang, Y. J., Zhu, X. X. et Mateescu, M. A. (2011). Polyelectrolyte complex of carboxymethylstarch and chitosan as drug carrier for oral administration. *Carbohydr. Polym.*, 84(4), p. 1399-1407
- Ataide, R., Mayor, A. et Rogerson, S. J. (2014). Malaria, primigravidae, and antibodies: knowledge gained and future perspectives. *Trends Parasitol*, 30(2), p. 85-94
- Aubouy, A., Jafari, S., Huart, V., Migot-Nabias, F., Mayombo, J., Durand, R., . . . Deloron, P. (2003). DHFR and DHPS genotypes of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon correlate with *in vitro* activity of pyrimethamine and cycloguanil, but not with sulfadoxine-pyrimethamine treatment efficacy. *J. Antimicrob. Chemother.*, 52(1), p. 43-49
- Ba, S., Raugi, D. N., Smith, R. A., Sall, F., Faye, K., Hawes, S. E., . . . for the University of Washington–Dakar, (2018). A Trial of a Single-tablet Regimen

of Elvitegravir, Cobicistat, Emtricitabine, and Tenofovir Disoproxil Fumarate for the Initial Treatment of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Infection in a Resource-limited Setting: 48-Week Results From Senegal-West Africa. *Clin Infect Dis.*, 67(10), 1588-1594

- Babior, B. M., Lambeth, J. D. et Nauseef, W. (2002). The neutrophil NADPH Oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 397(2), p. 342-344
- Ballard, S.-B., Salinger, A., Arguin, P. M., Desai, M. et Tan, K. R. (2018). Updated CDC Recommendations for Using Artemether-Lumefantrine for the Treatment of Uncomplicated Malaria in Pregnant Women in the United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 67(14), p. 424-431
- Banakur, U. V. (1991). Introduction, historical highlights, and the need for dissolution testing. *Pharmaceutical dissolution testing*, 49, p. 1-18
- Banerjee, R. et Goldberg, D. E. (2001). The *Plasmodium* food vacuole. In: Antimalarial chemotherapy, *Humana Press* (Totowa, NJ), p. 43-63
- Bannister, L. et Mitchell, G. (2003). The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol.*, 19(5), p. 209-213
- Barnes, K. I., Mwenechanya, J., Tembo, M., McIlleron, H., Folb, P. I., Ribeiro, I., . . . Molyneux, M. E. (2004). Efficacy of rectal artesunate compared with parenteral quinine in initial treatment of moderately severe malaria in African children and adults: a randomised study. *Lancet*, 363(9421), p. 1598-1605
- Barnham, K. J., Masters, C. L. et Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.*, 3(3), p. 205-214
- Beard, J. (2006). DDT and human health. *Sci. Total Environ.*, 355(1-3), p. 78-89
- Beckman, J. S. et Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 271(5), p. C1424-C1437
- Beckman, K. B. et Ames, B. N. (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*, 272(32), p. 19633-19636
- Benzie, I. F. F. et Szeto, Y. T. (1999). Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem.*, 47(2), p. 633-636
- Bergendi, L., Beneš, L., Ďuračková, Z. et Ferenčík, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.*, 65(18), p. 1865-1874
- Berlett, B. S. et Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 272(33), p. 20313-20316

- Blasco, B., Leroy, D. et Fidock, D. A. (2017). Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nat. Med.*, 23(8), p. 917-928
- Blau, S., Kohen, R., Bass, P. et Rubinstein, A. (2000a). The Effect of Local Attachment of Cationized Antioxidant Enzymes on Experimental Colitis in the Rat. *Pharm Res.*, 17(9), p. 1077-1084
- Blau, S., Kohen, R., Bass, P. et Rubinstein, A. (2000b). Relation Between Colonic Inflammation Severity and Total Low-Molecular-Weight Antioxidant Profiles in Experimental Colitis. *Dig. Dis. Sci.*, 45(6), p. 1180-1187
- Blayneh, K. W. et Mohammed-Awel, J. (2014). Insecticide-resistant mosquitoes and malaria control. *Math. Biosci.*, 252, p. 14-26
- Bocking, T., Barrow Kevin, D., Netting Andrew, G., Chilcott Terry, C., Coster Hans, G. L. et Höfer, M. (2001). Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 267(6), p. 1607-1618
- Boelsterli, U. A. (2003). Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 192(3), p. 307-322
- Bondet, V., Brand-Williams, W. et Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT -Food Sci Technol.*, 30(6), p. 609-615
- Borrmann, S., Szlezák, N., Binder, R. K., Missinou, M. A., Lell, B. et Kremsner, P. G. (2002). Evidence for the efficacy of artesunate in asymptomatic *Plasmodium malariae* infections. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50(5), p. 751-754
- Bourdon, E. et Blache, D. (2001). The Importance of Proteins in Defense Against Oxidation. *Antioxid Redox Signal.*, 3(2), p. 293-311
- Bousema, T., Okell, L., Felger, I. et Drakeley, C. (2014). Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol.*, 12(12), p. 833-840
- Bozdech, Z., VanWye, J., Haldar, K. et Schurr, E. (1998). The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* exports the ATP-binding cassette protein PFGCN20 to membrane structures in the host red blood cell. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 97(1,2), p. 81-95
- Branchi, B., Galli, C. et Gentili, P. (2005). Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox. *Org. Biomol. Chem.*, 3(14), p. 2604-2614

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. et Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT -Food Sci Technol.*, 28(1), p. 25-30
- Breman, J., Mills, A., Snow, R., Steketee, R., White, N. et K., M. (2006). Conquering Malaria. Dans J. B. DT Jamison, AR Measham, G Alleyne, M Claeson, DB Evans, *Disease Control Priorities in Developing Countries, 2nd ed* (vol. 413). Oxford University Press.
- Burcham, P. C. (1998). Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis*, 13(3), p. 287-305
- Burton, G. W. et Ingold, K. U. (1989). Vitamin E as an *in vitro* and *in vivo* Antioxidant. *Ann N Y Acad Sci*, 570(1), p. 7-22
- Byrn, S. R., Pfeiffer, R. R., Stephenson, G., Grant, D. J. W. et Gleason, W. B. (1994). Solid-State Pharmaceutical Chemistry. *Chem. Mater.*, 6(8), p. 1148-1158
- Cadenas, E. et Sies, H. (1998). The Lag Phase. *Free Radic Res.*, 28(6), p. 601-609
- Calderaro, A., Gorrini, C., Peruzzi, S., Piccolo, G., Dettori, G. et Chezzi, C. (2008). An 8-year survey on the occurrence of imported malaria in a nonendemic area by microscopy and molecular assays. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 61(4), p. 434-439
- Calderaro, A., Piccolo, G., Gorrini, C., Montecchini, S., Rossi, S., Medici, M. C., . . . Snounou, G. (2012). A New Real-Time PCR for the Detection of *Plasmodium ovale* wallikeri. *PLoS One*, 7(10), p. e48033
- Calinescu, C., Nadeau, É., Mulhbach, J., Fairbrother, J. M. et Mateescu, M.-A. (2007). Carboxymethyl high amylose starch for F4 fimbriae gastro-resistant oral formulation. *Int J Pharm.*, 343(1), p. 18-25
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M. et Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innov Food Sci Emerg Technol.*, 6(4), p. 420-428
- Cao, G., Alessio, H. M. et Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med.*, 14(3), p. 303-311
- Cao, G. et Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem.*, 44(6), p. 1309
- Cardinal, J. R. (1984). Matrix systems. Dans R. Langer, *Medical Applications of Controlled Release* (Boca Raton éd., vol. I, Classes of Systems, p. 41-67). CRC Press : Boca Raton.

- Castrati, L., Mazel, V., Busignies, V., Diarra, H., Rossi, A., Colombo, P. et Tchoreloff, P. (2016). Comparison of breaking tests for the characterization of the interfacial strength of bilayer tablets. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)*, 513(1-2), p. 709-716
- Cathcart, S. J., Lawrence, J., Grant, A., Quinn, D., Whitty, C. J. M., Jones, J., . . . Fraser, G. (2010). Estimating unreported malaria cases in England: a capture-recapture study. *Epidemiol Infect*, 138(7), p. 1052-1058
- Cavalcante, A. K. D., Martinez, G. R., Di Mascio, P., Menck, C. F. M. et Agnez-Lima, L. F. (2002). Cytotoxicity and mutagenesis induced by singlet oxygen in wild type and DNA repair deficient *Escherichia coli* strains. *DNA Repair*, 1(12), p. 1051-1056
- CDC. (2012). *Elimination of Malaria in United States (1947-1961)*. Center of Disease Control and Prevention. Récupéré de https://www.cdc.gov/malaria/about/history/elimination_us.html
- CDC. (2015). *Malaria: Ross and the Discovery that Mosquitoes Transmit Malaria Parasites*. Center for Disease Control and Prevention. Récupéré de <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/ross.html>
- CDC. (2017a). *Malaria worldwide: malaria's impact*. Center for Disease control and Prevention. Récupéré de https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/index.html
- CDC. (2017b). *Malaria: malaria facts, Malaria in United States*. Récupéré de <https://www.cdc.gov/malaria/about/facts.html>
- CDC. (2017c). *The history of Malaria, an Ancient Disease*. Center for Disease Control and Prevention. Récupéré de <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/>
- CDC. (2018). *Center for Disease Control and Prevention. The history of Malaria, an Ancient Disease*. Récupéré de <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/>
- Chang, S.-Y., Li, J.-x. et Sun, C. C. (2017). Tensile and shear methods for measuring strength of bilayer tablets. *Int. J. Pharm.*, 523(1), p. 121-126
- Chattoraj, S. et Sun, C. C. (2018). Crystal and particle engineering strategies for improving powder compression and flow properties to enable continuous tablet manufacturing by direct compression. *J. Pharm. Sci.*, 107(4), p. 968-974
- Chenette, E. J. (2017). Recent buzz in malaria research. *FEBS J.*, 284(16), p. 2556-2559

