

Université de Montréal

Département de chimie, Faculté des arts et des sciences

Ce mémoire intitulé

Développement d'une méthode de quantification de dérivés de type biguanide dans les liquides biologiques et tissus par spectrométrie de masse LC-MS et MALDI-TOF

Présenté par

Samy Faraj

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Karen Waldron

Présidente-rapporteuse

Andreea-Ruxandra Schmitzer

Directrice de recherche

Pierre Chaurand

Membre du jury

Université de Montréal

Développement d'une méthode de quantification de dérivés de type biguanide dans les liquides biologiques et tissus par spectrométrie de masse LC-MS et MALDI-TOF

Par

Samy Faraj

Département de chimie, Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade maîtrise ès science (M. Sc)

en chimie

Août 2022

© Samy Faraj, 2022

Résumé

Le taux de mortalité dû au cancer est en hausse d'année en année. Le cancer du pancréas est l'un des plus mortels. Avec un taux de survie inférieur à 20% un an suivant le diagnostic, il y a une urgence pour développer de nouvelles molécules pour cibler cette maladie. La metformine, un biguanide utilisé cliniquement en tant qu'agent antidiabétique, s'est avérée à avoir des propriétés anticancéreuses. Les patients souffrant de diabète de type 2 prenant la metformine comme traitement sont moins à risque de développer plusieurs cancers dont celui du pancréas. Cependant, la metformine n'étant pas biodisponible, les doses à administrer seraient trop élevées pour la considérer comme thérapie anticancéreuse. Le groupe de recherche Schmitzer a synthétisé de nouveaux analogues de type biguanide plus lipophiles dans le but d'améliorer leur biodisponibilité. Le phényléthynylbenzyle biguanide (PEBB) est un des analogues présentant des propriétés antiprolifératives environ 800 fois plus puissantes que la metformine contre des cellules du cancer du pancréas. L'hexylbiguanide s'est aussi démarqué par sa spécificité pour les cellules cancéreuses et sa faible toxicité pour les cellules saines.

Étant de bons candidats, des études *in vivo* ont été faites sur des souris en leur administrant le PEBB et l'hexylbiguanide afin d'obtenir des informations sur l'absorption et la distribution des composés. Pour ce faire, une méthode par LC-MS en mode *multiple reaction monitoring* (MRM) a été développée afin de quantifier différents analogues de biguanides dans le plasma de souris. De plus, une méthode par MALDI-TOF a été développée afin de localiser et quantifier les analogues dans les tissus par imagerie couplée à la spectrométrie de masse (IMS). Les expériences réalisées ont permis de suivre les composés dans le plasma et d'établir une cinétique d'absorption révélant que le PEBB atteint sa concentration plasmatique maximale environ à 1h après l'administration et que le composé est éliminé de la circulation sanguine à 80% au bout de 4h. Dans le cas de l'hexylbiguanide, la concentration plasmatique maximale est atteinte environ 30 minutes après l'administration pour être éliminé à plus de 90% après 4h. De plus, les études d'IMS ont révélé que le PEBB se distribue principalement dans le foie et légèrement dans les tumeurs. Aucune accumulation à long terme dans le foie n'a été observée, ce qui signifie que les risques de dommages hépatiques sont faibles. Les deux méthodes développées sont des méthodes puissantes

et reproductibles afin de quantifier les différents types de biguanides dans les liquides biologiques ainsi que dans les tissus.

Mots-clefs : Biguanide, cancer du pancréas, LC-MS, MALDI-TOF, IMS

Abstract

The death rate of cancer is increasing every year. Pancreatic cancer is one of the deadliest. With a survival rate of less than 20% one year post diagnosis, there is an emergency to develop new molecules to target this disease. Metformin, a biguanide clinically used as an antidiabetic agent, has been shown to have anticancer properties as well. Patients with type 2 diabetes taking metformin are less likely to develop several cancers including pancreatic cancer. However, due to the poor bioavailability of metformin, the doses would be too high to consider it as an anticancer treatment. The Schmitzer group has synthesized new biguanide analogues that are more lipophilic and thus more bioavailable. Phenylethynylbenzyl biguanide (PEBB) is one of the analogues with about 800 times more effective antiproliferative properties than metformin against pancreatic cancer cells. Hexylbiguanide also stood out for its specificity for cancer cells and its low toxicity for normal cells.

In vivo studies were performed on mice by administering PEBB and hexylbiguanide to study the absorption and distribution of the compounds. For this aim, a LC-MS method was developed using Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode to quantify different biguanide analogues in mice plasma. Complementarily, a MALDI-TOF method was developed to localize and quantify the analogues in tissues by imaging coupled to mass spectrometry (IMS). The experiments performed allowed to follow the compounds in plasma to establish absorption kinetics. These experiments revealed that PEBB reaches its maximum plasma concentration at 1h after administration and the compound is eliminated from the bloodstream at 80% after 6h. For hexylbiguanide, the maximum plasma concentration is reached about 30 minutes after administration and more than 90% is eliminated after 4 hours. In addition, IMS studies have shown that PEBB is distributed mainly in the liver and slightly in tumors. No accumulation in the liver was observed, which suggests that the risk of liver damage is low. These two methods are powerful and reproducible methods to quantify the different types of biguanides in biological fluids and tissues.

Keywords: Biguanide, pancreatic cancer, LC-MS, MALDI-TOF, IMS

Table des matières

Résumé	III
Abstract	V
Table des matières	VI
Liste des tableaux	IX
Liste des figures	X
Liste des sigles et abréviations	XII
Remerciements	XVI
Chapitre 1 – Introduction	1
1. Introduction générale.....	1
1.1 Le cancer	1
1.1.2 Le pancréas.....	2
1.1.3 Le cancer du pancréas	3
1.1.4 Thérapies actuelles	4
1.2 Les biguanides.....	7
1.2.1 Mécanisme d’action des biguanides comme anticancéreux.....	8
1.2.2 Les analogues de biguanide.....	12
1.3 Pharmacocinétique des médicaments.....	13
1.3.1 Absorption du médicament	13
1.3.1.1 Variation cinétique de l’absorption.....	15
1.3.2 La distribution du médicament.....	17
1.3.3 Le métabolisme et la biotransformation du médicament	18
1.3.4 L’excrétion du médicament.....	20
1.4 Objectifs du projet.....	22

Chapitre 2 - Quantification de dérivés de type biguanide dans les liquides biologiques par LC-MS	23
2.1 Mise en contexte.....	23
2.1.1 La nébulisation électrostatique.....	23
2.1.2 Le triple quadripôle	24
2.2 Profil d'ionisation des dérivés de type biguanide	25
2.3 Quantification des dérivés de type biguanide dans le plasma.....	27
2.3.1 Courbes d'étalonnage.....	28
2.3.2 Cinétique du PEBB et de l'hexylbiguanide dans les souris	29
2.3.3 Quantification des dérivés de type biguanide en tant qu'agent anticancéreux.....	34
2.4 Partie expérimentale.....	42
2.4.1 Expériences sur les souris	42
2.4.2 Préparation des échantillons de plasma de souris	43
2.4.3 Purification des échantillons contaminés par le PEG.....	43
2.4.4 Conditions de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse pour la quantification des biguanides	44
Chapitre 3 - Quantification et imagerie de dérivés de type biguanide dans les tissus par MALDI-TOF-MS	45
3.1 Mise en contexte.....	45
3.1.1 Mécanisme d'ionisation	45
3.1.2 L'analyseur par temps de vol	47
3.1.3 L'imagerie assistée par la spectrométrie de masse (IMS).....	48
3.2 Développement et optimisation de la méthode	49
3.2.1 La matrice et la détection des analogues de type biguanide	49
3.2.2 La courbe d'étalonnage	55
3.3 Quantification et cinétique de distribution du PEBB dans le foie.....	57

3.4	Quantification et localisation du PEBB et de la phenformine dans les tumeurs PDAC	61
3.5	Partie expérimentale	63
3.5.1	Préparation des homogénats de foies de souris	63
3.5.2	Préparation de coupes de tissus biologiques	64
3.5.3	Application de la matrice	64
3.5.4	Imagerie par MALDI-TOF-MS	65
Chapitre 4	- Conclusion et perspectives	66
4.1	Conclusion	66
4.2	Perspectives	67
Références	I
Annexes	I
A-1	Exemple de calculs	I
	Calcul de la constante d'absorption et l'incertitude sur la mesure	I
	Calcul de la constante d'élimination et l'incertitude sur la mesure	II
	Calcul du volume de distribution et son incertitude	III
	Calcul de la clairance et de son incertitude	IV
	Calcul de la concentration de PEBB dans les tissus et son incertitude	V

Liste des tableaux

Tableau I.	Valeur des contrôles qualité (CQ) ainsi que du pourcentage d'erreur sur les mesures par LC-MRM à partir d'une solution de PEBB à 50 ng/mL.....	31
Tableau II.	Paramètres pharmacocinétiques du PEBB et de l'hexylbiguanide dans les souris.....	32
Tableau III.	Valeurs des contrôles qualité (CQ) ainsi que le pourcentage d'erreur sur les mesures mesurées par LC-MRM à partir d'une solution PEBB de 2000 ng/ml.	40
Tableau IV.	Condition d'application de la matrice CHCA par nébulisation pneumatique selon la composition du solvant.....	52
Tableau V.	Conditions optimisées d'application de matrice CHCA pour l'analyse des biguanides dans les tissus biologiques par MALDI-IMS.....	54
Tableau VI.	Limites de détection du PEBB et de la phenformine par MALDI-TOF-MS.	55

Liste des figures

Figure 1	Schéma anatomique du système pancréatique et son environnement.....	3
Figure 2	Schéma des différents traitements selon le stade du cancer du pancréas.....	6
Figure 3	Structures générales des biguanides ainsi que plusieurs analogues de type biguanide.....	7
Figure 4	Mécanisme d'action proposé de la metformine comme agent anticancéreux.....	9
Figure 5	Mécanisme d'action indirect et direct de la metformine en tant qu'agent anticancéreux.	11
Figure 6	Structure des sels phényléthynylbenzyle biguanidium (PEBB) et de l'hexylbiguanidium	13
Figure 7	Schéma simplifié du système digestif montrant les différentes étapes pour l'absorption d'un médicament de l'ingestion jusqu'à l'absorption par des transporteurs apicaux.	14
Figure 8	Graphique type de la concentration plasmatique d'un médicament en fonction du temps.	15
Figure 9	Représentation schématique de l'ionisation par nébulisation électrostatique.	24
Figure 10	Schéma expérimental de la méthode d'analyse par LC-MS en mode MRM.....	25
Figure 11	Patron de fragmentation des dérivés biguanidium en solution par LC-MRM.	26
Figure 12	Courbes d'étalonnage du PEBB (A) dans l'acétonitrile et (B) dans le plasma de souris.	28
Figure 13	Chromatogrammes des ions extraits par analyses MRM pour (A) l'analyse du PEBB et (B) pour l'analyse de l'hexylbiguanide dans le plasma de souris.	29
Figure 14	Courbe d'étalonnage dans le plasma pour la quantification de l'hexylbiguanide (A) et du PEBB (B).....	30
Figure 15	Concentrations plasmatiques du PEBB et de l'hexylbiguanide en fonction du temps après l'administration d'une dose unique.....	32
Figure 16	Courbe d'étalonnage dans le plasma de souris pour la quantification de la phenformine.	35
Figure 17	Chromatogramme d'ion extrait type de la phenformine.	36
Figure 18	Exemple de chromatogramme où l'échantillon est contaminé (noir).	37
Figure 19	Spectre de masse LC-TOF d'un échantillon contaminé par rapport à un échantillon de référence.....	38

Figure 20	Chromatogramme d'un échantillon de plasma dopé à l'hexylbiguanide ($m/z = 186$) avant purification (vert) et après purification (noir).....	39
Figure 21	Courbe d'étalonnage pour la quantification de l'hexylbiguanide dans le plasma des souris.....	40
Figure 22	Concentration plasmatique moyenne des souris traitées avec les dérivés de type biguanide 90 minutes après la dernière injection.	41
Figure 23	Schéma du principe d'ionisation d'un analyte par MALDI.	46
Figure 24	Schéma d'un analyseur à temps de vol (TOF).	48
Figure 25	Processus pour l'analyse tissulaires minces par MALDI IMS.....	49
Figure 26	Intensité de différents biguanides selon le type de matrice employée.	50
Figure 27	Spectre de masse par MALDI-TOF des solutions standards (A) du PEBB ($m/z = 292$) et (B) de la phenformine ($m/z = 206$)	51
Figure 28	Délocalisation des biguanides en fonction du débit de matrice appliqué.	52
Figure 29	Optimisation de la quantité de matrice pour l'analyse de PEBB par MALDI-IMS.	53
Figure 30	Courbe d'étalonnage du PEBB.	56
Figure 31	MALDI IMS de foie de souris traitées au PEBB en fonction du temps post administration.....	57
Figure 32	Spectres de masse montrant la présence de PEBB ($m/z = 292$) dans les tissus adipeux selon le temps.	59
Figure 33	MALDI IMS de tissus musculaires de souris traitées au PEBB en fonction du temps après l'administration.	60
Figure 34	Imagerie MALDI IMS de sections tumorales après traitement par de la phenformine et contrôle montrant la présence d'un interférent à $m/z 206$	61
Figure 35	MALDI IMS des tumeurs de type PDAC après 13 jours de traitement au PEBB ($m/z = 292$).....	62
Figure 36	Méthode employant un tissu mimétique dope pour l'établissement d'une courbe d'étalonnage par MALDI-IMS.....	68

Liste des sigles et abréviations

ACS : Société Américaine du Cancer (*American Cancer Society*)

ADME : Administration, Distribution, Métabolisme, Excrétion

AMPK : Protéine Kinase Activée par l'AMP (*AMP-Activated Protein Kinase*)

ATP : Adénosine Triphosphate

CA19-9 : Antigène du carbohydrate 19-9 (*Carbohydrate Antigene 19-9*)

CHCA : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (*α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*)

CL : Clairance

CMC : Carboxyméthylcellulose

C_{max} : Concentration plasmatique maximale

COVID-19 : Maladie du coronavirus apparue en 2019

C_p : Concentration plasmatique

CQ : Contrôle qualité

CYP : Cytochrome P450

D : Dose administrée

dA/dt : Vitesse d'absorption d'un médicament

dE/dt : Vitesse d'élimination d'un médicament

DHB : Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (*2,5-dihydroxybenzoic Acid*)

DL : Dose létale

EtOH : Éthanol

ÉI : Étalon Interne

FDA : Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration*)

GLUT-1 : Transporteur de glucose de type 1

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Pression (*High Pressure Liquid Chromatography*)

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane (*Concentration leading to 50% inhibition of response*)

IMS : Imagerie par spectrométrie de masse (*Imaging Mass Spectrometry*)

IIP : Pneumopathie Interstitielle Diffuse Idiopathique (*Idiopathic interstitial pneumonias*)

ITO : Oxyde d'indium-étain (*Indium-Tin Oxide*)

k_a : Constante d'absorption
 k_e : Constante d'élimination
KP4 : lignée cellulaire du cancer du pancréas
LC-MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)
MALDI : Désorption/Ionisation assisté par matrice (*Matrix assisted Laser Desorption/Ionization*)
MeOH : Méthanol
MRM : Suivi de réactions multiples (*Multiple reaction monitoring*)
MS : spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*)
MTB : 2-Mercaptobenzothiazole
mTOR : Cible de la rapamycine chez les mammifères (*mammalian Target of Rapamycin*)
 m/z : Ratio masse sur charge
NAD⁺: Nicotinamide adénine dinucléotide (oxydé)
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide (réduit)
OAT : Transporteur d'anions organiques (*Organic Anions Transporter*)
OCT-1 : Transporteur de cations organiques de type 1 (*Type 1 Organic Cations Transporter*)
OCT-2 : Transporteur de cations organiques de type 2 (*Type 2 Organic Cations Transporter*)
OCT-3 : Transporteur de cations organique de type 3 (*Type 3 Organic Cations Transporter*)
PCR : Amplification en chaine par polymérisation (*Polymerase Chain Reaction*)
PDAC : Adénocarcinome ductal pancréatique (*Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*)
PEB : Phényléthynylbenzène
PEBB : Phényléthynylbenzyle biguanide
PEG : Polyéthylène glycol
pH : potentiel hydrogène
Q : Quadripôle
QqQ : Triple quadripôle
rpm : Révolutions par minute
S/N : Ratio signal sur bruit
 $t_{1/2a}$: période biologique
 $t_{1/2}$: temps de demi-vie

t_{\max} : temps pour atteindre la concentration maximale

TIC : courant ionique totale (*Total Ion Current*)

TOF : temps de vol (*Time of Flight*)

V_d : Volume de distribution

À grand-père, grand-mère et Paule

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Andreea Schmitzer, de m'avoir accepté dans son groupe de recherche. J'aimerais te remercier surtout pour m'avoir laissé la chance la première fois en tant que stagiaire quand tu n'avais aucune idée de qui j'étais. Mon parcours depuis le début dans ton groupe m'a permis de toucher à plusieurs domaines et de réaliser à quel point j'aime la recherche! Merci pour tous les beaux moments de groupe que tu nous as organisé et pour les belles valeurs que tu transmets à tous ceux qui ont la chance de passer dans ton groupe. Je te suis très reconnaissant pour tout ça et je pense avoir un meilleur esprit scientifique grâce à toi.

Évidemment, je ne pourrais pas faire de remerciements sans penser aux membres du labo qui ont contribué à faire en sorte qu'une ambiance extraordinaire soit toujours présente! Merci à Julie pour ta belle énergie, pour toutes les soirées où on fait un apéro dans la *drinking room* ou ailleurs! Impossible d'être de mauvaise humeur avec toi, tu trouves toujours le moyen de voir le positif et de le transmettre! Merci à mon partenaire de marche, Philippe, avec qui je peux parler de n'importe quoi et qui sait m'écouter et m'endure à la longueur de journée! *Shout-out* à toutes tes blagues hilarantes qui nous font tous passer de meilleure journée. Sigrid, merci pour toutes les pauses-café et discussion plaisantes qu'on a autant au niveau scientifique que personnel! Je t'enverrai des audios ASMR quand je serai parti pour que tu ne vois pas la différence! Que dire de la meilleure porteuse d'eau du groupe, Maude! Je garde de beaux souvenirs des moments passés ensemble à déconner et s'agacer! Ensuite, merci Julien, qui apporte toujours de multiples réflexions au sein du groupe avec ses grandes questions philosophiques qui font rire! Merci à Margaux pour toutes les discussions plaisantes qu'on a pu avoir à propos de tout et de rien. Même si vous êtes loin et qu'on vous voit moins souvent, je ne peux pas vous oublier, Pierre et Guillaume, avec qui il est toujours possible de rire et déconner! Merci au passage Guillaume pour m'avoir encadré et formé quand j'étais stagiaire! Je garde de beaux souvenirs de cet été où j'ai beaucoup appris grâce à toi! Merci également à Alexe qui m'a appris les bases du MALDI quand j'étais stagiaire. Je garde aussi un beau souvenir de mon premier stage en partie grâce à toi! J'aimerais terminer en remerciant tous les stagiaires qui ont passé dans le groupe, particulièrement Ellie. J'ai appris à connaître ta belle personnalité qui était à la fois si généreuse et drôle! J'ai réellement apprécié ton passage dans le groupe!

J'aimerais également remercier Coco du groupe Collins, Cécile de chez nos voisins Cecioni et Kiana du groupe Pelletier pour tous les beaux moments qu'on a passés ensemble!

J'aimerais également remercier le professeur Pierre Chaurand, sans qui, les expériences de MALDI-TOF n'auraient pas été possibles. Merci de m'avoir accueilli dans votre groupe et de me permettre de découvrir le monde de l'imagerie par MS. Ce fut un très bel apprentissage pour moi et mon projet n'aurait pas pu aboutir sans votre aide. De plus, j'aimerais remercier tous les membres du laboratoire, en particulier Rachel qui m'a grandement aidé dans le projet. Merci pour tous les conseils, les discussions et l'aide apportée pour le projet. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ton doctorat!

Je veux aussi remercier l'équipe du centre régional de spectrométrie de masse pour leur aide face à mon projet. Un merci particulier à Louiza et Alexandra qui m'ont conseillé et qui m'ont grandement aidé dans mon projet. Merci pour la patience et toutes les formations que vous m'avez accordées afin de faire en sorte que je sois autonome et que mes connaissances en matière de chimie analytique soient meilleures. Sans vous, mon projet n'aurait pas aussi bien été et je vous en suis très reconnaissant!

J'aimerais remercier tous mes amis d'enfance qui m'ont supporté dans tous les moments que j'ai pu vivre ces dernières années. Particulièrement à Didier, Sam et Rox! Merci pour tous les beaux moments passés ensemble! Merci à Phil et Jess, mes deux optométristes prefs, avec qui j'ai tellement passé de belles soirées à étudier ou à jouer à des jeux et rire aux éclats!

J'aimerais aussi remercier Roxana pour tout, pour le support moral et pour m'endurer dans toutes les conneries que je peux faire et dire en une journée! Merci beaucoup aussi de m'accompagner en Nouvelle-Zélande, ça va être un beau voyage qu'on mérite bien!

Que dire de Gab, Mushou et Richy! Une chance que vous êtes là! Comment oublier tout le support que vous m'avez donné durant ma maîtrise. Que ce soit pour les conseils, pour la rédaction ou juste pour le support moral. Vous trouvez toujours la façon pour me faire rire et ce peu importe la situation. En même temps, ce n'est pas comme si on n'avait pas l'énergie cosmique qui nous met toujours dans des situations pas possibles! Même si on ne se voit pas souvent, nos appels sont tellement plaisants à chaque fois, mais peut-être moins pour ceux dans l'épicerie! D'autant plus quand on se rappelle qu'il nous manque du lait! Continuez de m'envoyer des photos aussi comiques! Let's go Nancy, on se revoit autour d'un bon brie! Bref, merci pour tout et merci d'être mon âme-sœur spirituel! Je vous souhaite que le malin se tienne loin de vous. À quand la prochaine glace?

Chapitre 1 – Introduction

1. Introduction générale

1.1 Le cancer

Le cancer est une maladie grave qui touche des millions de gens à travers le monde. En effet, on estime qu'en 2021, environ 19,3 millions de nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués et 9,9 millions de décès sont comptés.¹ Cette maladie est un fléau dans tous les pays industrialisés et en émergence dans les pays en développement et en voie de développement. La société américaine sur le cancer (ACS) estime qu'en 2022 environ 609 360 personnes décéderont d'un cancer au États-Unis seulement, ce qui se traduit par environ 1700 décès par jour.² Étant la principale cause de décès dans la plupart des pays, il est vrai de dire que le cancer est une crise mondiale de notre époque.^{1, 3} C'est pourquoi plusieurs chercheurs se concentrent sur la compréhension de cette maladie afin de pouvoir trouver des nouvelles voies thérapeutiques.