- Cheng, J., Chen, X., Zhao, S. et Zhang, Y. (2015). Antioxidant-capacity-based models for the prediction of acrylamide reduction by flavonoids. *Food Chem.*, 168, p. 90-99
- Cheung, J., Mahmood, A., Kalathur, R., Liu, L. et Carlier, P. R. (2018). Structure of the G119S mutant acetylcholinesterase of the malaria vector *Anopheles gambiae* reveals basis of insecticide resistance. *Structure (Oxford, U. K.)*, 26(1), p. 130-136
- Chowdhury, S. R., Kumar, A., Godinho, J. L. P., De Macedo Silva, S. T., Zuma, A. A., Saha, S., . . . Majumder, H. K. (2017). Voacamine alters *Leishmania* ultrastructure and kills parasite by poisoning unusual bi-subunit topoisomerase IB. *Biochem. Pharmacol.*, 138, p. 19-30
- Coelho, C. H., Doritchamou, J. Y. A., Zaidi, I. et Duffy, P. E. (2017). Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. *NPJ Vaccines*, 2(34), p. 34
- Combrinck, J. M., Mabotha, T. E., Ncokazi, K. K., Ambele, M. A., Taylor, D., Smith, P. J., . . . Egan, T. J. (2013). Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials. *ACS Chem. Biol.*, 8(1), p. 133-137
- Condello, M., Cosentino, D., Corinti, S., Di Felice, G., Multari, G., Gallo, F. R., . . . Meschini, S. (2014). Voacamine modulates the sensitivity to doxorubicin of resistant osteosarcoma and melanoma cells and does not induce toxicity in normal fibroblasts. *J. Nat. Prod.*, 77(4), p. 855-862
- Conner, E. M. et Grisham, M. B. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutr.*, 12(4), p. 274-277
- Cook, N. L., Viola, H. M., Sharov, V. S., Hool, L. C., Schöneich, C. et Davies, M. J. (2012). Myeloperoxidase-derived oxidants inhibit sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity and perturb Ca^{2+} homeostasis in human coronary artery endothelial cells. *Free Radic Biol Med.*, 52(5), p. 951-961
- Correa, M. P. et Pena, L. d. A. (1984). *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro : Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal.
- Cowman, A. F., Galatis, D. et Thompson, J. K. (1994). Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the pfmdr1 gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91(3), p. 1143-1147

- Dahan, A., Miller, J. M. et Amidon, G. L. (2009). Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *AAPS J.*, 11(4), p. 740-746
- Daher, A., Dos, S. T. C., Daher, A., Maia, I., Daher, A., Lalloo, D. G., . . . Santelli, A. C. (2018). Efficacy and safety of artemisinin-based combination therapy and chloroquine with concomitant primaquine to treat *Plasmodium vivax* malaria in Brazil: an open label randomized clinical trial. *Malar J.*, 17(1), p. 45
- Dalal, S. et Klemba, M. (2007). Roles for two aminopeptidases in vacuolar hemoglobin catabolism in *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*, 282(49), p. 35978-35987
- Davis, S. S., Hardy, J. G., Taylor, M. J., Whalley, D. R. et Wilson, C. G. (1984). A comparative study of the gastrointestinal transit of a pellet and tablet formulation. *Int. J. Pharm.*, 21(2), p. 167-177
- Davlanges, E., Dimbu, P. R., Florinda, J. M., Martins, J. F., Fortes, F., Ferreira, C. M., . . . Wiesner, L. (2018). Efficacy and safety of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine, and dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in three provinces in Angola, 2017. *Malar J.*, 17(1), p. 144-154
- Debele, T. A., Mekuria, S. L. et Tsai, H.-C. (2016). Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Mater Sci Eng: C*, 68, p. 964-981
- Debotton, N. et Dahan, A. (2017). Applications of Polymers as Pharmaceutical Excipients in Solid Oral Dosage Forms. *Med. Res. Rev.*, 37(1), p. 52-97
- Desai, M., Ter Kuile, F. O., Nosten, F., McGready, R., Asamo, K., Brabin, B. et Newman, R. D. (2007). Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis.*, 7(2), p. 93-104
- Desideri, A. et Falconi, M. (2003). Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biochem Soc Trans*, 31(6), p. 1322-1325
- Diallo, T., Denou, A., Coulibaly, B.F., Dakouo, B., Coulibaly, B. (2017). Dispensation des antipaludiques dans les officines privées du district de Bamako, Mali. *Antropo*, 37, p. 161-168
- Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L. et Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide, a physiologic messenger. *Ann Inter Med*, 120(3), p. 227-237
- Divis, P. C. S., Shokoples, S. E., Singh, B. et Yanow, S. K. (2010). A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Plasmodium knowlesi*. *Malaria J.*, 9(1), p. 344-350

- Divo, A. A., Geary, T. G. et Jensen, J. B. (1985b). Oxygen- and time-dependent effects of antibiotics and selected mitochondrial inhibitors on *Plasmodium falciparum* in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27(1), p. 21-27
- Dluzewski, A. R., Ling, I. T., Hopkins, J. M., Grainger, M., Margos, G., Mitchell, G. H., . . . Bannister, L. H. (2008a). Formation of the food vacuole in *Plasmodium falciparum*: a potential role for the 19 kDa fragment of merozoite surface protein 1 (MSP1(19)). *PLoS One*, 3(8), p. e3085
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., . . . Lee, S. J. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.*, 361(5), p. 455-467
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progr Neurobiol.*, 62(6), p. 649-671
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, 82(1), p. 47-95
- Ecker, A., Lehane, A. M., Clain, J. et Fidock, D. A. (2012). PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol.*, 28(11), p. 504-514
- El-Barghouthi, M., Eftailha, A. a., Rashid, I., Al-Remawi, M. et Badwan, A. (2008). A Novel Superdisintegrating Agent Made from Physically Modified Chitosan with Silicon Dioxide. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 34(4), p. 373-383
- Elzayat, E. M., Abdel-Rahman, A. A., Ahmed, S. M., Alanazi, F. K., Habib, W. A., Abou-Auda, H. S. et Sakr, A. (2017). Formulation and pharmacokinetics of multi-layered matrix tablets: Biphasic delivery of diclofenac. *Saudi Pharm J.*, 25(5), p. 688-695
- Eziefula, A. C., Bousema, T., Yeung, S., Kanya, M., Owaraganise, A., Gabagaya, G., . . . Wanzira, H. (2014). Single dose primaquine for clearance of *Plasmodium falciparum* gametocytes in children with uncomplicated malaria in Uganda: a randomised, controlled, double-blind, dose-ranging trial. *Lancet Infect Dis.* 14(2), p. 130-139
- Fan, L., Ding, S., Ai, L. et Deng, K. (2012). Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus*. *Carbohydr Polym.*, 90(2), p. 870-874
- Fan, J. P., Liao, D. D., Xie, Y. L., Zheng, B., Yu, J. X., Cao, Y. H., . . . Peng, H. L. (2016). A molecular imprinted polymer on the surface of superparamagnetic Fe₃O₄-graphene oxide (MIP@Fe₃O₄@GO) for simultaneous recognition and enrichment of evodiamine and rutaecarpine in *Evodiae fructus*. *J. Appl. Polym. Sci.*, 134(7), p. 4446-4454

- Farré, A. L. et Casado, S. (2001). Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. *Hypertension*, 38(6), p. 1400-1405
- Fatokun, A. A., Stone, T. W. et Smith, R. A. (2007). Hydrogen peroxide mediates damage by xanthine and xanthine oxidase in cerebellar granule neuronal cultures. *Neurosci. Lett.*, 416(1), p. 34-38
- Faucher, J.-F., Aubouy, A., Adeothy, A., Cottrell, G., Doritchamou, J., Gourmel, B., . . . Deloron, P. (2009). Comparison of sulfadoxine-pyrimethamine, unsupervised artemether-lumefantrine, and unsupervised artesunate-amodiaquine fixed-dose formulation for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Benin: a randomized effectiveness noninferiority trial. *J. Infect. Dis.*, 200(1), p. 57-65
- Favier, A. (2008). Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans les compréhension des mécanisme des maladies et potentiel thérapeutiques. *Act. Chim.*, p. 108-115.
- Faye, B., Ndiaye, J. L., Tine, R., Sylla, K., Gueye, A., Lô, A. C. et Gaye, O. (2010). A Randomized Trial of Artesunate Mefloquine versus Artemether Lumefantrine for the Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Senegalese Children. *Am J Trop Med Hyg.* 82(1), p. 140-144
- Federici, E., Palazzino, G., Nicoletti, M. et Galeffi, C. (2000). Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaeifolia*. *Planta Med.*, 66(1), p. 93-95
- Felger, I., Maire, M., Bretscher, M. T., Falk, N., Tiaden, A., Sama, W., . . . Smith, T. A. (2012). The dynamics of natural *Plasmodium falciparum* infections. *PLoS One*, 7(9), p. e45542
- Feng, G., Boyle, M. J., Cross, N., Chan, J.-A., Reiling, L., Osier, F., . . . Beeson, J. G. (2018). Human Immunization With a Polymorphic Malaria Vaccine Candidate Induced Antibodies to Conserved Epitopes That Promote Functional Antibodies to Multiple Parasite Strains. *J Infect Dis*, 218(1), p. 35-43
- Fenton, H. J. H. (1894). LXXIII.-Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.*, 65, p. 899-910
- Finkel, T. et Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), p. 239
- Fivelman, Q. L., Adagu, I. S. et Warhurst, D. C. (2004). Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48(11), p. 4097-4102

- Flora, S. J. S. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev.*, 2(4), p. 191-206
- Folin, O. et Ciocâlțeu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, 73(2), p. 627-650
- Fox, P. L., Mukhopadhyay, C. et Ehrenwald, E. (1995). Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sci.*, 56(21), p. 1749-1758
- Foye, W. O., Lemke, T. L., Williams, D. A. et Editors. (1995). *Principles of Medicinal Chemistry*. All Rights Reserved.: Williams & Wilkins. 995 p. East Lansing, Michigan, USA.
- Francis, S. E., Sullivan Jr, D. J., Goldberg et Daniel, E. (1997). Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Ann Rev Microbiol.*, 51(1), p. 97-123
- Frederich, M., Tits, M. et Angenot, L. (2008). Potential antimalarial activity of indole alkaloids. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 102(1), p. 11-19
- Freeman, B. (1994). Free radical chemistry of nitric oxide: looking at the dark side. *Chest*, 105(3), p. 79S-84S
- Frevert, U., Usynin, I., Baer, K. et Klotz, C. (2006). Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cell Microbiol.*, 8(10), p. 1537-1546
- Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys.*, 247(1), p. 1-11
- Fry, J. L., Matthews, J., Lane, J. R., Roehl, C. M., Sinha, A., Kjaergaard, H. G. et Wennberg, P. O. (2006). OH-stretch vibrational spectroscopy of hydroxymethyl hydroperoxide. *J Phys Chem. A*, 110(22), p. 7072-7079
- Furlanetto, S., Cirri, M., Maestrelli, F., Corti, G. et Mura, P. (2006). Study of formulation variables influencing the drug release rate from matrix tablets by experimental design. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 62(1), p. 77-84
- Gaillard, T., Madamet, M., Tsombeng, F. F., Dormoi, J. et Pradines, B. (2016). Antibiotics in malaria therapy: which antibiotics except tetracyclines and macrolides may be used against malaria? *Malar. J.*, 15(1), p. 556-559
- Gama, B. E., Lacerda, M. V. G., Daniel-Ribeiro, C. T. et Ferreira-da-Cruz, M. d. F. (2011). Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*

- parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106 Suppl 1, p. 159-166
- Ganther, H. E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, 20(9), p. 1657-1666
- Gao, W., Liu, Y., Jing, G., Li, K., Zhao, Y., Sha, B., . . . Wu, D. (2017). Rapid and efficient crossing blood-brain barrier: Hydrophobic drug delivery system based on propionylated amylose helix nanoclusters. *Biomaterials*, 113, p. 133-144
- Garcia, M. C., Martinelli, M., Ponce, N. E., Sanmarco, L. M., Aoki, M. P., Manzo, R. H. et Jimenez-Kairuz, A. F. (2018). Multi-kinetic release of benznidazole-loaded multiparticulate drug delivery systems based on polymethacrylate interpolyelectrolyte complexes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 120, p. 107-122
- Gbedande, K., Fievet, N., Viwami, F., Ezinmegnon, S., Issifou, S., Chippaux, J.-P., . . . Luty, A. J. F. (2017). Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine PAMVAC: Quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in *Beninese primigravidae*. *Vaccine*, 35(27), p. 3474-3481
- Geary, T. G. et Jensen, J. B. (1983). Effects of antibiotics on *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32(2), p. 221-225
- Ghafourifar, P. et Cadenas, E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.*, 26(4), p. 190-195
- Ghayas, S. S., M.A.; Ajun, F., Baig, T.M. (2013). Factors influencing the dissolution testing of drugs. *Pak. J. Health Research*, 1(1), p. 1-11
- Ghesquière, B., Jonckheere, V., Colaert, N., Van Durme, J., Timmerman, E., Goethals, M., . . . Gevaert, K. (2011). Redox proteomics of protein-bound methionine oxidation. *Mol Cell Proteomics*, 10(5), p. M110-006866
- GHO. (2018). Global Health Observatory (GHO) data : World Health Organization. Récupéré de <http://www.who.int/gho/malaria/epidemic/deaths/en/>.
- Giasson, B. I., Ischiropoulos, H., Lee, V. M. Y. et Trojanowski, J. Q. (2002). The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases1, 2 1 2. *Free Radic Biol Med.*, 32(12), p. 1264-1275
- Ginsburg, H., Ward, S. A. et Bray, P. G. (1999). An integrated model of chloroquine action. *Parasitology Today*, 15(9), p. 357-360
- Ginsburg, I. (1998). Could synergistic interactions among reactive oxygen species, proteinases, membrane-perforating enzymes, hydrolases, microbial hemolysins

and cytokines be the main cause of tissue damage in infectious and inflammatory conditions? *Med hypotheses*, 51(4), p. 337-346

- Ginsburg, I. et Kohen, R. (1995). Synergistic effects among oxidants, membrane-damaging agents, fatty acids, proteinases, and xenobiotics: killing of epithelial cells and release of arachidonic acid. *Inflammation*, 19(1), p. 101-118
- Goldberg, D. E. (2013). Complex nature of malaria parasite hemoglobin degradation. *Proc Natl Acad Sci.*, 110(14), p. 5283-5284
- Goldberg, D. E., Slater, A. F., Cerami, A. et Henderson, G. B. (1990). Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proc Natl Acad Sci.*, 87(8), p. 2931-2935
- Gomes, P. S., Bhardwaj, J., Rivera-Correa, J., Freire-De-Lima, C. G. et Morrot, A. (2016). Immune escape strategies of malaria parasites. *Front Microbiol.* 7, p. 1617
- Gonzalez-Ceron, L., Rodriguez, M. H., Sandoval, M. A., Santillan, F., Galindo-Virgen, S., Betanzos, A. F., . . . Palomeque, O. L. (2015). Effectiveness of combined chloroquine and primaquine treatment in 14 days versus intermittent single dose regimen, in an open, non-randomized, clinical trial, to eliminate *Plasmodium vivax* in southern Mexico. *Malar. J.*, 14, p. 426/421-426/416
- Gordi, T., Huong, D. X., Hai, T. N., Nieu, N. T. et Ashton, M. (2002). Artemisinin pharmacokinetics and efficacy in uncomplicated-malaria patients treated with two different dosage regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46(4), p. 1026-1031
- Goudable, J. et Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Metab.*, 11(2), p. 115-120
- Griffen, J., Owen, A. et Matousek, P. (2015). Comprehensive quantification of tablets with multiple active pharmaceutical ingredients using transmission Raman spectroscopy-A proof of concept study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 115, p. 277-282
- Griffith, O. W. et Meister, A. (1985). Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 82(14), p. 4668
- Grigg, M. J., William, T., Menon, J., Barber, B. E., Wilkes, C. S., Rajahram, G. S., . . . Yeo, T. W. (2016). Efficacy of artesunate-mefloquine for chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Malaysia: an open-label, randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis.*, 62(11), p. 1403-1411

- Gross, G. J., Kersten, J. R. et Warltier, D. C. (1999). Mechanisms of postischemic contractile dysfunction. *Ann. Thorac. Surg.*, 68(5), p. 1898-1904
- Grossmann, D., Moortgat, G. K., Kibler, M., Schlomski, S., Bächmann, K., Alicke, B., . . . Vogel, B. (2003). Hydrogen peroxide, organic peroxides, carbonyl compounds, and organic acids measured at Pabstthum during Berlioz. *J Geophys Res Atmos.*, 108(D4), p. 8250-8269
- Guidet, B. (2009). Albumin. Acute circulatory failure. *Réanimation*, p. 343-356
- Gungor, N., Knaapen, A. M., Munnia, A., Peluso, M., Haenen, G. R., Chiu, R. K., . . . van Schooten, F. J. (2009). Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*, 25(2), p. 149-154
- Guo, J., Tilgner, A., Yeung, C., Wang, Z., Louie, P. K. K., Luk, C. W. Y., . . . Poon, S. (2014). Atmospheric peroxides in a polluted subtropical environment: seasonal variation, sources and sinks, and importance of heterogeneous processes. *Environ. Sci. Technol.*, 48(3), p. 1443-1450
- Gupta, H., Bhandari, D. et Sharma, A. (2009). Recent trends in oral drug delivery: a review. *Recent Pat. Drug Deliv Formul.*, 3(2), p. 162-173
- Gupta, H., Chaudhari, S., Rai, A., Bhat, S., Sahu, P. K., Hande, M. H., . . . Satyamoorthy, K. (2017). Genetic and epigenetic changes in host ABCB1 influences malaria susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*, 12(4), p. e0175702
- Gutteridge, J., Richmond, R. et Halliwell, B. (1980). Oxygen free-radicals and lipid peroxidation: inhibition by the protein caeruloplasmin. *FEBS Lett.*, 112(2), p. 269-272
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.*, 41(12), p. 1819-1828
- Gutteridge, J. M. C. et Halliwell, B. (1993). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res. communications*, 19(3), p. 141-158
- Hajhashemi, V., Fahmideh, F. et Ghanadian, M. (2018). Antinociceptive effect of methanolic extract and alkaloid fractions of *Berberis integerrima* root in animal models. *Avicenna J Phytomed.*, 8(3), p. 227-236
- Haldar, K., Bhattacharjee, S. et Safeukui, I. (2018). Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat Rev Microbiol.*, 16, p. 156
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual review of nutrition*, 16(1), p. 33-50

- Halliwell, B. (2007). *Biochemistry of oxidative stress* : Portland Press Limited.
- Halliwell, B., Clement, M. V. et Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.*, 486(1), p. 10-13
- Halliwell B et Gutteridge J.M, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine, third edition*. Oxford University Press, England.
- Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine, fifth edition*. Oxford University Press, USA.
- Hammond, B. et Hess, M. L. (1985). The oxygen free radical system: Potential mediator of myocardial injury. *Journal of the American College of Cardiology*, 6(1), p. 215-220
- Han, L., Hudgens, M. G., Emch, M. E., Keeler, C., Emch, M. E., Juliano, J. J., . . . Lievens, M. (2017). RTS,S/AS01 Malaria Vaccine Efficacy is Not Modified by Seasonal Precipitation: Results from a Phase 3 Randomized Controlled Trial in Malawi. *Sci Rep*, 7(1), p. 7200
- Hani, U., Shivakumar, H. G., Osmani, R. A. M., Srivastava, A. et Varma, N. S. K. (2016). Development of a curcumin bioadhesive monolithic tablet for treatment of vaginal candidiasis. *Iran. J. Pharm. Res.*, 15(1), p. 23-34
- Harasym, J. et Oledzki. R. (2014). Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutr.*, 30(5), p. 511-517
- Harber, F. et Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 147(861), p. 332-351
- Harinasuta, T., Bunnag, D. et Wernsdorfer, W. H. (1983). A phase II clinical trial of mefloquine in patients with chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Thailand. *Bull World Health Organ*, 61(2), p. 299-305
- Hauss, D. J. (2007). *Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs* (vol. 170). CRC Press.
- Hawkins, C. L., Brown, B. E. et Davies, M. J. (2001). Hypochlorite-and hypobromite-mediated radical formation and its role in cell lysis. *Arch Biochem Biophys.*, 395(2), p. 137-145
- Hay, S. I., Smith, D. L. et Snow, R. W. (2008). Measuring malaria endemicity from intense to interrupted transmission. *Lancet Infect Dis.*, 8(6), p. 369-378
- Hay, S. I. et Snow, R. W. (2006). The Malaria Atlas Project: developing global maps of malaria risk. *PLoS Med.*, 3(12), p. e473