La plupart des cancers débutent avec une ou plusieurs dysfonctions génétiques au sein des cellules, comme une mutation. Plusieurs études ont permis de comprendre certains mécanismes qui dérèglent l'homéostasie des cellules et qui sont à l'origine de plusieurs maladies dont le cancer. Afin de préserver l'homéostasie des cellules, celles-ci procèdent un cycle cellulaire de division composés de 5 phases majeures. Le cycle cellulaire est un cycle de régulation pour chaque cellule qui doit se diviser. Ce cycle contient 5 phases majeures : G0, G1, S, G2 et M.^{4,5} Chaque étape sert à graduellement préparer la cellule en vue d'une division. La régulation entre ces 5 étapes est très importante. En effet, à la fin de ces étapes, il existe des points de contrôle où la cellule a recours à des protéines appelées suppresseurs de tumeurs.⁶ Ces protéines se chargent d'enfreindre la division des cellules s'il y a eu quelconque erreur durant le cycle cellulaire menant ainsi à un phénomène nommé apoptose, une mort cellulaire programmée.⁶⁻⁸ Cette stratégie est employée par les cellules afin d'empêcher la division cellulaire d'une cellule ayant des mutations par exemple au niveau de son code génétique. Parfois, les suppresseurs de tumeurs sont eux-mêmes mutés, les empêchant ainsi d'accomplir leur rôle.⁹ Cela mène donc à une division cellulaire incontrôlable qui est à la source de plusieurs tumeurs malignes. Plusieurs suppresseurs de tumeurs ont retenu l'attention des chercheurs, car ils représentent des cibles thérapeutiques importantes afin de mieux comprendre et de reprogrammer ces voies de régulation tumorales.

1.1.2 Le pancréas

Le pancréas est un organe qui régit la communication entre toutes les cellules de l'organisme. Cet organe est constitué de deux types de cellules : les cellules exocrines et endocrines.¹⁰ Chaque type de cellules accomplit des rôles bien distincts, mais tout aussi importants pour assurer la fonction pancréatique. Les cellules endocrines ont comme fonction de synthétiser les hormones qui agiront à distance dans le corps. Ces hormones seront sécrétées et voyageront dans les vaisseaux sanguins pour atteindre leur cible anatomique.¹¹ C'est ainsi que le pancréas gère la glycémie, c'est-à-dire la concentration de glucose sanguin. Lorsqu'il y a du glucose en circulation dans le sang, les cellules endocrines du pancréas sécrètent une hormone appelée insuline.^{11, 12} Celle-ci favorise la gluconéogenèse, une voie métabolique ayant pour but de transformer le glucose en glycogène qui sera emmagasiné dans le foie de sorte à baisser la glycémie.¹³ Les cellules exocrines quant à elles ont comme but de sécréter des ions bicarbonates pour neutraliser les produits acides durant la digestion.¹⁴ Il y a également plusieurs autres enzymes sécrétées par le pancréas qui aident à la digestion comme la trypsine et des lipases pancréatiques.^{15,}

16

Comme le pancréas est un organe vital qui doit sécréter et diriger plusieurs molécules à différentes localisations dans le corps, celui-ci est hautement vascularisé. En effet, toutes les hormones, enzymes et ions sécrétés par le pancréas voyagent dans le sang pour se rendre à l'endroit désiré. De plus, le débit sanguin est beaucoup plus grand dans le pancréas, car il a besoin d'un apport plus élevé en oxygène que certains autres organes.^{17, 18} C'est pourquoi le pancréas est directement connecté à l'artère hépatique (**Figure 1**).¹⁰ De plus, il y a beaucoup de nœuds lymphatiques situés dans le pancréas pour que la lymphe y circule aisément.

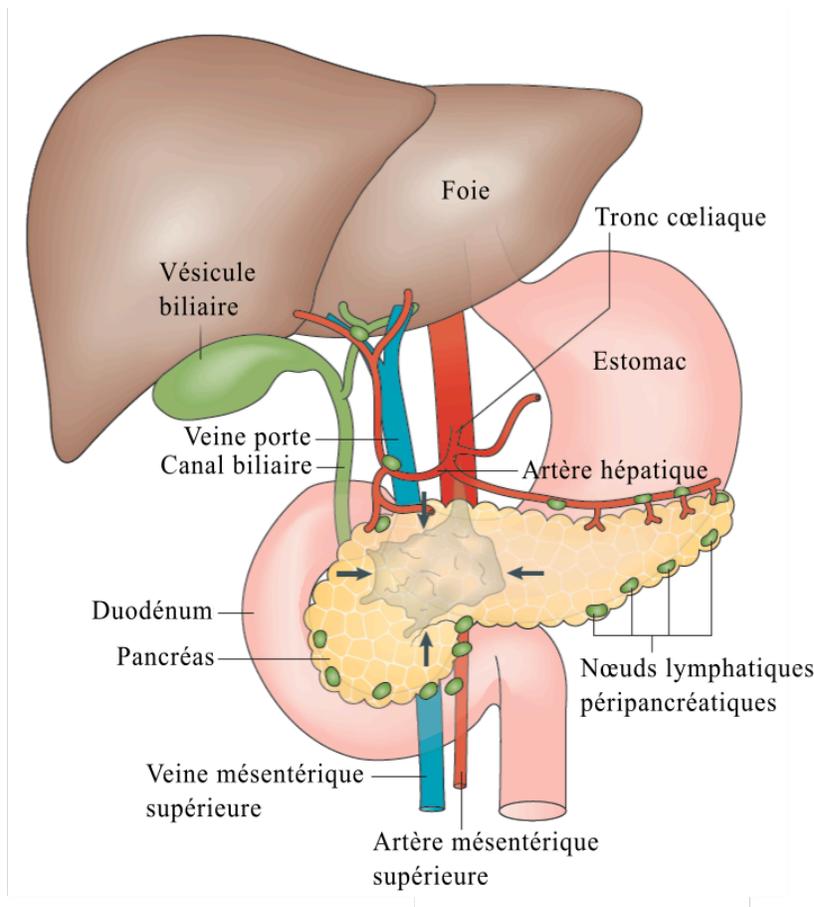


Figure 1 Schéma anatomique du système pancréatique et son environnement. Il est possible de voir le pancréas entouré des organes du système digestif comme le foie, et l'estomac. Le pancréas est hautement vascularisé et directement alimenté par l'artère hépatique. Il contient également plusieurs nœuds lymphatiques. Entre les quatre flèches noires, il s'agit d'une tumeur solide de type adénocarcinome ductal pancréatique (PDAC). Figure adaptée de l'article en citation.¹⁰

1.1.3 Le cancer du pancréas

L'adénocarcinome ductal pancréatique (PDAC) est un type de tumeur solide du pancréas qui représente environ 90% des cas de cancers du pancréas.¹⁹ Celle-ci est l'une des plus mortelles parmi les types de tumeurs solides.¹⁹ En effet, malgré l'avancement des connaissances sur les traitements ciblant ce cancer, il reste que le taux de survie de 5 ans suite au diagnostic est d'environ 5% et le taux de survie après un an est d'environ 20%.²⁰ Ces statistiques peuvent être expliquées par plusieurs raisons. Tout d'abord, les symptômes associés à ce cancer sont souvent légers et peu alarmants, rendant ainsi le diagnostic plus difficile, voire impossible. Les premiers symptômes caractéristiques aux tumeurs de type PDAC surviennent souvent à cause des métastases.²¹ Ce

cancer peut facilement métastaser à cause de la vascularisation importante du pancréas. C'est ainsi que les métastases peuvent voyager dans l'artère hépatique donnant principalement des cancers du foie, des cancers intra-abdominaux ainsi que des cancers du péritoine.²² De plus, il y a très peu de biomarqueurs connus propres au cancer du pancréas retardant davantage le diagnostic de la maladie.²¹ En clinique, un seul biomarqueur est couramment observé afin de poser ce diagnostic. Il s'agit de l'antigène du carbohydrate 19-9 (CA19-9). Ce tétrasaccharide est surexprimé chez les patients souffrant de cancers du système digestif (pancréas^{23, 24}, estomac²⁵, œsophage²⁶, colorectal²³), ce qui en fait un biomarqueur pour ce type de cancer. CA19-9 est toutefois surexprimé chez les patients ayant d'autres désordres physiologiques tels que des cirrhoses du foie, des pancréatites, mais également dans d'autres maladies non-associées au système digestif comme la pneumopathie interstitielle diffuse idiopathique (IIP)²⁷ ou bien la panbronchiolite diffuse.²⁷ Comme CA19-9 peut être un biomarqueur pour plusieurs maladies, il manque de spécificité. C'est pourquoi les recommandations sont d'utiliser d'autres marqueurs pour poser un diagnostic pour les maladies précédemment citées. Cependant, pour le cancer du pancréas, c'est l'un des seuls qui peut être cliniquement significatif ce qui représente l'un des gros désavantages au niveau du diagnostic de cette maladie.²⁸ Non seulement CA19-9 est peu spécifique, mais il y a un fort taux de faux négatifs associé à sa détection.^{21, 28} Cela reste pour l'instant la meilleure option qu'il existe pour investiguer et diagnostiquer le cancer du pancréas. Ainsi, le cancer du pancréas est difficile à diagnostiquer dans les premiers stades de la maladie, ce qu'il résulte en un manque d'efficacité au niveau des traitements.

1.1.4 Thérapies actuelles

Le traitement le plus efficace jusqu'à maintenant est l'ablation de la tumeur de façon chirurgicale. Néanmoins, seulement 20% des patients ayant un cancer de type PDAC sont de bons candidats pour subir l'opération, car le diagnostic se fait souvent trop tard et le cancer est généralisé.^{20, 29} Sa position anatomique reculée par rapport aux autres organes le rend difficile d'accès, ce qui complexifie son diagnostic. De plus, même pour les patients dont le cancer n'a pas métastasé, la chirurgie reste assez complexe et invasive puisque l'organe est grandement vascularisé, augmentant le risque d'hémorragie durant l'opération.²¹ Pour que la chirurgie soit possible, la tumeur doit se situer sur les extrémités du pancréas.^{19, 30} Plusieurs autres facteurs vont jouer sur la prise de décision quant à la chirurgie comme la grosseur de la tumeur, la présence de

nœuds lymphatiques à proximité de la tumeur et la santé générale du patient. Il faut mentionner que la chirurgie implique souvent le retrait d'une partie de l'estomac ou du foie, ce qui rend l'opération plus invasive, complexe et risquée.³¹

Le nombre de cas de cancer du pancréas est en hausse par rapport aux autres types de cancer.³² Sachant cela, il est donc essentiel de continuer à faire de la recherche pour mieux comprendre cette pathophysiologie, mais également pour développer de nouveaux traitements plus efficaces que ceux qui existent actuellement. Tout d'abord, le type de traitement est choisi en fonction du stade de développement du cancer du pancréas ainsi que sa position sur le pancréas.²⁰ La chirurgie est la voie plus prometteuse pour augmenter les chances de survie face au cancer du pancréas. Souvent, une chimiothérapie adjuvante est combinée à la chirurgie afin de diminuer les chances de récurrence (**Figure 2**). Le gemcitabine est le composé le plus utilisé comme agent chimiothérapeutique adjuvant couplé à la chirurgie pour le cancer du pancréas.³³ Si la tumeur est trop grosse pour être chirurgicalement retirée, mais qu'elle est bien située, un traitement chimiothérapeutique néo-adjuvant combiné à la radiothérapie est administré afin d'essayer de réduire la taille de la tumeur pour la rendre résécable.³⁴ Si le traitement n'est pas efficace, l'opération ne peut avoir lieu et il faut opter pour des traitements de dernier recours pour les stades avancés ou sévères. Dans les cas où le stade est avancé ou si le cancer est métastatique, le traitement le plus utilisé de nos jours est le FOLFIRINOX®, une combinaison de 4 composés actifs : l'irinotecan, l'oxaliplatine, le fluorouracil et le leucovorine.³⁵ Il a été démontré que malgré la multitude d'effets secondaires dus au FOLFIRINOX®, le pronostic est meilleur que si le gemcitabine était utilisé comme traitement de dernier recours.^{36,37} Néanmoins, le FOLFIRINOX® est un traitement très ardu qui laisse beaucoup d'incertitude quant à la guérison du cancer du pancréas.