- Hayashi, Y., Onuki, Y., Kosugi, A., Miura, T. et Takayama, K. (2018). Determining the Influence of Granule Size on Simulation Parameters and Residual Shear Stress Distribution in Tablets by Combining the Finite Element Method into the Design of Experiments. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 66(5), p. 541-547
- He, W., Huang, S., Zhou, C., Cao, L., Yao, J., Zhou, J., . . . Yin, L. (2015). Bilayer Matrix Tablets for Prolonged Actions of Metformin Hydrochloride and Repaglinide. *AAPS PharmSciTech*, 16(2), p. 344-353
- Hickey, E. J., Raje, R. R., Reid, V. E., Gross, S. M. et Ray, S. D. (2001). Diclofenac induced *in vivo* nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Radic Biol Med.*, 31(2), p. 139-152
- Hien, T. T., White, N. J. et White. (1993). Qinghaosu. *Lancet*, 341(8845), p. 603-608
- Hilfinger, J. M. (2009). BCS in Drug Discovery, Development, and Regulation. *Mol. Pharmaceutics*, 6(1), p. 1
- Hirschberg, C., Sun, C. C. et Rantanen, J. (2016). Analytical method development for powder characterization: Visualization of the critical drug loading affecting the processability of a formulation for direct compression. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 128, p. 462-468
- Hoffman, S. L., Billingsley, P. F., James, E., Richman, A., Loyevsky, M., Li, T., . . . Sim, B. K. L. (2010). Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum. Vaccines*, 6(1), p. 97-106
- Hsu, E. (2006). The history of qing hao in the Chinese materia medica. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 100(6), p. 505-508
- Huang, D., Ou, B. et Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), p. 1841-1856
- Huang, G., Drakopoulos, A., Saedtler, M., Zou, H., Meinel, L., Heilmann, J. et Decker, M. (2017). Cytotoxic properties of the alkaloid rutaecarpine and its oligocyclic derivatives and chemical modifications to enhance water-solubility. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27(21), p. 4937-4941
- Huang, G. et Huang, H. (2018). Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system. *J Control. Release*, 278, p. 122-126
- Iqbal, M., Ho, H. L., Petropoulos, S., Moisiadis, V. G., Gibb, W. et Matthews, S. G. (2012). Pro-inflammatory cytokine regulation of P-glycoprotein in the developing blood-brain barrier. *PLoS One*, 7(8), p. e43022

- Itoe, M. A., Sampaio, J. L., Cabal, G. G., Real, E., Zuzarte-Luis, V., March, S., . . . Mota, M. M. (2014). Host Cell Phosphatidylcholine Is a Key Mediator of Malaria Parasite Survival during Liver Stage Infection. *Cell Host Microbe*, 16(6), p. 778-786
- Jian, F., Zhang, Y., Wang, J., Ba, K., Mao, R., Lai, W. et Lin, Y. (2012). Toxicity of Biodegradable Nanoscale Preparations. *Curr Drug Metab*, 13(4), p. 440-446
- Kabir, F., Tow, W. W., Hamauzu, Y., Katayama, S., Tanaka, S. et Nakamura, S. (2015). Antioxidant and cytoprotective activities of extracts prepared from fruit and vegetable wastes and by-products. *Food Chem.*, 167, p. 358-362
- Kaczmarska, K., Grabowska, B., Bobrowski, A. et Cukrowicz, S. (2018). Effects of curing conditions on the structure of sodium carboxymethylstarch/mineral matrix system: FT-IR investigation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 201, p. 236-241
- Kalasz, H. et Antal, I. (2006). Drug Excipients. *Current Med Chem.*, 13(21), p. 2535-2563
- Karbwang, J. et Bangchang, K. N. (1994). Clinical Pharmacokinetics of Halofantrine. *Clin Pharmacokinet*, 27(2), p. 104-119
- Kaul, M., Garden, G. A. et Lipton, S. A. (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*, 410, p. 988
- Kawabata, Y., Wada, K., Nakatani, M., Yamada, S. et Onoue, S. (2011). Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *Int. J. Pharm.*, 420(1), p. 1-10
- Kelley, E. E., Khoo, N. K. H., Hundley, N. J., Malik, U. Z., Freeman, B. A. et Tarpey, M. M. (2010). Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med.*, 48(4), p. 493-498
- Kerns, E. H. et Di, L. (2008a). Chapter 7 - Solubility. Dans E. H. Kerns et L. Di, *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods* (p. 56-85). San Diego : Academic Press.
- Kerns, E. H. et Di, L. (2008b). Chapter 8 - Permeability. Dans E. H. Kerns et L. Di, *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods* (p. 86-99). San Diego : Academic Press.
- Khan, T. et Gurav, P. (2018). PhytoNanotechnology: Enhancing Delivery of Plant Based Anti-cancer Drugs. *Front Pharmacol.*, 8, p. 1002

- Khan, Z., Govender, M., Indermun, S., Kumar, P., Choonara, Y. E., du Toit, L. C., . . . Pillay, V. (2018). *In vitro* and *in vivo* evaluation of an oral Multi-Layered Multi-Disk Tablet for specialized chronotherapeutic drug delivery. *J. Drug Delivery Sci. Technol.*, 45, p. 39-44
- Kim, S. Y., Kwon, O. J. et Park, J.-W. (2001). Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye. *Biochimie*, 83(5), p. 437-444
- Kinsky, N. (1989). Antioxydants function of carotenoides. *Free Rad. Biol. Med*, 7, p. 617
- Kirchner, T., Möller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T. et Behnen, M. (2012). The Impact of Various Reactive Oxygen Species on the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators of Inflamm.*, 2012, p. 849136
- Klatt, P. et Lamas, S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.*, 267(16), p. 4928-4944
- Klaunig, J. E. et Kamendulis, L. M. (2004). The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 44(1), p. 239-267
- Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.*, 77(5), p. 598-625
- Klemba, M., Beatty, W., Gluzman, I. et Goldberg, D. E. (2004a). Trafficking of plasmepsin II to the food vacuole of the malaria parasite; *Plasmodium falciparum*. *J Cell Biol.*, 164(1), p. 47
- Klemba, M., Gluzman, I. et Goldberg, D. E. (2004b). A *Plasmodium falciparum* dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation. *J. Biol. Chem.*, 279(41), p. 43000-43007
- Kline, E. R., Bassit, L., Hernandez-Santiago, B. I., Detorio, M. A., Liang, B., Kleinhenz, D. J., . . . Sutliff, R. L. (2009). Long-Term Exposure to AZT, but not d4T, Increases Endothelial Cell Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Cardiovasc Toxicol.*, 9(1), p. 1-12
- Klonis, N., Creek, D. J. et Tilley, L. (2013). Iron and heme metabolism in *Plasmodium falciparum* and the mechanism of action of artemisinins. *Curr Opin Microbiol.*, 16(6), p. 722-727
- Klonis, N., Crespo-Ortiz, M. P., Bottova, I., Abu-Bakar, N., Kenny, S., Rosenthal, P. J. et Tilley, L. (2011). Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum*

- requires hemoglobin uptake and digestion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108(28), p. 11405-11410
- Kochevar, I. E., Lynch, M. C., Zhuang, S. et Lambert, C. R. (2000). Singlet Oxygen, but not Oxidizing Radicals, Induces Apoptosis in HL-60 Cells. *Photochem. Photobiol.*, 72(4), p. 548-553
- Kohen, R. et Gati, I. (2000). Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicol.*, 148(2), p. 149-157
- Kohler, J. J., Cucoranu, I., Fields, E., Green, E., He, S., Hoying, A., . . . Lewis, W. (2009). Transgenic mitochondrial superoxide dismutase and mitochondrially targeted catalase prevent antiretroviral-induced oxidative stress and cardiomyopathy. *Lab Invest.*, 89, p. 782
- Kojo, S. (2004). Vitamin C: Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress. *Current Med Chem.*, 11(8), p. 1041-1064
- Kolifarhood, G., Mozafar, S. H., Azimi, S., Raeisi, A., Ranjbar, M., Haghdoust, A. A., . . . Kondrashin, A. (2017). Prophylactic efficacy of primaquine for preventing *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia in travelers: A meta-analysis and systematic review. *Travel Med Infect Dis*, 17, p. 5-18
- Konan, K. V., Le Tien, C. et Mateescu, M. A. (2016). Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. *Anal Methods*, 8(28), p. 5638-5644
- Konstat-Korzenny, E., Ascencio-Aragon, J. A., Niezen-Lugo, S. et Vazquez-Lopez, R. (2018). Artemisinin and Its Synthetic Derivatives as a Possible Therapy for Cancer. *Med Sci (Basel)*, 6(1),
- Koppenol, W. H. (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med.*, 25(4), p. 385-391
- Krishna, S., Uhlemann, A.-C. et Haynes, R. K. (2004). Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resist. Updates*, 7(4-5), p. 233-244
- Krishnaiah, Y. S. R. (2010). Pharmaceutical technologies for enhancing oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J. Bioequivalence Bioavailability*, 2(2), p. 028-036
- Kuhlmann, F. M. et Fleckenstein, J. M. (2017). Antiparasitic Agents. Dans *Infectious Diseases (4th Edition)*. p. 1345-1372. Elsevier.
- Kumar, S., Guha, M., Choubey, V., Maity, P. et Bandyopadhyay, U. (2007). Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (β -hematin) formation: A mechanistic update. *Life Sci.*, 80(9), p. 813-828