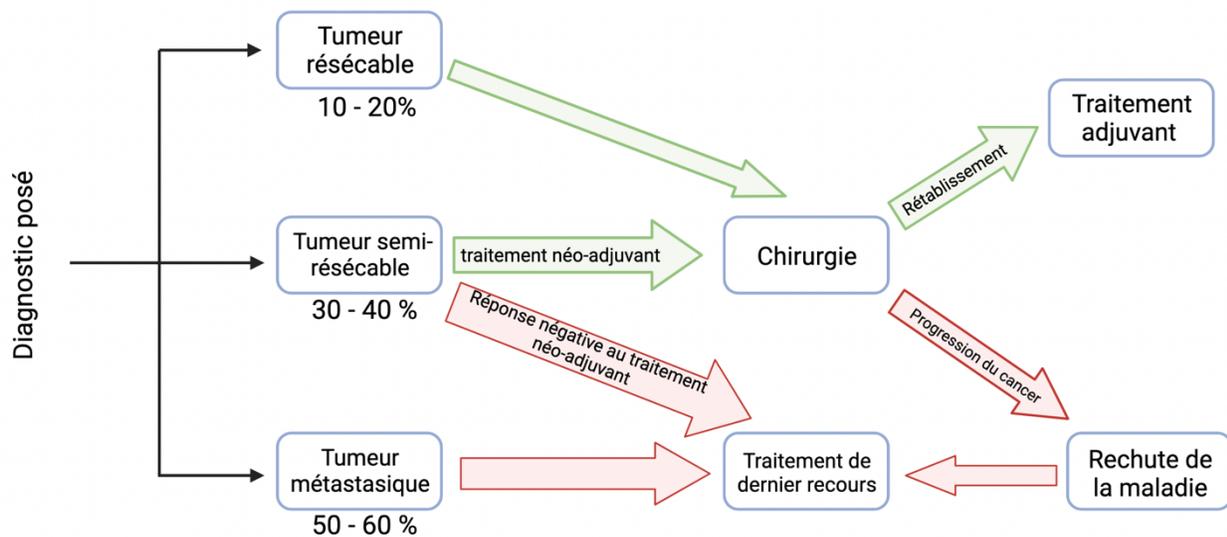


Figure 2 Schéma des différents traitements selon le stade du cancer du pancréas. Modifiée et adaptée de la figure en citation.¹⁹

Avec les innovations en biotechnologie des dernières décennies, plusieurs autres avenues de traitement sont explorées. La recherche sur l'immunothérapie comme traitement pour le cancer du pancréas est en essor. Les premières stratégies employées ont été de bloquer les points de contrôle immunitaires, soit la voie de PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*) et CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) qui seraient responsables de l'immunité tumorale.^{38, 39} Autrement dit, si ces voies sont inhibées, cela favoriserait la formation de cellules immunitaires de type lymphocytes T qui seraient dirigées contre les tumeurs. Plusieurs essais cliniques ont été faits afin de traiter les tumeurs de type PDAC, mais malheureusement, aucun succès n'a été observé.⁴⁰⁻⁴² Le manque de connaissances sur les biomarqueurs du pancréas est un enjeu qui rend le développement de l'immunothérapie difficile, mais plusieurs autres essais cliniques sont encore en cours actuellement. Plusieurs chercheurs se consacrent au développement de vaccins contre le cancer du pancréas. Ces vaccins consistent à injecter des anticorps spécifiques aux cellules cancéreuses ou autres éléments propres à celles-ci et qui stimulent la production de cellules immunitaires ciblant les cellules cancéreuses, les menant ainsi à la mort cellulaire. Plusieurs de ces vaccins sont en essai clinique présentement.⁴³⁻⁴⁸ Étant donné la complexité de la maladie et du développement de thérapies, il est d'autant plus important d'envisager tous les traitements possibles, comme l'immunothérapie, mais aussi de nouveaux traitements chimiothérapeutiques.

1.2 Les biguanides

Les biguanides (**Figure 3**) sont une classe de composés qui ont été extraits des lilas français, *Galega officinalis*, pour la première fois au début des années 1900.⁴⁹ Rapidement, les biguanides ont été utilisés dans plusieurs domaines pour leur activité biologique. Le proguanil est un exemple de dérivé de biguanide qui a des propriétés antipaludiques (**Figure 3**).⁵⁰ Au niveau des milieux hospitaliers, la chlorhexidine est utilisée en tant que stérilisant lors des opérations, mais aussi en tant que désinfectant de surface pour des outils chirurgicaux.^{51, 52} Néanmoins, l'application la plus connue des biguanides est sous forme de médicaments antidiabétiques. En effet, plusieurs médicaments ont été commercialisés à cet égard, comme la metformine⁵³, la phenformine⁵⁴ et la buformine (**Figure 3**).⁵⁵

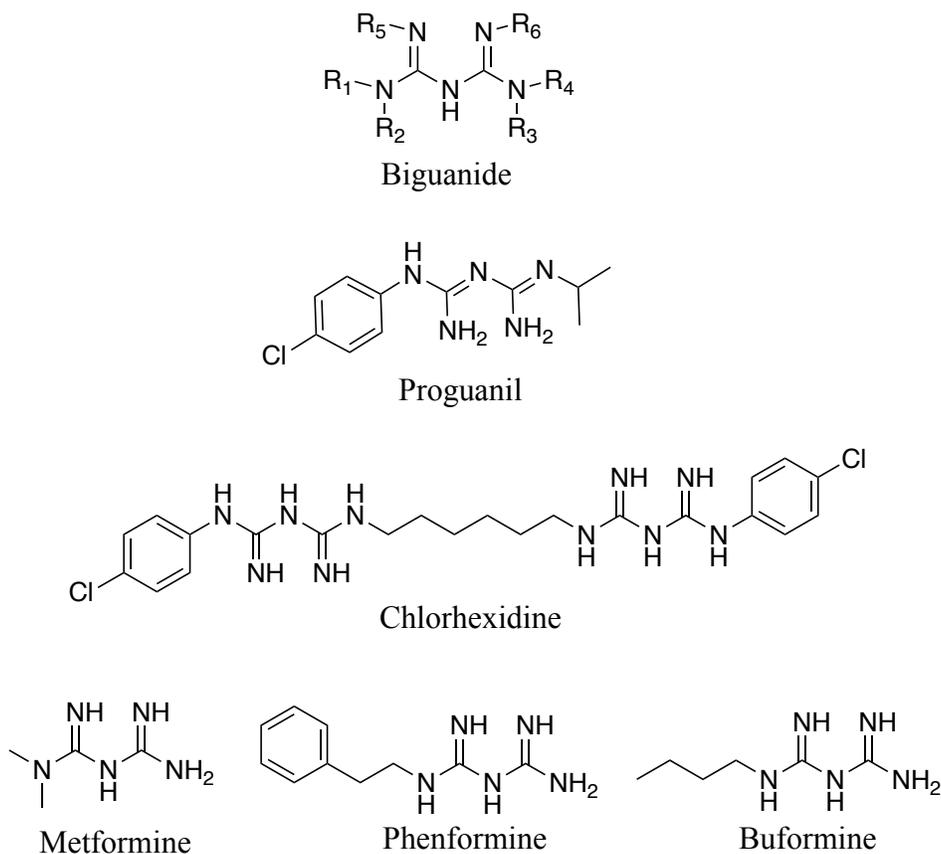


Figure 3 Structures générales des biguanides ainsi que plusieurs analogues de type biguanide.

Seule la metformine est actuellement approuvée par la FDA (*U.S Food and Drug Administration*) comme traitement pour le diabète de type II, car les autres composés se sont avérés toxiques pour cause d'acidose lactique.⁵⁶ La metformine, connue sous le nom commercial de Glucophage®, est maintenant un des 50 médicaments les plus vendus à travers le monde.⁵⁷ Il est bien connu que la metformine aide à restaurer la sensibilité à l'insuline chez les patients ayant développé une résistance à cette dernière. De plus, elle réduit la néoglucogenèse pour diminuer le niveau de glucose libre dans le sang favorisant ainsi l'absorption du glucose dans les tissus.⁵⁸

Étant un médicament hautement prescrit, des études épidémiologiques ont démontré que les patients diabétiques prenant quotidiennement de la metformine sont beaucoup moins à risque de développer certains types de cancers comme le cancer du poumon,⁵⁹ des ovaires,⁶⁰ du sein⁶¹ et du pancréas.⁶² Cependant, la metformine n'étant pas assez biodisponible oralement, elle ne peut pas constituer un traitement contre le cancer. En fait, comme la metformine est peu métabolisée, elle est majoritairement excrétée par les reins directement sans subir aucune modification par les enzymes digestives, limitant grandement son accumulation dans les tissus ou tumeurs. Des doses trop importantes devraient être administrées et ne représentent pas un traitement réaliste et envisageable. De plus, le mécanisme d'action de la metformine reste incompris, ce qui rend la tâche plus complexe lors de la conception rationnelle de nouveaux analogues. Plusieurs études ont trouvé des cibles indirectes à la metformine, mais aucune preuve directe n'a été reportée.⁶³

1.2.1 Mécanisme d'action des biguanides comme anticancéreux

Plusieurs hypothèses existent quant à la cible biologique des biguanides et plus précisément de la metformine en tant qu'agent anticancéreux. L'hypothèse la plus connue et la plus acceptée par la communauté scientifique est que la metformine perturbe la chaîne respiratoire des mitochondries (**Figure 4**).⁶³ Tout d'abord, la metformine doit traverser les membranes des cellules pour se rendre aux mitochondries. Comme cette molécule est très hydrophile et cationique à pH physiologique, elle ne peut traverser les membranes sans l'aide de transporteurs. En effet, il a été démontré que la metformine peut passer à travers les membranes grâce à des transporteurs de cations organiques de type 1, 2 et 3 (OCT-1, OCT-2 et OCT-3).^{64, 65}

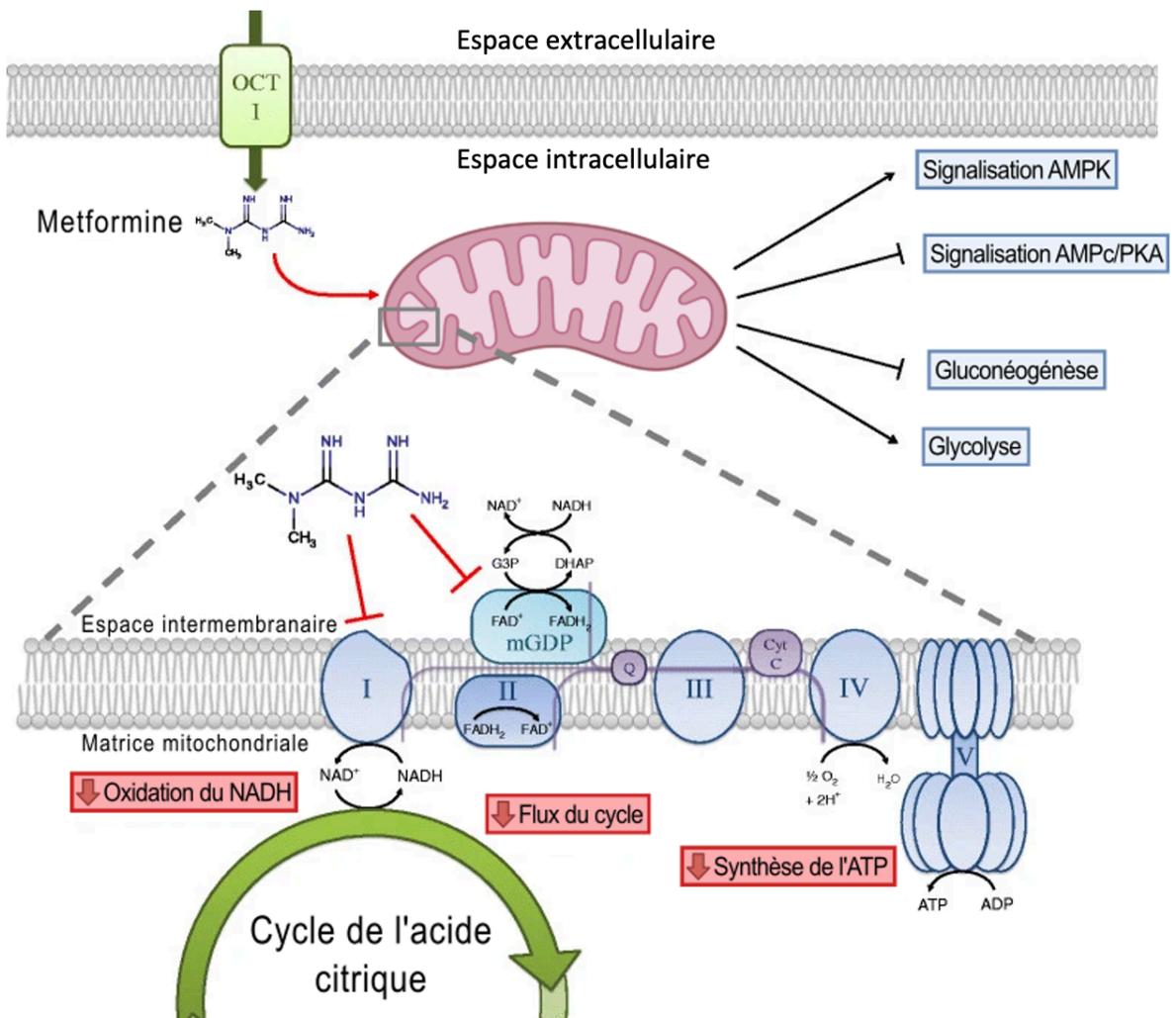


Figure 4 Mécanisme d'action proposé de la metformine comme agent anticancéreux. Figure adaptée de l'article en citation.⁶³

Ces transporteurs sont surexprimés dans les cellules des parois intestinales permettant ainsi l'assimilation de la metformine dans le système digestif où la métabolisation et l'élimination de celle-ci sera possible.⁶⁶ Une fois acheminée dans la cellule, la metformine va inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale perturbant ainsi le gradient de protons qui se forme pour générer de l'énergie à la cellule sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). L'inhibition du complexe I par la metformine diminue le ratio du co-enzyme NAD⁺/NADH, limitant l'efficacité de la respiration cellulaire.⁶⁷ Comme cette dernière voie métabolique est affectée, la production d'ATP diminue également. Puisque la cellule à ce moment possède moins d'énergie, l'AMPK

(*AMP-activated protein kinase*) sera activée par ce manque d'ATP. L'AMPK est une kinase sensible au ratio NAD^+/NADH et modulera certaines voies métaboliques en fonction de celui-ci. Cette enzyme agit donc indirectement sur le niveau d'ATP cellulaire. Si la cellule est pauvre en ATP, l'AMPK activera la voie de la glycolyse pour générer plus d'ATP pour compenser. Naturellement, l'AMPK inhibera la voie de la protéine kinase A (PKA) qui est responsable de l'activation des enzymes impliquées dans la gluconéogenèse.⁶³ Ainsi, cette voie sera inhibée afin de limiter l'utilisation d'ATP. De plus, la présence de la metformine amène également l'AMPK à inhiber mTOR (*mammalian target of rapamycin*). La protéine mTOR est responsable de la régulation plusieurs facteurs de croissance cellulaire.⁶³ De plus, il est prouvé que la surexpression de mTOR survient dans plusieurs cancers.⁶⁸ En effet, comme mTOR régule la synthèse des protéines et par conséquent la croissance et prolifération cellulaire, il est naturel pour une cellule cancéreuse de surexprimer cette voie.⁶⁹ Enfin, comme la metformine active l'AMPK qui à son tour inhibe mTOR, diminuant finalement la prolifération cellulaire, il est possible d'imaginer l'effet anticancéreux direct de la metformine.

Il est aussi décrit que la metformine aurait un effet indirect sur les cellules cancéreuses (**Figure 5**). Grâce à son effet antihyperglycémiant, la metformine empêche la gluconéogenèse dans le foie et par conséquent l'absorption du glucose dans les tissus est réduite. Cet effet est négatif pour la croissance des cellules cancéreuses. Comme la croissance des cellules cancéreuses est plus importante et rapide que les cellules saines, elles ont besoin de beaucoup d'énergie. Cet apport énergétique supplémentaire sera comblé via la surexpression de la voie métabolique de la glycolyse. Puisque cette voie produit de l'ATP, les cellules cancéreuses l'exploitent grandement.⁶³ En effet, l'expression des transporteurs de glucose (GLUT-1) à la surface des cellules cancéreuses est augmentée afin de fournir suffisamment de glucose pour permettre aux cellules de croître, donc d'assurer la progression de la maladie.⁷⁰ En somme, c'est en limitant cet import massif de glucose dans les cellules cancéreuses que la metformine vient restreindre leur prolifération et possède donc une activité anticancéreuse indirecte.

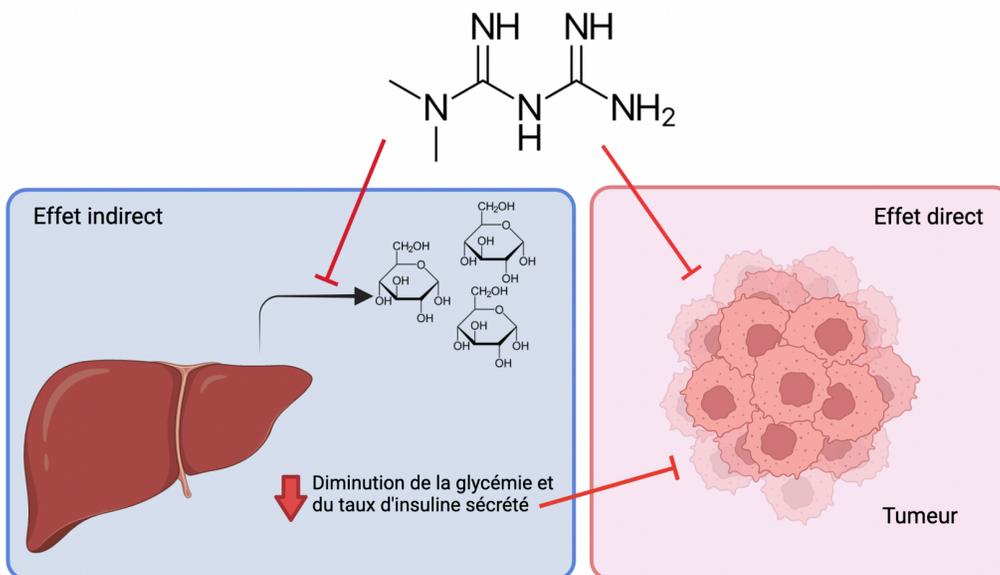


Figure 5 Mécanisme d'action indirect et direct de la metformine en tant qu'agent anticancéreux. Modifiée et adaptée de la figure en citation.⁶³

Bien que la metformine semble avoir des capacités anticancéreuses, elle n'a jamais été approuvée en tant que traitement unique, car comme mentionné précédemment, elle n'est pas biodisponible et ne peut donc pas atteindre les tissus ou sa cible biologique. Elle ne s'accumule pas dans les tissus et ne permet donc pas d'avoir un effet assez puissant sur les cellules cancéreuses pour inhiber leur croissance.

Plusieurs chercheurs ont imaginé des moyens de développer des méthodes pour augmenter la biodisponibilité de la metformine afin d'agir contre les cellules cancéreuses. Plusieurs types de nanoparticules ont été développées afin de relarguer la metformine à un site d'intérêt.⁷¹⁻⁷³ La conception rationnelle de nanoparticules permettant de relarguer la metformine consiste à l'introduire au centre hydrophile de la nanoparticule. L'extérieur de la nanoparticule sera soit hydrophobe afin de traverser les membranes lipidiques ou greffé par des groupements qui reconnaîtront des récepteurs afin d'être internalisée dans la cellule. Une autre technique qui a été explorée est d'utiliser des transporteurs de metformine à base de lipides qui pourraient ainsi traverser les membranes facilement. Les liposomes ont été utilisés à cet effet, car ils sont constitués de phospholipides et représentent une particule biomimétique qui peut aller relarguer la metformine qui a préalablement été encapsulée dans les liposomes.⁷⁴ Dans les dernières décennies, le développement d'hydrogels a été très populaire; il s'agit d'un réseau gorgé d'eau et de molécules

ou particules réticulées dans le gel. Quand l'hydrogel est formé, il peut être chargé avec des composés hydrophiles comme la metformine. Plusieurs mécanismes de relargage existent, mais ils consistent tous à déformer le réseau pour délivrer les molécules au site désiré. Des hydrogels injectables ont été formulés pour relarguer la metformine dans des tumeurs. Un des stimuli pour désassembler l'hydrogel est l'utilisation de l'infrarouge, car cette longueur d'onde peut pénétrer les tissus les plus profonds au besoin.⁷⁵ Plusieurs autres méthodes de désassemblage sont utilisées afin de relarguer un composé selon la composition de l'hydrogel. Il peut être sensible au pH,⁷⁶ à certaines enzymes spécifiques,⁷⁷ à la température,⁷⁸ etc. Enfin, les chercheurs essaient de rendre la metformine plus biodisponible en essayant de délivrer celle-ci directement aux endroits désirés en utilisant toutes ces stratégies qui sont encore grandement étudiées.

1.2.2 Les analogues de biguanide

Comme mentionné dans la section précédente, la metformine est trop hydrophile et ne peut pas s'accumuler dans les tissus. C'est pourquoi une librairie d'analogues de metformine plus lipophiles a été synthétisée par Dr. Audrey Hébert, une ancienne étudiante du groupe Schmitzer. Parmi tous les analogues, deux se sont démarqués par leur concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) efficace. La valeur d' IC_{50} représente la concentration minimale pour inhiber la croissance de 50% de la population de cellules cancéreuses du pancréas (KP4) dans notre cas. En effet, le phényléthynylbenzyle biguanide (PEBB) (**Figure 6**) a une IC_{50} d'environ 6 μM comparativement l' IC_{50} d'environ 5 mM de la metformine rendant ainsi le PEBB environ 800 fois plus efficace que la metformine en tant qu'agent anticancéreux.⁷⁹ L'hexylbiguanide (**Figure 6**) est un autre composé qui s'est démarqué par sa faible toxicité lors de tests d'hémolyse.⁸⁰ Il a aussi été démontré par des expériences de tube en U que le PEBB est beaucoup plus hydrophobe que la metformine, lui permettant ainsi de pénétrer plus facilement la membrane cellulaire en s'autoassemblant.⁷⁹ Suite à ces expériences *in vitro*, plusieurs études ont été faites sur différentes souches de souris en collaboration avec les laboratoires du professeur Gerardo Ferbeyre (département de biochimie et médecine moléculaire, université de Montréal) et du professeur Michael Pollak (département de médecine et d'oncologie, université McGill) afin d'étudier en détail la pharmacocinétique des deux composés biguanides d'intérêt.