- Kumar, S. V., Rijo, J. et Sabitha, M. (2018). Guar gum and Eudragit® coated curcumin liquid solid tablets for colon specific drug delivery. *Int J Biol Macromol.*, 110, p. 318-327
- Kushitor, M. K. et Boatemaa, S. (2018). The double burden of disease and the challenge of health access: Evidence from Access, Bottlenecks, Cost and Equity facility survey in Ghana. *PLoS One*, 13(3), p. e0194677
- Lakhdar, R., Denden, S., Kassab, A., Leban, N., Daimi, H., Kahloun, H., . . . Haj Khelil, A. (2012). *Le Stress Oxydatif et la BPCO: Polymorphisme des Glutathion Transférases et Apport de la Phytothérapie Clinique*. In: *International symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM 2012* 997. p. 251-256.
- Lalloo, D. G., Shingadia, D., Bell, D. J., Beeching, N. J., Whitty, C. J. M. et Chiodini, P. L. (2016). UK malaria treatment guidelines 2016. *J Infect.*, 72(6), p. 635-649
- Lambert, C. R. et Kochevar, I. E. (1996). Does rose bengal triplet generate superoxide anion? *J. Am. Chem. Soc.*, 118, p. 3297
- Laroux, F. S., Pavlick, K. P., Hines, I. N., Kawachi, S., Harada, H., Bharwani, S., . . . Grisham, M. B. (2001). Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand*, 173(1), p. 113-118
- Latha, B. et Babu, M. (2001). The involvement of free radicals in burn injury: a review. *Burns*, 27(4), p. 309-317
- Le Tien, C., Lacroix, M., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M.-A. (2003). N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release. *J Control. Release*, 93(1), p. 1-13
- Le, T. C. et Mateescu, M. A. (2017). Two release rates from monolithic carboxymethylstarch tablets: formulation, characterization, and in vitro/in vivo evaluation. *Drug delivery and translational research*, 7(4), p. 516-528
- Le Tien, C., Millette, M., Lacroix, M. et Mateescu, M. A. (2004). Modified alginate matrices for the immobilization of bioactive agents. *Appl Biochem Biotechnol.*, 39(2), p. 189-198
- Le Tien, C., Vachon, C., Mateescu, M. A. et Lacroix, M. (2001). Milk protein coatings prevent oxidative browning of apples and potatoes. *J. Food Sci.*, 66(4), p. 512-516
- Leane, M., Pitt, K. et Reynolds, G. (2015). A proposal for a drug product Manufacturing Classification System (MCS) for oral solid dosage forms. *Pharm. Dev. Technol.*, 20(1), p. 12-21

- Lee, K. S., Kim, B. Y., Kim, H. J., Seo, S. J., Yoon, H. J., Choi, Y. S., . . . Jin, B. R. (2006). Transferrin inhibits stress-induced apoptosis in a beetle. *Free Radic Biol Med.*, 41(7), p. 1151-1161
- Leeuwenberg, A. J. M. (1994). *A revision of Tabernaemontana two: the new world species and Stemmadenia*. Royal Botanic Gardens Kew (London U.K.), 254 p.
- Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P. et Prost, M. (2001). [Oxidative stress and human disease. Current knowledge and perspectives for prevention]. *Presse Med*, 30(21), p. 1076-1081
- Leonard, S. S., Harris, G. K. et Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med.*, 37(12), p. 1921-1942
- Li, C. et Jackson, R. M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 282(2), p. C227-C241
- Li, S.-P., Wang, Y.-W., Qi, S.-L., Zhang, Y.-P., Deng, G., Ding, W.-Z., . . . Wang, C.-H. (2018). Analogous β -Carboline Alkaloids Harmaline and Harmine Ameliorate Scopolamine-Induced Cognition Dysfunction by Attenuating Acetylcholinesterase Activity, Oxidative Stress, and Inflammation in Mice. *Front Pharmacol.*, 9, p. 346
- Li, W., Chen, S., Zhou, G., Li, H., Zhong, L. et Liu, S. (2018). Potential role of cyanidin 3-glucoside (C3G) in diabetic cardiomyopathy in diabetic rats: An *in vivo* approach. *Saudi J Biol Sci.*, 25(3), p. 500-506
- Li, Z.-Q., Tian, S., Gu, H., Wu, Z.-g., Nyagblordzro, M., Feng, G. et He, X. (2018). *In vitro-in vivo* predictive dissolution-permeation-absorption dynamics of highly permeable drug extended-release tablets via drug dissolution/absorption simulating system and pH alteration. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), p. 1882-1893
- Linster, C. L. et Van Schaftingen, E. (2007). Vitamin C. *FEBS J.*, 274(1), p. 1-22
- Liochev, S. I. et Fridovich, I. (2002). The Haber-Weiss cycle-70 years later: an alternative view. *Redox Report*, 7(1), p. 55-57
- Liu, J., Istvan, E. S., Gluzman, I. Y., Gross, J. et Goldberg, D. E. (2006). *Plasmodium falciparum* ensures its amino acid supply with multiple acquisition pathways and redundant proteolytic enzyme systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(23), p. 8840-8845
- Liu, R., Yu, H. et Huang, Y. (2005). Structure and morphology of cellulose in wheat straw. *Cellulose*, 12(1), p. 25-34
- Liu, S., Tian, N., Liu, Z., Huang, J., Li, J. et Ferreira, J. F. S. (2008). Affordable and sensitive determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. by gas

- chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A*, 1190(1), p. 302-306
- Lobmann, K. et Svagan, A. J. (2017). Cellulose nanofibers as excipient for the delivery of poorly soluble drugs. *Int J Pharm.*, 533(1), p. 285-297
- Loeffler, D. A., Connor, J. R., Juneau, P. L., Snyder, B. S., Kanaley, L., DeMaggio, A. J., . . . LeWitt, P. A. (1995). Transferrin and Iron in Normal, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease Brain Regions. *J Neurochem.*, 65(2), p. 710-716
- Lopez-Alarcon, C. et Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta*, 763, p. 1-10
- Lorenzi, H. (1998). *Arvores brasileiras: manual de identificacao e cultivo de plantas arboreas do Brasil*, 2, p.29
- Lupi, F. R., Mancina, V., Baldino, N., Parisi, O. I., Scrivano, L. et Gabriele, D. (2018). Effect of the monostearate/monopalmitate ratio on the oral release of active agents from monoacylglycerol organogels. *Food Funct.*, 9(6), p. 3278-3290
- Mac, D.-O. M. S., Vreden, S. G., Adhin, M. R., Jitan, J. K. et Bretas, G. (2018). Primaquine double dose for 7 days is inferior to single-dose treatment for 14 days in preventing *Plasmodium vivax* recurrent episodes in Suriname. *Infect Drug Resist.*, 11, p. 3-8
- Maderuelo, C., Zarzuelo, A. et Lanao, J. M. (2011). Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *J Control. Release*, 154(1), p. 2-19
- Maroyi, A. (2018). Syzygium Cordatum Hochst. ex Krauss: An Overview of Its Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacological Properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(5), p.
- Martinez, M. N. et Amidon, G. L. (2002). A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: A review of fundamentals. *J. Clin. Pharmacol.*, 42(6), p. 620-643
- McCall, M. R. et Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med.*, 26(7), p. 1034-1053
- McGeer, P. L. et McGeer, E. G. (1998). Mechanisms of cell death in Alzheimer disease- immunopathology. In *Alzheimer's Disease-From Basic Research to Clinical Applications*. H. J. Gertz et T.H. Arendt. Springer Vienna, 159-166 p.

- McGready, R., Lee, S. J., Wiladphaingern, J., Ashley, E. A., Rijken, M. J., Boel, M., . . . Nosten, F. H. (2012). Adverse effects of *falciparum* and *vivax* malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: a population-based study. *Lancet Infect Dis.*, 12(5), p. 388-396
- Merah, A., Abidi, A., Chaffai, N., Bataille, B. et Gherraf, N. (2017). Role of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC 4000) in the protection of the polymorphs of Piroxicam extended release tablets. *Arab. J. Chem.*, 10, p. S1243-S1253
- Meral, A., Tuncel, P., Sürmen-Gür, E., Özbek, R., Öztürk, E. et GÜnay, Ü. (2000). Lipid peroxidation and antioxidant status in β -thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol.*, 17(8), p. 687-693
- Meschini, S., Condello, M., Marra, M., Formisano, G., Federici, E. et Arancia, G. (2007). Autophagy-mediated chemosensitizing effect of the plant alkaloid voacamine on multidrug resistant cells. *Toxicol In Vitro*, 21(2), p. 197-203
- Meschini, S., Marra, M., Calcabrini, A., Federici, E., Galeffi, C. et Arancia, G. (2003). Voacamine, a bisindolic alkaloid from *Peschiera fuchsiaefolia*, enhances the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrug-resistant tumor cells. *Int. J. Oncol.*, 23(6), p. 1505-1513
- Meschini, S., Marra, M., Condello, M., Calcabrini, A., Federici, E., Dupuis, M. L., . . . Arancia, G. (2005). Voacamine, an alkaloid extracted from *Peschiera fuchsiaefolia*, inhibits P-glycoprotein action in multidrug-resistant tumor cells. *International journal of oncology*, 27(6), p. 1597-1603
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. et Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415, p. 673
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. et Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84, p. 407-412
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M. et Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384(3), p. 240-242
- Miller, R. S., Wongsrichanalai, C., Buathong, N., McDaniel, P., Walsh, D. S., Knirsch, C. et Ohrt, C. (2006). Effective treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria with azithromycin-quinine combinations: a randomized, dose-ranging study. *Am J Trop Med Hyg.*, 74(3), p. 401-406

- Miller, W. H. (2002). Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. *Oncologist*, 7(Supplement 1), p. 14-19
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), p. 211-219
- Montagnier, L., Olivier, R. et Pasquier, C. (1997). *Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases*. CRC Press.
- Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortiz-Vázquez, E., . . . Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem.*, 166, p. 17-22
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J. et Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem Soc Rev.*, 40(7), p. 3941-3994
- Morkhade, D. M. (2017). Comparative impact of different binder addition methods, binders and diluents on resulting granule and tablet attributes via high shear wet granulation. *Powder Technol.*, 320, p. 114-124
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C. R., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., . . . Rodríguez, A. (2001). Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science*, 291(5501), p. 141
- Muirhead-Thomson, R. C. (1954). Factors determining the true reservoir of infection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* in a West African village. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 48(3), p. 208-225
- Mulhbachter, J., Ispas-Szabo, P., Lenaerts, V. et Mateescu, M. A. (2001). Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings. *J Control. Release*, 76(1), p. 51-58
- Murphy, D. J. (2017). Alkaloids. Dans B. Thomas, B. G. Murray et D. J. Murphy, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (2nd Ed.)* (p. 118-124). Oxford : Academic Press.
- Mutabingwa, T. K. (2005). Artemisinin-based combination therapies (ACTs): Best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy!. *Acta Trop.*, 95(3), p. 305-315
- Nagalo, K., Dao, F., Minodier, P., Sawadogo, O., Sanon, H., Tall, F. H. et Yé, D. (2014). Le paludisme congénital maladie à *Plasmodium falciparum*: aspects

- épidémiologiques, cliniques, biologiques, thérapeutiques et pronostiques à Ouagadougou, Burkina Faso. *Pan Afr Med J.*, 18, p. 47
- Naidu, K. A. (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J.*, 2(1), p. 7
- Niu, C., Yan, H., Yu, T., Sun, H.-P., Liu, J.-X., Li, X.-S., . . . Chen, S.-J. (1999). Studies on Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia With Arsenic Trioxide: Remission Induction, Follow-Up, and Molecular Monitoring in 11 Newly Diagnosed and 47 Relapsed Acute Promyelocytic Leukemia Patients. *Blood*, 94(10), p. 3315
- Nosten, F. et Brasseur, P. (2002). Combination therapy for malaria. *Drugs*, 62(9), p. 1315-1329
- Nosten, F. et White, N. J. (2007). Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.*, 77(6_Suppl), p. 181-192
- Nyska, A., Dayan, A. et Maronpot, R. R. (2002). New tools in therapeutic research—prostatic cancer and models. *Toxicol Pathol*, 30(2), p. 283-287
- O'Neill, P. M., Barton, V. E. et Ward, S. A. (2010). The molecular mechanism of action of artemisinin - the debate continues. *Molecules*, 15, p. 1705-1721
- Oates, C. G. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends Food Sci Technol.*, 8(11), p. 375-382
- Obata, T., Yamanaka, Y., Kinemuchi, H. et Orelund, L. (2001). Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res*, 906(1), p. 170-175
- Obonyo, C. O. et Juma, E. A. (2012). Clindamycin plus quinine for treating uncomplicated *falciparum* malaria: a systematic review and meta-analysis. *Malar. J.*, 11, p. 2
- Oettl, K. et Stauber, R. E. (2009). Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol.*, 151(5), p. 580-590
- Olotu, A., Fegan, G., Wambua, J., Nyangweso, G., Awuondo, K. O., Leach, A., . . . Peshu, N. (2013). Four-year efficacy of RTS, S/AS01E and its interaction with malaria exposure. *N. Engl. J. Med.*, 368(12), p. 1111-1120
- Olugbile, S., Kulangara, C., Bang, G., Bertholet, S., Suzarte, E., Villard, V., . . . Corradin, G. (2009). Vaccine potentials of an intrinsically unstructured

fragment derived from the blood stage-associated *Plasmodium falciparum* protein PFF0165c. *Infect. Immun.*, 77(12), p. 5701-5709

- OMS. (2016). *Répartition du paludisme*. Dans OMS. (Rapport sur le paludisme dans le monde 2016-Résumé) (WHO/HTM/GMP/2017.4 (résumé)). [Rapport]. OMS. 24 p.
- OMS. (2017a). Announcement: World Malaria Day - April 25, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 66(15), p. 412
- OMS. (2017b). *World malaria report 2017*. Organisation Mondiale de la Santé (Genève). 196 p.
- OMS. (2018a). *History of malaria elimination in the European Region*. (Copenhagen, 20 Avril 2016). Organisation Mondiale de la Santé. Récupéré de http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0003/307272/b_Facsheet-malaria-elimination.pdf
- OMS. (2018b). *Malaria : Overview of malaris elimination*. Organisation Mondiale de la santé (Genève). Récupéré de <http://www.who.int/malaria/areas/elimination/overview/en/>
- OMS. (2018c). *Paludisme : Traitement du paludisme - tour d'horizon*. Organisation Mondiale de la santé (Genève). Récupéré de <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/fr/>
- Onoue, S., Kawamura, K., Igarashi, N., Zhou, Y., Fujikawa, M., Yamada, H., . . . Yamada, S. (2008). Reactive oxygen species assay-based risk assessment of drug-induced phototoxicity: Classification criteria and application to drug candidates. *J Pharm Biomed Anal.*, 47(4), p. 967-972
- Onuki, Y., Kosugi, A., Hamaguchi, M., Marumo, Y., Kumada, S., Hirai, D., . . . Hayashi, Y. (2018). A comparative study of disintegration actions of various disintegrants using Kohonen's self-organizing maps. *J Drug Deliv Sci Technol.*, 43, p. 141-148
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M. et Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49(10), p. 4619-4626
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. et Deemer, E. K. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.*, 50(11), p. 3122-3128

- Ozyurek, M., Güçlü, K. et Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends Analyt Chem.*, 30(4), p. 652-664
- Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr.*, 53(4), p. 1050S-1055S
- Paddon, C. J., Westfall, P. J., Pitera, D. J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., . . . Newman, J. D. (2013). High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature (London, U. K.)*, 496(7446), p. 528-532
- Park, K.-S., Kwon, I.-C. et Park, K.-N. (2011). Oral protein delivery: Current status and future prospect. *React. Funct. Polym.*, 71(3), p. 280-287
- Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E. et Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding¹Edited by I. Tinoco. *J Mol Biol.*, 304(1), p. 55-68
- Patel, R. P., Moellering, D., Murphy-Ullrich, J., Jo, H., Beckman, J. S. et Darley-Usmar, V. M. (2000). Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.*, 28(12), p. 1780-1794
- Pathak, V., Colah, R. et Ghosh, K. (2018). *Plasmodium falciparum* malaria skews globin gene expression balance in in-vitro haematopoietic stem cell culture system: Its implications in malaria associated anemia. *Exp Parasitol.*, 185, p. 29-38
- Pawar, K., Render, D., Rangari, V., Lee, Y. et Babu, R. J. (2018). Evaluation of non-crystalline cellulose as a novel excipient in solid dose products. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, p. 1-8
- Phillips, M. A., Burrows, J. N., Manyando, C., Van Huijsduijnen, R. H., Van Voorhis, W. C. et Wells, T. N. C. (2017). Malaria. *Nat Rev. Dis. Primers*, 3, p. 17050-17074
- Pierce, M. A., Ellis, R. D., Martin, L. B., Malkin, E., Tierney, E., Miura, K., . . . Miller, L. H. (2010). Phase 1 safety and immunogenicity trial of the *Plasmodium falciparum* blood-stage malaria vaccine AMA1-C1/ISA 720 in Australian adults. *Vaccine*, 28(10), p. 2236-2242
- Pinar, N., Çakırca, G., Özgür, T. et Kaplan, M. (2018). The protective effects of alpha lipoic acid on methotrexate induced testis injury in rats. *Biomed Pharmacother.*, 97, p. 1486-1492
- Pinto, C. A., Saripella, K. K., Loka, N. C. et Neau, S. H. (2018). Development and Characterization of Chitosan Cross-Linked With Tripolyphosphate as a

- Sustained Release Agent in Tablets, Part I: Design of Experiments and Optimization. *J Pharm Sci*, 107(4), p. 1063-1075
- Plowe, C. V. (2003). Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *J Exp Biol*, 206(Pt 21), p. 3745-3752
- Poespoprodjo, J. R., Kenangalem, E., Wafom, J., Chandrawati, F., Puspitasari, A. M., Ley, B., . . . Price, R. N. (2018). Therapeutic response to Dihydroartemisinin-Piperaquine for *P. falciparum* and *P. vivax* nine years after its introduction in Southern Papua, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 98(3), p. 677-682
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F. et Chiarotto, E. (2004). Oxidative Stress and Cell Signalling. *Current Med Chem.*, 11(9), p. 1163-1182
- Porter, N. A., Caldwell, S. E. et Mills, K. A. (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30(4), p. 277-290
- Pradel, G., Garapaty, S. et Frevert, U. (2002). Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol. Microbiol.*, 45(3), p. 637-651
- Price, R. N., Uhlemann, A.-C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., . . . Krishna, S. (2004). Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. *Lancet*, 364(9432), p. 438-447
- Prior, R. L. et Cao, G. (2001). *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods- Pryor, William A. Dans *Bio-Assays for Oxidative Stress Status* (p. 39-47). Amsterdam : Elsevier.
- Prior, R. L., Wu, X. et Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53(10), p. 4290-4302
- Pulcini, S., Staines, H. M., Lee, A. H., Shafik, S. H., Bouyer, G., Moore, C. M., . . . Krishna, S. (2015). Mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter, PfCRT, enlarge the parasite's food vacuole and alter drug sensitivities. *Sci. Rep.*, 5, p. 14552
- Rahman, Z., Zidan, A. S., Korang-Yeboah, M., Yang, Y., Siddiqui, A., Shakleya, D., . . . Ashraf, M. (2017). Effects of excipients and curing process on the abuse deterrent properties of directly compressed tablets. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)*, 517(1-2), p. 303-311
- Raitman, I., Huang, M. L., Williams, S. A., Friedman, B., Godula, K. et Schwarzbauer, J. E. (2018). Heparin-fibronectin interactions in the development of extracellular matrix insolubility. *Matrix Biol.*, 67, p. 107-122

- Raj, D. K., Mu, J., Jiang, H., Kabat, J., Singh, S., Sullivan, M., . . . Su, X.-z. (2009). Disruption of a *Plasmodium falciparum* Multidrug Resistance-associated Protein (PfMRP) Alters Its Fitness and Transport of Antimalarial Drugs and Glutathione. *J. Biol. Chem.*, 284(12), p. 7687-7696
- Ramanitrahasimbola, D., Rasoanaivo, P., Ratsimamanga-Urverg, S., Federici, E., Palazzino, G., Galeffi, C. et Nicoletti, M. (2001). Biological activities of the plant-derived bisindole voacamine with reference to malaria. *Phytother. Res.*, 15(1), p. 30-33
- Raschi, E., Vasina, V., Ursino, M. G., Boriani, G., Martoni, A. et De Ponti, F. (2010). Anticancer drugs and cardiotoxicity: Insights and perspectives in the era of targeted therapy. *Pharmacol Ther.*, 125(2), p. 196-218
- Ravanat, J.-L., Di Mascio, P., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G. et Cadet, J. (2000). Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J. Biol. Chem.*, 275(51), p. 40601-40604
- Raza, H., Robin, M.-A., Fang, J.-k. et Avadhani, N. G. (2002). Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J.*, 366(1), p. 45
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. et Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.*, 26(9), p. 1231-1237
- Reed, M. B., Saliba, K. J., Caruana, S. R., Kirk, K. et Cowman, A. F. (2000). Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature (London)*, 403(6772), p. 906-909
- Reyes-Sandoval, A., Berthoud, T., Alder, N., Siani, L., Gilbert, S. C., Nicosia, A., . . . Hill, A. V. S. (2011). Prime-boost immunization with adenoviral and modified vaccinia virus Ankara vectors enhances the durability and polyfunctionality of protective malaria CD8⁺ T-cell responses. [Erratum to document cited in CA152:333006]. *Infect. Immun.*, 79(5), p. 2131
- Rice-Evans, C. A. et Burdon, R. H. (1994). *Free radical damage and its control* (vol. 28). Elsevier.
- Ridley, R. G. (2002). Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature (London, U. K.)*, 415(6872), p. 686-693
- Rieger, J. M., Shah, A. R. et Gidday, J. M. (2002). Ischemia-Reperfusion Injury of Retinal Endothelium by Cyclooxygenase- and Xanthine Oxidase-Derived Superoxide. *Exp Eye Res.*, 74(4), p. 493-501