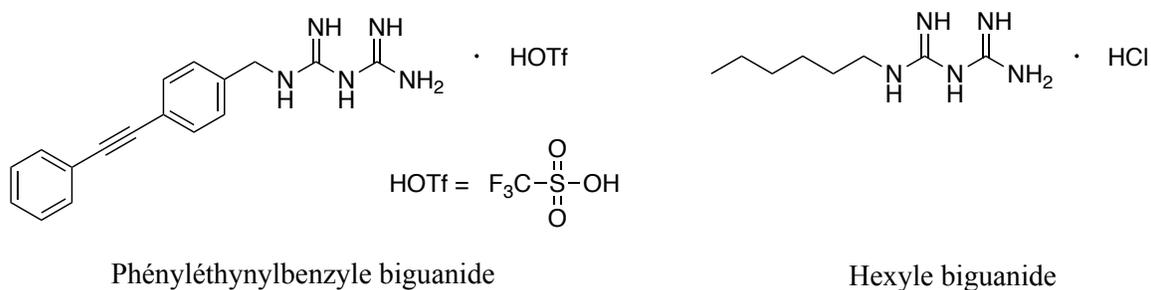


Figure 6 Structure des sels phényléthynylbenzyle biguanidium (PEBB) et de l'hexylbiguanidium

1.3 Pharmacocinétique des médicaments

Pour chaque médicament sur le marché, des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sont préalablement faites afin de connaître le comportement d'un principe actif sur l'anatomie. Il existe en pharmacologie un grand principe que l'on nomme ADME qui signifie respectivement; Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion. Ces quatre caractéristiques représentent le parcours de tous les médicaments dans un organisme. Cette section aura pour but de décrire le comportement des médicaments selon chacun des termes énumérés précédemment.

1.3.1 Absorption du médicament

Tout d'abord, pour que n'importe quel médicament oral soit distribué, métabolisé et éliminé, celui-ci doit généralement traverser la membrane de la paroi intestinale pour pouvoir rejoindre la circulation sanguine. Ceci peut être obtenu par un phénomène de diffusion du médicament au travers de la membrane ou via l'aide d'un transporteur membranaire. Ces transporteurs sont situés sur la surface apicale des cellules de la paroi intestinale. Une fois le médicament à l'intérieur de la cellule intestinale, celui-ci pourra rejoindre la circulation sanguine en traversant la membrane basale. Plusieurs facteurs exercent une influence sur l'absorption d'un médicament de façon positive ou négative, comme la désintégration de la formulation pharmaceutique du médicament, la dissolution du médicament dans le suc gastrique, le contact entre la paroi intestinale et le médicament ainsi que le type de transporteur intestinal impliqué dans ce processus.^{81, 82} Tous ces facteurs sont importants dans le chemin vers l'absorption d'un médicament (**Figure 7**). Suite à l'administration d'un composé thérapeutique, la formulation

pharmaceutique se désintègre en premier lieu. Le principe actif est donc libéré dans l'estomac où sa dissolution sera possible. Ensuite, le composé est acheminé vers l'intestin par vidange gastrique afin de pouvoir être absorbé dans le système. La vitesse de l'acheminement d'un composé vers l'intestin peut faire grandement varier l'absorption de celui-ci. Une fois que le composé est passé dans la région intestinale, il doit entrer en contact avec les *microvilli* qui tapissent les parois intestinales afin d'atteindre les transporteurs apicaux qui pourront finalement transporter le principe actif vers la circulation sanguine. Le pH est également un facteur très important au niveau de l'absorptivité des composés puisque certaines caractéristiques physico-chimiques doivent être respectées afin d'être compatible avec un transporteur spécifique se trouvant sur les *microvilli*.⁸¹ Les transporteurs de cations organiques (OCT) transportent seulement les molécules cationiques contrairement aux transporteurs d'anions organiques (OAT) qui ne transportent que les anions. Plusieurs autres transporteurs pH-dépendant existent également, d'où l'importance de comprendre l'état de charge d'un médicament dans le chemin vers l'absorption.

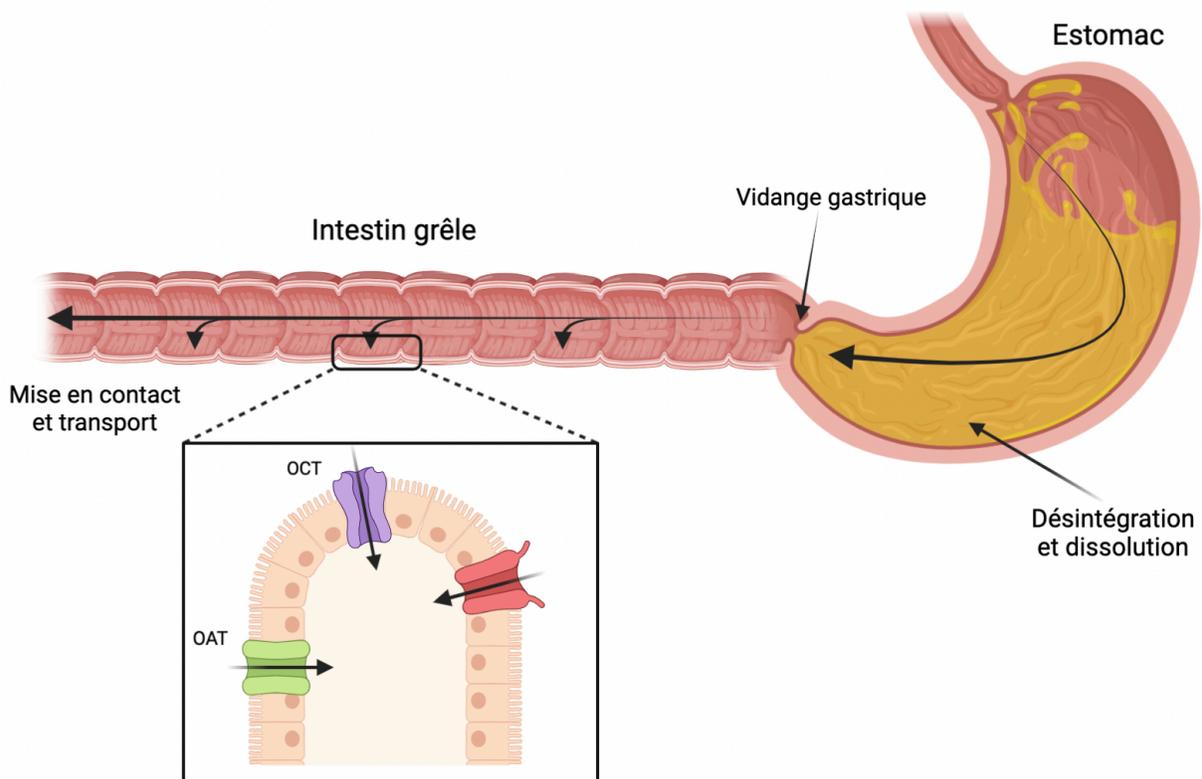


Figure 7 Schéma simplifié du système digestif montrant les différentes étapes pour l'absorption d'un médicament de l'ingestion jusqu'à l'absorption par des transporteurs apicaux.

1.3.1.1 Variation cinétique de l'absorption

Toutes les caractéristiques mentionnées précédemment exercent une influence directe sur la vitesse d'absorption d'un médicament. La vitesse d'absorption (dA/dt) est dépendante de la dose administrée (D) et de la constante d'absorption (k_a) selon l'équation 1.⁸³

$$\frac{dA}{dt} = D \times k_a \quad (1)$$

Il est possible également d'obtenir des informations sur les paramètres pharmacocinétiques essentiels à partir du graphique de la concentration plasmatique d'un composé en fonction du temps (**Figure 8**). Ces paramètres directement visibles sur le graphique sont importants pour déterminer les autres paramètres pharmacocinétiques plus complexes. En effet, il est possible d'extraire la concentration plasmatique maximale (C_{max}) d'un composé qui correspond au point où la vitesse d'absorption plafonne et donc est égale à la vitesse d'élimination (dE/dt).

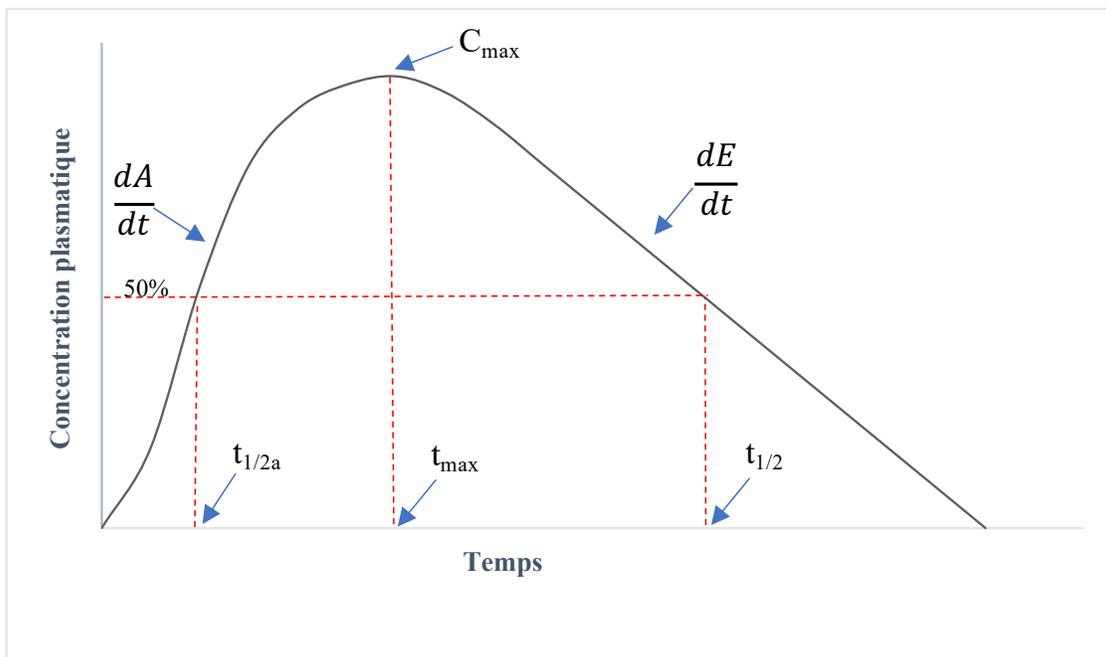


Figure 8 Graphique type de la concentration plasmatique d'un médicament en fonction du temps. Il est possible de voir les paramètres pharmacocinétiques et de les extraire directement du graphique. À noter que l'allure de la courbe peut changer légèrement en fonction des variations biologiques possibles.

La concentration plasmatique maximale est grandement utile pour déduire la période biologique ($t_{1/2a}$) d'un médicament. Ce paramètre correspond au temps pour atteindre 50% de la concentration plasmatique maximale. Il est possible également à partir de la concentration plasmatique maximale de déduire le temps maximal pour l'atteindre (t_{max}). Le dernier paramètre directement visible sur le graphique est le temps de demi-vie du médicament ($t_{1/2}$) qui correspond au temps pour retrouver la moitié de la concentration après avoir atteint la concentration maximale.