- Robert, F., Blumenschein, G., Herbst, R. S., Fossella, F. V., Tseng, J., Saleh, M. N. et Needle, M. (2005). Phase I/IIa study of cetuximab with gemcitabine plus carboplatin in patients with chemotherapy-naïve advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 23(36), p. 9089-9096
- Roche, M., Rondeau, P., Singh Nihar, R., Tarnus, E. et Bourdon, E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *Febs Lett.*, 582(13), p. 1783-1787
- Rodrigues, M. R., Rodriguez, D., Russo, M. et Campa, A. (2002). Macrophage Activation Includes High Intracellular Myeloperoxidase Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292(4), p. 869-873
- Rodrigues, S., Cardoso, L., Da Costa, M. A. et Grenha, A. (2015). Biocompatibility and Stability of Polysaccharide Polyelectrolyte Complexes Aimed at Respiratory Delivery. *Materials*, 8(9), p. 5647-5670.
- Rohrbach, P., Sanchez, C. P., Hayton, K., Friedrich, O., Patel, J., Sidhu, A. B. S., . . . Lanzer, M. (2006). Genetic linkage of pfmdr1 with food vacuolar solute import in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.*, 25(13), p. 3000-3011
- Rojas-Rivero, L., Gay, F., Bustos, M. D., Ciceron, L., Pichet, C., Danis, M. et Gentilini, M. (1992). Mefloquine-halofantrine cross-resistance in *Plasmodium falciparum* induced by intermittent mefloquine pressure. *Am J Trop Med Hyg*, 47(3), p. 372-377
- Romi, R., Sabatinelli, G. et Majori, G. (2001). Could malaria reappear in Italy? *Emerg Infect Dis*, 7(6), p. 915-919
- Rosen, H., Klebanoff, S. J., Wang, Y., Brot, N., Heinecke, J. W. et Fu, X. (2009). Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils. *Proc Natl Acad Sci.*, 106(44), p. 18686
- RTS, S. (2011). First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N. Engl. J. Med.*, 365(20), p. 1863-1875
- Sadia, M., Arafat, B., Ahmed, W., Forbes, R. T. et Alhnan, M. A. (2018). Channelled tablets: An innovative approach to accelerating drug release from 3D printed tablets. *J. Controlled Release*, 269, p. 355-363
- Salandova, J., Franc, A., Hofmann, J., Dumicic, A., Kukackova, L., Cervena, T., . . . Vetchy, D. (2018). The effect of the composition of a fixed dose combination on bioequivalence results. *Int. J. Pharm.*, 546(1), p. 235-246
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri José, A. et Saura-Calixto, F. (1999). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 76(2), p. 270-276

- Sanchez, C. P., Dave, A., Stein, W. D. et Lanzer, M. (2010). Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.*, 40(10), p. 1109-1118
- Saravanakumar, G., Jo, D. G. et H. Park. J. (2012). Polysaccharide-Based Nanoparticles: A Versatile Platform for Drug Delivery and Biomedical Imaging. *Current Med Chem.*, 19(19), p. 3212-3229
- Sawyer, D. B., Peng, X., Chen, B., Pentassuglia, L. et Lim, C. C. (2010). Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection? *Prog Cardiovasc Dis.*, 53(2), p. 105-113
- Schafer, F. Q. et Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.*, 30(11), p. 1191-1212
- Schlagenhauf, P., Adamcova, M., Regep, L., Schaerer, M. T., Bansod, S. et Rhein, H.-G. (2011). Use of mefloquine in children - a review of dosage, pharmacokinetics and tolerability data. *Malar J.*, 10(1), p. 292-301
- Schlesinger, P. H., Krogstad, D. J. et Herwaldt, B. L. (1988). Antimalarial agents: Mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32(6), p. 793-798
- Schlitzer, M. (2008). Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)*, 341(3), p. 149-163
- Scott, S. L., Chen, W. J., Bakac, A. et Espenson, J. H. (1993). Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions. *J Phys Chem*, 97(25), p. 6710-6714
- Scurtu, V.-F., Mot, A. C. et Silaghi-Dumitrescu, R. (2013). Protein-based blood substitutes: recent attempts at controlling pro-oxidant reactivity with and beyond hemoglobin. *Pharmaceuticals*, 6, p. 867-880
- Semmani, M. (2018). Brève: Paludisme d'importation : à propos de 59 cas diagnostiqués entre 2015 et 2017. *Option/Bio*, 29(573), p. 6
- Serrano, J., Palmeira, C. M., Kuehl, D. W. et Wallace, K. B. (1999). Cardiospecific and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration. *BBA- Bioenergetics*, 1411(1), p. 201-205
- Sethi, V. K., Thappa, R. K., Dhar, K. L. et Atal, C. K. (1984). Constituents of *Michelia champaca* and Lewis acid catalysed transformations of parthenolide into guaianolides. *Planta Med*, 50(04), p. 364-364

- Shanks, G.D. (2006). Treatment of *falciparum* malaria in the age of drug resistance. *J. Postgrad. Med.*, 52(4), p. 277-280
- Sharma, D., Soni, M., Kumar, S. et Gupta, G. D. (2009). Solubility enhancement - eminent role in poorly soluble drugs. *Res. J. Pharm. Technol.*, 2(2), p. 220-224
- Shazly, G. et Mohsin, K. (2015). Dissolution improvement of solid self-emulsifying drug delivery systems of fenofibrate using an inorganic high surface adsorption material. *Acta Pharm. (Zagreb, Croatia)*, 65(1), p. 29-42
- Shetty, N., Park, H., Zemlyanov, D., Mangal, S., Bhujbal, S. et Zhou, Q. (2018). Influence of excipients on physical and aerosolization stability of spray dried high-dose powder formulations for inhalation. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)*, 544(1), p. 222-234
- Sigala, P. A. et Goldberg, D. E. (2014). The Peculiarities and Paradoxes of *Plasmodium* Heme Metabolism. *Ann Rev Microbiol.*, 68(1), p. 259-278
- Silvie, O., Mazier, D., Rubinstein, E. et Boucheix, C. (2003). CD81: une tétraspanine impliquée dans l'infection par *Plasmodium*. *M/S : Med Sci.*, 19(2), p. 169-171
- Singh, B. et Daneshvar, C. (2013). Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev*, 26(2), p. 165-184
- Singleton, V. L., Orthofer, R. et Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Dans *Methods in Enzymology* (vol. 299, p. 152-178). Academic Press.
- Sirima, S. B., Durier, C., Kara, L., Houard, S., Gansane, A., Loulergue, P., . . . Launay, O. (2017). Safety and immunogenicity of a recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1-DiCo malaria vaccine adjuvanted with GLA-SE or Alhydrogel in European and African adults: A phase 1a/1b, randomized, double-blind multi-centre trial. *Vaccine*, 35(45), p. 6218-6227
- Skinner-Adams, T. S., Lowther, J., Teuscher, F., Stack, C. M., Grembecka, J., Mucha, A., . . . Gardiner, D. L. (2007). Identification of Phosphinate Dipeptide Analog Inhibitors Directed against the *Plasmodium falciparum* M17 Leucine Aminopeptidase as Lead Antimalarial Compounds. *J. Med. Chem.*, 50(24), p. 6024-6031
- Slater, A. F., Swiggard, W. J., Orton, B. R., Flitter, W. D., Goldberg, D. E., Cerami, A. et Henderson, G. B. (1991). An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci.*, 88(2), p. 325

- Slavic, K., Krishna, S., Lahree, A., Bouyer, G., Hanson, K. K., Vera, I., . . . Mota, M. M. (2016). A vacuolar iron-transporter homologue acts as a detoxifier in *Plasmodium*. *Nat. Commun.*, 7, p. 10403
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y. et Hay, S. I. (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434(7030), p. 214-217
- Solaiman, A., Suliman, A. S., Shinde, S., Naz, S. et Elkordy, A. A. (2016). Application of general multilevel factorial design with formulation of fast disintegrating tablets containing croscarelllose sodium and Disintequick MCC-25. *Int J Pharm.*, 501(1), p. 87-95
- Song, Y., Driessens, N., Costa, M., De Deken, X., Detours, V., Corvilain, B., . . . Dumont, J. E. (2007). Roles of Hydrogen Peroxide in Thyroid Physiology and Disease. *J Clin Endocrinol Metab.*, 92(10), p. 3764-3773
- Squadrito, G. L. et Pryor, W. A. (1998). Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med.*, 25(4), p. 392-403
- Stella, L. et Cisse, S. (2007). Use of voacamine and related compounds in the treatment of malaria, and combinations with other agents. US Patent, *WO2007014450A1*
- Stepniewska, K. et White, N. J. (2008). Pharmacokinetic determinants of the window of selection for antimalarial drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52(5), p. 1589-1596
- Stirnemann, G., Kessebohm, K. et Lauterburg, B. (2010). Liver injury caused by drugs: an update. *Swiss Med Wkly*, 140, p. w13080
- Stone, W. J. et Eldering, M. (2013). van GG, Lanke KH, Grignard L, van de Vegte-Bolmer MG, et al. *The relevance and applicability of oocyst prevalence as a read-out for mosquito feeding assays. Sci Rep*, 3, p. 3418
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*, 10, p. 1881-1896
- Strausak, D., Mercer, J. F. B., Dieter, H. H., Stremmel, W. et Multhaup, G. (2001). Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res. Bull.*, 55(2), p. 175-185
- Su, X.-Z. et Miller, L. H. (2015). The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Sci China Life Sci*, 58(11), p. 1175-1179