Il est possible à partir de ces paramètres d'aller calculer plusieurs autres constantes qui communiquent de l'information sur le comportement pharmacocinétique d'un médicament. La constante d'absorption (k_a) désigne la vitesse à laquelle un médicament entre en circulation dans le sang.⁸⁴

$$k_a = \frac{\ln 2}{t_{1/2a}} \quad (2)$$

Dans le même ordre d'idées, il est possible de calculer la constante d'élimination (k_e) qui indique la vitesse à laquelle un médicament est excrété du sang.⁸⁴

$$k_e = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad (3)$$

En résumé, lorsqu'un médicament est administré, il pourra être plus ou moins absorbé selon le temps qu'il demeure dans l'intestin (exemple de formulation orale). La vitesse d'absorption augmentera graduellement jusqu'à atteindre un plateau où le médicament sera complètement absorbé dans l'organisme. À ce moment, la vitesse d'absorption est nulle et la vitesse d'élimination augmentera jusqu'à ce que tout le médicament soit éliminé de l'organisme (**Figure 8**). Lorsque la vitesse d'absorption est modifiée, la concentration maximale et le temps maximal sont impactés, mais la concentration plasmatique ainsi que la vitesse d'élimination ne sont pas affectées. Cependant, quand la dose absorbée d'un médicament fluctue, la concentration maximale ainsi que la concentration plasmatique seront influencées proportionnellement contrairement au temps maximal et à la vitesse d'élimination qui ne seront nullement influencés. Il est à noter que tous ces paramètres vont finalement exercer une influence sur l'effet d'un médicament sur un organisme,

d'où l'importance de bien comprendre les paramètres pharmacocinétiques d'absorption d'un médicament pour pouvoir ajuster les doses optimales d'avoir une bonne réponse pharmacologique.

1.3.2 La distribution du médicament

Afin d'avoir son effet, le médicament doit être distribué au bon tissu afin de rejoindre sa cible pharmacologique. La distribution est l'étape où le médicament passe de la circulation sanguine vers le liquide interstitiel pour finalement aller rejoindre les tissus. Le liquide interstitiel est le liquide entre les vaisseaux sanguins et les tissus et c'est par cet intermédiaire que les médicaments pourront atteindre les organes. Les éléments qui influencent la distribution d'un médicament sont le volume de distribution (V_d) du médicament, l'interaction du médicament avec les protéines plasmatiques et le taux d'élimination.⁸⁵

Le volume de distribution est une valeur arbitraire qui désigne le volume nécessaire pour dissoudre la totalité de la concentration plasmatique d'un médicament dans les organes et tissus. Cette valeur donne une idée du comportement d'un médicament dans un organisme. Il est possible de déterminer le volume de distribution d'un médicament grâce à la formule suivante :

$$V_d = \frac{D}{C_p} \quad (4)$$

où V_d est le volume de distribution en L/kg, D est la dose administrée et C_p est la concentration plasmatique mesurée.⁸⁶ Comme chaque tissu n'est pas homogène et ils sont tous différents, il est difficile d'estimer comment une molécule peut se dissoudre dans ceux-ci. C'est pourquoi on estime que chaque compartiment est homogène et fluide pour simplifier les calculs de l'équation 4. Il est à noter que ce sont des valeurs théoriques et qu'il est possible que les volumes de distribution ne soient pas réels dû à ces estimations. Par exemple, un médicament ayant un grand volume de distribution indique qu'il aura une tendance à s'accumuler préférentiellement dans les tissus adipeux en raison de son hydrophobie plus importante.⁸⁷ En revanche, si un volume de distribution est plus faible, cela suggère que le médicament est plus facilement distribué dans les organes. Ce paramètre pharmacocinétique important permet de déduire plusieurs autres caractéristiques des médicaments qui seront discutés dans les prochaines sections.

Comme mentionné précédemment, plusieurs facteurs exercent une influence sur la distribution d'un médicament. La liaison des médicaments aux protéines plasmatiques est sans doute le facteur qui aura le plus d'impact sur la distribution. Plusieurs protéines résident dans le plasma, majoritairement l'albumine et les protéines globulaires. Un médicament ayant une grande affinité avec les protéines plasmatiques aura une moins grande distribution dans les tissus. Les doses médicamenteuses prescrites prennent en compte l'affinité du composé aux protéines plasmatiques afin d'atteindre la réponse pharmacologique souhaitée. Pour des médicaments avec une grande affinité aux protéines plasmatiques, les doses sont souvent ajustées à la hausse de sorte à avoir une quantité de médicament libre (actif) suffisante pour atteindre la réponse pharmacologique.

Évidemment, plusieurs autres paramètres jouent sur la distribution d'un médicament, notamment l'âge et la masse corporelle.⁸⁸ Les enfants possèdent un pourcentage d'eau corporelle plus élevé que les adultes. Les doses administrées tiendront donc compte de ce paramètre et seront plus élevées afin d'obtenir une concentration efficace.⁸⁸ Au contraire, chez les personnes âgées, la biosynthèse de l'albumine est réduite, ce qui nécessite une réduction de la dose de certains médicaments pour éviter une intoxication. Les personnes qui sont en dessous de leur poids santé rencontreront les phénomènes contraires.⁸⁹ Le poids est un facteur essentiel, car pour les personnes souffrant d'obésité, la proportion de lipides corporelle est supérieure à la normale. Les médicaments ayant un volume de distribution plus grand seront plus facilement distribués dans les tissus adipeux et au contraire ceux ayant des volumes de distribution moins élevés seront plus difficilement distribués dans les tissus en raison de la haute proportion corporelle de lipides de ces individus. Comme il est possible de constater, la distribution d'un médicament varie grandement selon les caractéristiques physico-chimiques du médicament, mais aussi en fonction des caractéristiques physiologiques d'un individu. C'est pourquoi la distribution est sans doute un des paramètres qui varie le plus et qui est le plus difficile à prédire et à ajuster pour chaque médicament. Il faut noter que l'élimination du médicament influence aussi grandement la distribution, mais cette étape sera discutée dans une section propre à ce sujet.⁸⁸

1.3.3 Le métabolisme et la biotransformation du médicament

Plusieurs médicaments ont besoin de subir une biotransformation par des enzymes afin de rendre leur élimination possible. Tout d'abord, la biotransformation se fait dans les tissus suite à la

distribution du médicament. Plusieurs tissus, comme le foie, les poumons, les reins, etc., contiennent des enzymes responsables des biotransformations. Néanmoins, le foie est l'organe qui métabolise le plus de xénobiotique. Il existe plusieurs situations possibles lors des biotransformations d'un médicament. Il peut d'abord se faire métaboliser par des enzymes de phase I puis par des enzymes de phase II ou par une des deux types d'enzymes seulement. Il est également possible qu'un médicament ne subisse aucune transformation afin d'être éliminé. Les biotransformations servent à rendre un médicament plus polaire afin de pouvoir l'excréter dans l'eau par la filtration rénale. Si un médicament, comme la metformine, est assez polaire et hydrophile pour pouvoir être directement éliminé, il ne subira aucune biotransformation.

Les biotransformations de la phase I sont faites majoritairement grâce aux enzymes que l'on nomme cytochrome P450 (CYP). Il existe plusieurs types de CYP qui sont classés selon le type de réaction qu'ils catalysent. Le but premier de ces enzymes est d'ajouter des groupements polaires aux zones apolaires des molécules, par des réactions d'oxydoréduction, pour les rendre solubles dans l'eau. Si la molécule est assez soluble pour être éliminée suite à la phase I, elle ne subira pas de transformation de phase II. Cependant, si la molécule est encore trop hydrophobe, elle subira une deuxième transformation où une molécule, comme l'acide glucuronique, est ajoutée au médicament afin de favoriser la formation d'un complexe avec les molécules d'eau pour faciliter son élimination. Les enzymes de la phase II sont regroupées selon plusieurs types, dépendamment de la molécule qu'elles ajoutent sur leur substrat. La plupart des transformations dans la phase II sont des glucuronidation, c'est-à-dire l'ajout d'un acide glucuronique sur le médicament. Cette transformation est catalysée par une glucuronosyltransférases.⁹⁰ Il existe une multitude d'autres réactions dans la phase II comme l'ajout de groupements sulfate par les sulfotransférases ou les réactions d'acylation par les N-acétyltransférases.⁹⁰

Outre la structure du médicament, plusieurs autres facteurs influencent les biotransformations. L'âge et le sexe sont à prendre en considération, mais le facteur qui exerce une plus grande influence est la composante génétique des individus.⁹¹ Il existe plusieurs polymorphismes des CYP menant à des proportions de CYP différents pour chaque individu. Par conséquent, une proportion de la population sous-exprime certains CYP nécessaires à la métabolisation et l'élimination du médicament. Pour ces individus, une dose réduite sera prescrite afin d'éviter l'accumulation prolongée de celui-ci dans l'organisme. Au contraire, certains individus

peuvent surexprimer un type de CYP, augmentant l'élimination d'un composé et limitant son effet pharmacologique. Ainsi, la composante génétique de chaque individu exerce une influence sur l'élimination d'un médicament et il est difficile de prédire son comportement par rapport aux enzymes du métabolisme. De plus en plus d'outils de modélisation ont été développés afin de prédire plus facilement le comportement d'un nouveau médicament.⁸⁷ Ces outils sont grandement utilisés lors du criblage de nouvelles molécules à des fins thérapeutiques. Cela permet de mieux comprendre et anticiper comment un médicament sera métabolisé et éliminé.

1.3.4 L'excrétion du médicament

À la suite de la biotransformation des médicaments, ceux-ci sont assez hydrosolubles pour pouvoir être excrétés par les reins. Ce phénomène d'excrétion rénale se nomme : la filtration glomérulaire. Les glomérules sont un réseau de capillaires dans les reins qui reçoivent le sang de tout le corps. Le rôle des glomérules est de filtrer le sang de sorte à ne laisser passer que les molécules de faible poids moléculaire pour ultimement former l'urine. Les glomérules sont constitués de trois membranes qui filtreront à tour de rôle des molécules de plus gros poids moléculaire, comme les protéines, vers des molécules de plus petits poids moléculaire comme les médicaments. Seuls les médicaments libres peuvent être filtrés et éliminés par les glomérules. Ainsi, la liaison des médicaments aux protéines plasmatiques est un facteur qui influence l'élimination. Il est possible de mesurer la vitesse d'élimination de la même façon que la vitesse d'absorption. Selon la **Figure 8**, la vitesse d'élimination correspond à la pente de déclin (suite à l'atteinte de la concentration maximale) qui peut aussi être calculée grâce à l'équation suivante :

$$\frac{dE}{dt} = D \times k_e \quad (5)$$

La vitesse d'élimination est importante pour trouver le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) d'un médicament. De plus, lorsque la vitesse d'absorption d'un médicament est égale à la vitesse d'élimination, on obtient un plateau qui devrait correspondre à la concentration maximale du médicament. Il est également possible de déduire le temps maximal grâce à ce paramètre.