- Sugiarto, S. R., Moore, B. R., Davis, T. M. E., Moore, B. R. et Makani, J. (2018). Artemisinin Therapy for Malaria in Hemoglobinopathies: A Systematic Review. *Clin Infect Dis*, 66(5), p. 799-804
- Sullivan, D. J., Jr. (2017). Quinolines block every step of malaria heme crystal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 114(29), p. 7483-7485
- Sullivan, D. J., Jr., Gluzman, I. Y., Russell, D. G. et Goldberg, D. E. (1996). On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(21), p. 11865-11870
- Sunkara, D. et Capece, M. (2018). Influence of Material Properties on the Effectiveness of Glidants Used to Improve the Flowability of Cohesive Pharmaceutical Powders. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), p. 1920-1930
- Szychowski, J., Truchon, J.-F. et Bennani, Y. L. (2014). Natural Products in Medicine: Transformational Outcome of Synthetic Chemistry. *J. Med. Chem.*, 57(22), p. 9292-9308
- Tan, K. R., Magill, A. J., Parise, M. E. et Arguin, P. M. (2011). Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. *Am J Trop Med Hyg*, 84(4), p. 517-531
- Taylor, W. R. J. et White, N. J. (2004). Antimalarial Drug Toxicity. *Drug Safety*, 27(1), p. 25-61
- Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sari, R. et Bakan, E. (2002). Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.*, 21(5), p. 200-204
- Ter Kuile, F., White, N. J., Holloway, P., Pasvol, G. et Krishna, S. (1993). *Plasmodium falciparum*: *in vitro* studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. *Exp. Parasitol.*, 76(1), p. 85-95
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. et Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal.*, 19(6), p. 669-675
- Thoorens, G., Krier, F., Leclercq, B., Carlin, B. et Evrard, B. (2014). Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment-A review. *Int J Pharm.*, 473(1), p. 64-72
- Tilley, L., Straimer, J., Gnädig, N. F., Ralph, S. A. et Fidock, D. A. (2016). Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.*, 32(9), p. 682-696

- Tsang, W. P., Chau, S. P. Y., Kong, S. K., Fung, K. P., et Kwok, T. T. (2003). Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci.*, 73(16), p. 2047-2058
- Tu, Y. (2011). The discovery of artemisinin (*qinghaosu*) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med. (N. Y., NY, U. S.)*, 17(10), p. 1217-1220
- Turato, C., Balasso, A., Carloni, V., Tiribelli, C., Mastrotto, F., Mazzocca, A. et Pontisso, P. (2017). New molecular targets for functionalized nanosized drug delivery systems in personalized therapy for hepatocellular carcinoma. *J. Controlled Release*, 268, p. 184-197
- Turkmen, O., Ay Şenyigit, Z. et Baloglu, E. (2018). Formulation and evaluation of fexofenadine hydrochloride orally disintegrating tablets for pediatric use. *J Drug Deliv Sci Technol.*, 43, p. 201-210
- Ubaid, M. et Murtaza, G. (2018). Fabrication and characterization of genipin cross-linked chitosan/gelatin hydrogel for pH-sensitive, oral delivery of metformin with an application of response surface methodology. *Int. J. Biol. Macromol.*, 114, p. 1174-1185
- Valderramos, S. G. et Fidock, D. A. (2006). Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharmacol. Sci.*, 27(11), p. 594-601
- Valdez, L. B., Lores Arnaiz, S., Bustamante, J., Alvarez, S., Costa, L. E. et Boveris, A. (2000). Free radical chemistry in biological systems. *Biol Res*, 33(2), p. 65-70
- Valenza, A., Bonfanti, C., Pasini, M. E. et Bellosta, P. (2018). Anthocyanins Function as Anti-Inflammatory Agents in a Drosophila Model for Adipose Tissue Macrophage Infiltration. *Biomed Res Int*, 2018, p. 6413172-6413181
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. et Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.*, 266(1), p. 37-56
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. et Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 39(1), p. 44-84
- Vallone, A., D'Alessandro, S., Brogi, S., Brindisi, M., Chemi, G., Alfano, G., . . . Butini, S. (2018). Antimalarial agents against both sexual and asexual parasites stages: structure-activity relationships and biological studies of the Malaria Box compound 1-[5-(4-bromo-2-chlorophenyl)furan-2-yl]-N-[(piperidin-4-yl)methyl] methanamine (MMV019918) and analogues. *Eur. J. Med. Chem.*, 150, p. 698-718

- Veiga, M. I., Dhingra, S. K., Henrich, P. P., Straimer, J., Gnadig, N., Uhlemann, A.-C., . . . Fidock, D. A. (2016). Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nat. Commun.*, 7, p. 11553
- Venkatasubramanian, L. et Maruthamuthu, P. (1989). Kinetics and mechanism of formation and decay of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazole-6-sulphonate) radical cation in aqueous solution by inorganic peroxides. *Int J Chem Kinet.*, 21(6), p. 399-421
- Von Seidlein, L., Duraisingh, M. T., Drakeley, C. J., Bailey, R., Greenwood, B. M. et Pinder, M. (1997). Polymorphism of the Pfmdr1 gene and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in the Gambia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 91(4), p. 450-453
- Wagle, P. M. et Seal, S. C. (1953). Application of DDT, BHC, and cyanogas in the control of plague in India. *Bull World Health Organ*, 9(5), p. 597-614
- Wang, J., Wen, H. et Desai, D. (2010). Lubrication in tablet formulations. *Eur J Pharm Biopharm.*, 75(1), p. 1-15
- Wang, Y.-J., Truong, V.-D. et Wang, L. (2003). Structures and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis. *Carbohydr. Polym.*, 52(3), p. 327-333
- Warhurst, D. C. (1986). Antimalarial drugs: mode of action and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 18(Suppl. B), p. 51-59
- Wei, S., Ma, Y., Luo, J., He, X., Yue, P., Guan, Z. et Yang, M. (2017). Hydroxypropylcellulose as matrix carrier for novel cage-like microparticles prepared by spray-freeze-drying technology. *Carbohydr. Polym.*, 157, p. 953-961
- White, N. J. (2008). *Qinghaosu* (Artemisinin): The Price of Success. *Science (Washington, DC, U. S.)*, 320(5874), p. 330-334
- White, N. J., Hien, T. T. et Nosten, F. H. (2015). A Brief History of *Qinghaosu*. *Trends Parasitol*, 31(12), p. 607-610
- White, N. J., Nosten, F., Looareesuwan, S., Watkins, W. M., Marsh, K., Snow, R. W., . . . Olliaro, P. (1999). Averting a malaria disaster. *Lancet*, 353(9168), p. 1965-1967
- White, N. J. et Olliaro, P. L. (1996). Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: rationale for combination chemotherapy for malaria. *Parasitol Today*, 12(10), p. 399-401

- White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A. et Dondorp, A. M. (2014). Malaria. *Lancet*, 383(9918), p. 723-735
- Wikipedia. (2018). Dans *Wikipédia l'encyclopédie libre : paludisme* Récupéré de <https://fr.wikipedia.org/wiki/Paludisme>
- Willcox, J. K., Ash, S. L. et Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44(4), p. 275-295
- Wilson, C. M., Serrano, A. E., Wasley, A., Bogenschutz, M. P., Shankar, A. H. et Wirth, D. F. (1989). Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science (Washington, D. C., 1883-)*, 244(4909), p. 1184-1186
- Winter, J., Ilbert, M., Graf, P. C. F., Ozcelik, D. et Jakob, U. (2008). Bleach Activates a Redox-Regulated Chaperone by Oxidative Protein Unfolding. *Cell*, 135(4), p. 691-701
- Winterbourn, C. C. et Brennan, S. O. (1997). Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem J.*, 326(1), p. 87
- Woodward, R. B. et Doering, W. E. (1944). Total synthesis of quinine. *J. Am. Chem. Soc.*, 66, p. 849
- Wormser, U., Sintov, A., Brodsky, B. et Nyska, A. (2000). Topical Iodine Preparation as Therapy against Sulfur Mustard-Induced Skin Lesions. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 169(1), p. 33-39
- Wunderlich, J., Rohrbach, P. et Dalton, J. P. (2012). The malaria digestive vacuole. *Front. Biosci., Scholar Ed.*, 54(4), p. 1424-1448
- Xie, S. C., Dogovski, C., Hanssen, E., Chiu, F., Yang, T., Crespo, M. P., . . . Tilley, L. (2016). Haemoglobin degradation underpins the sensitivity of early ring stage *Plasmodium falciparum* to artemisinins. *J. Cell Sci.*, 129(2), p. 406-416
- Yang, D., Luo, W., Wang, J., Zheng, M., Liao, X.-H., Zhang, N., . . . Lu, K. P. (2018). A novel controlled release formulation of the Pin1 inhibitor ATRA to improve liver cancer therapy by simultaneously blocking multiple cancer pathways. *J. Control. Release*, 269, p. 405-422
- Yang, G.-G., Kim, D., Pham, A. et Paul, C. J. (2018). A Meta-Regression Analysis of the Effectiveness of Mosquito Nets for Malaria Control: The Value of Long-Lasting Insecticide Nets. *Int J Environ Res Public Health*, 15(3), p. 546-557

- Yu, L. X., Amidon, G. L., Polli, J. E., Zhao, H., Mehta, M. U., Conner, D. P., . . . Hussain, A. S. (2002). Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. *Pharm. Res.*, 19(7), p. 921-925
- Zaheer, K. et Langguth, P. (2018). Formulation strategy towards minimizing viscosity mediated negative food effect on disintegration and dissolution of immediate release tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 44(3), p. 444-451
- Zelko, I. N., Mariani, T. J. et Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.*, 33(3), p. 337-349
- Zhang, X., He, S. Z., Chen, Z. M., Zhao, Y. et Hua, W. (2012). Methyl hydroperoxide (CH₃OOH) in urban, suburban and rural atmosphere: ambient concentration, budget, and contribution to the atmospheric oxidizing capacity. *Atmos. Chem. Phys.*, 12(19), p. 8951-8962
- Zhou, L.-J., Xia, J., Wei, H.-X., Peng, H.-J. et Liu, X.-J. (2017). Risk of drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria therapy-a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res*, 116(2), p. 781-788
- Zocoler, M. A., de Oliveira, A. J. B., Sarragiotto, M. H., Grzesiuk, V. L. et Vidotti, G. J. (2005). Qualitative determination of indole alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Apocynaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 16(6B), p. 1372-1377
- Zweier, J. L. et Villamena, F. A. (2003). Chemistry of free radicals in biological systems Kukin M.L. Fuster V. Oxidative stress and cardiac failure, *Futura Publishing Company, Inc. (Armonk, NY)*, 5, p. 67-95.