Pour quantifier l'élimination, il est aussi intéressant de parler de clairance (CL). La clairance d'un médicament est le volume de sang filtré nécessaire à l'élimination d'une

concentration constante d'un médicament par unité de temps. En d'autres mots, la clairance désigne la capacité d'un individu à éliminer un médicament. La clairance totale comprend l'élimination de l'intégralité des organes, soit l'addition de la clairance hépatique, rénale, pulmonaire, métabolique et de tout autre organe ayant la capacité d'éliminer un médicament.⁸⁶ Elle peut être mesurée grâce au graphique de la concentration plasmatique d'un médicament en fonction du temps. L'équation suivante permet de calculer la clairance à partir du graphique (**Figure 8**).⁸⁶

$$CL = \frac{D}{\int_0^{\infty} C dt} \quad (6)$$

où D est la dose administrée et $\int_0^{\infty} C dt$ est l'aire sous la courbe de la concentration plasmatique en fonction du temps. Il existe une façon plus accessible de calculer la clairance totale d'un organisme avec l'équation suivante :

$$CL = V_d \times k_e \quad (7)$$

La distribution du médicament influencera également l'élimination. Si le médicament est facilement distribué dans les tissus, son élimination sera plus lente de façon générale parce qu'il devra être biotransformé afin d'être éliminé. Les composés ayant une grande affinité aux protéines plasmatiques seront également éliminés plus lentement. La clairance du médicament influencera aussi tous ces paramètres précédemment discutés. Plus la clairance est élevée, moins la concentration maximale sera élevée et plus petit sera le temps de demi-vie. Il est donc important de quantifier l'élimination d'un médicament, car ce paramètre fournit de l'information sur toutes les étapes pharmacocinétiques qui précèdent.

Toutes ces grandes étapes pharmacocinétiques (ADME) sont essentielles lors de la conception de nouveaux médicaments. En effet, tous ces paramètres doivent être déterminés à la première phase de développement du médicament. Si les paramètres sont adéquats et viables pour un organisme, comme les souris, les études pharmacologiques peuvent poursuivre vers les phases

II, III et IV, où les sujets sont des organismes avec des systèmes se rapprochant de ceux de l'humain et éventuellement des humains.

1.4 Objectifs du projet

Dans un premier temps, des études *in vivo* ont été faites en collaboration avec le laboratoire du Dr. Michael Pollak (département de médecine et d'oncologie, université McGill). Différentes lignées de souris ont été traitées avec du PEBB, de l'hexylbiguanide ou de la phenformine. Des prélèvements sanguins ainsi que certains organes ont été recueillis pour chaque souris traitée.

Afin de quantifier les différents analogues de type biguanide dans le plasma de souris, une méthode de quantification par LC-MS-MRM a été développée dans l'objectif de recueillir de l'information sur la pharmacocinétique d'absorption des composés biguanides. Pour ce faire, une extraction des échantillons sur phase solide sera faite afin de ne d'isoler que les biguanides d'intérêt pour l'analyse. Une courbe d'étalonnage sera ensuite réalisée afin de permettre la quantification de haute précision de nos analytes par LC-MS.

Dans un deuxième temps, l'analyse des organes des souris traitées par nos composés sera faite par MALDI-TOF-MS. Cette partie du projet est possible grâce à une collaboration avec le professeur Pierre Chaurand (département de chimie, université de Montréal) qui a acquis une expertise dans le domaine de l'imagerie par spectrométrie de masse (IMS). La méthode sera optimisée afin de localiser et quantifier le PEBB et la phenformine dans les tissus tels que le foie, les muscles, le gras ainsi que dans les tumeurs de type PDAC. Pour ce faire, le choix de la matrice utilisée pour l'IMS est étudié. La méthode de déposition de celle-ci sur les tissus sera également optimisée afin d'avoir les meilleurs signaux de nos analogues pour l'imagerie et la quantification. Ces expériences d'imagerie pourront nous renseigner sur le comportement de distribution des composés d'intérêt.

Chapitre 2 - Quantification de dérivés de type biguanide dans les liquides biologiques par LC-MS

2.1 Mise en contexte

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est un instrument largement utilisé dans plusieurs secteurs de la recherche comme dans les études environnementales,⁹² protéomiques⁹³ mais également au sein d'analyses agroalimentaires⁹⁴ et pharmaceutiques.⁹⁵ En effet, plusieurs méthodes de LC-MS ont été développées afin d'analyser les liquides biologiques comme le sang, le plasma ou encore l'urine.⁹⁵ Un des avantages de cette technique est qu'il est possible d'analyser directement des mélanges complexes contenant une multitude de composés. La séparation par LC permet d'isoler un analyte précis et d'obtenir des informations quantitatives sur celui-ci. La MS qui est couplée à cette méthode est un grand avantage, car elle permet d'avoir une précision supplémentaire sur l'identité en se basant sur la masse exacte des analytes. Tout spectromètre de masse comprend cinq composantes principales. D'abord, un système d'introduction de l'échantillon. Ensuite, la source d'ionisation générera l'énergie nécessaire afin d'ioniser les analytes. Les ions produits devront ensuite être séparés par l'analyseur en masse pour finalement atteindre le détecteur qui est relié à un système d'acquisition des données par ordinateur.

2.1.1 La nébulisation électrostatique

Selon la nature des molécules à analyser par LC-MS, plusieurs types de sources d'ionisation sont à considérer. Les ionisations que l'on qualifie de douces vont protoner et déprotoner l'analyte. Au contraire, il existe des types d'ionisation plus énergétiques qui fragmenteront les molécules. Ce type d'ionisation est grandement utilisé lors de l'identification structurale de molécules par la perte caractéristique de fragments spécifiques. Selon la complexité et le type d'analyse, on peut vouloir monoprotoner les analytes afin de réduire le nombre de signaux pour faciliter le traitement de données.

Pour des échantillons en solution, une méthode d'ionisation pouvant être utilisée est la nébulisation électrostatique.⁹⁶ D'abord, l'échantillon est injecté et traverse un capillaire. Lorsque celui-ci arrive au bout du capillaire à un débit régulé, un haut voltage est appliqué à l'extrémité créant ainsi une rupture de la tension de surface du liquide dans lequel l'échantillon se trouve. Cette

rupture entraîne la formation de microgouttelettes chargées. Un jet de gaz inerte chauffé à de haute température est émis sur les microgouttelettes entraînant ainsi leur évaporation et leur désolvatation. Lorsque leurs tailles sont assez réduites, elles atteignent la limite de Rayleigh qui est décrite quand la tension électrostatique au sein d'une microgouttelette est plus grande que la tension de surface. Il s'en suit donc une fission des microgouttelettes qui résulte en l'ionisation des analytes qui sont prêts atteindre l'analyseur (**Figure 9**).⁹⁶

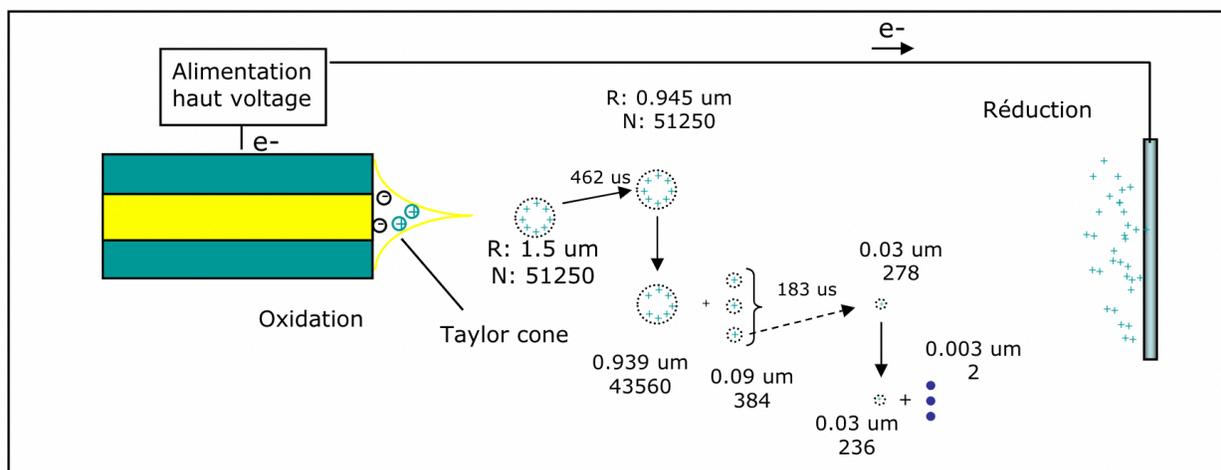


Figure 9 Représentation schématique de l'ionisation par nébulisation électrostatique. Image tirée des notes de cours CHM6140 – Spectrométrie de masse par Pierre Thibault

2.1.2 Le triple quadripôle

L'analyseur dépend également de la nature des analytes et de la précision recherchée. Dans le cas présent, un analyseur de type triple quadripôle (QqQ) sera utilisé afin de pouvoir faire un type d'analyse que l'on nomme *multiple reaction monitoring* (MRM). L'avantage de cet analyseur est qu'il permet d'identifier des molécules dans un mélange complexe par leurs fragments et d'avoir la certitude que l'ion fragmenté correspond à l'analyte.⁹⁷ L'analyse MRM prend en compte l'ion précurseur ainsi qu'un ou plusieurs fragments propres à ce dernier donnant ainsi une spécificité et une précision élevée (**Figure 10**). Cette technique est grandement utilisée en protéomique pour l'identification et la quantification de protéines à partir d'un digestat protéique. Elle est également utilisée pour l'analyse de plus petites molécules comme les métabolites ou médicaments dans les mélanges complexes, notamment les liquides biologiques.⁹⁷ Le triple quadripôle fonctionne de la façon suivante : une fois qu'un échantillon traverse une colonne chromatographique, les composés

partiellement séparés entrent dans la source d'ionisation. Lorsque ces composés sont ionisés, elles sont dirigées vers le premier quadripôle (Q_1) où la sélection des ions précurseurs est faite en fonction de la masse de l'analyte. Ensuite, l'ion précurseur est dirigé vers une cellule de collision pour le fragmenter (Q_2) le dirigeant ainsi vers le troisième quadripôle (Q_3) pour filtrer et sélectionner les fragments spécifiques pour l'identification de l'ion précurseur parent.⁹⁷ Cette méthode a été utilisée pour tous les résultats de quantification de ce chapitre. Tous les paramètres analytiques sont détaillés dans la partie expérimentale à la fin de ce chapitre.

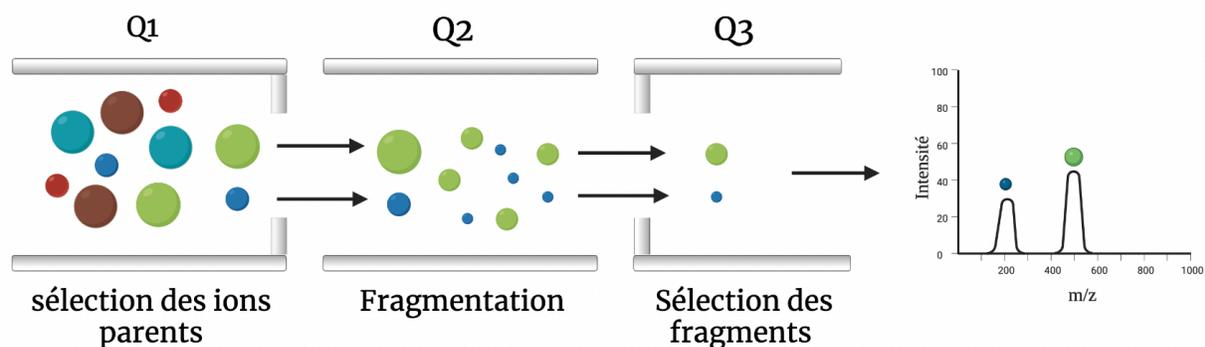


Figure 10 Schéma expérimental de la méthode d'analyse par LC-MS en mode MRM.

2.2 Profil d'ionisation des dérivés de type biguanide

Afin d'analyser les composés biguanides d'intérêt par MRM, l'identification des fragments caractéristiques de chacun de ceux-ci a été faite (**Figure 11**). Cette information est cruciale lors de l'analyse de composés dans des milieux complexes comme le plasma.

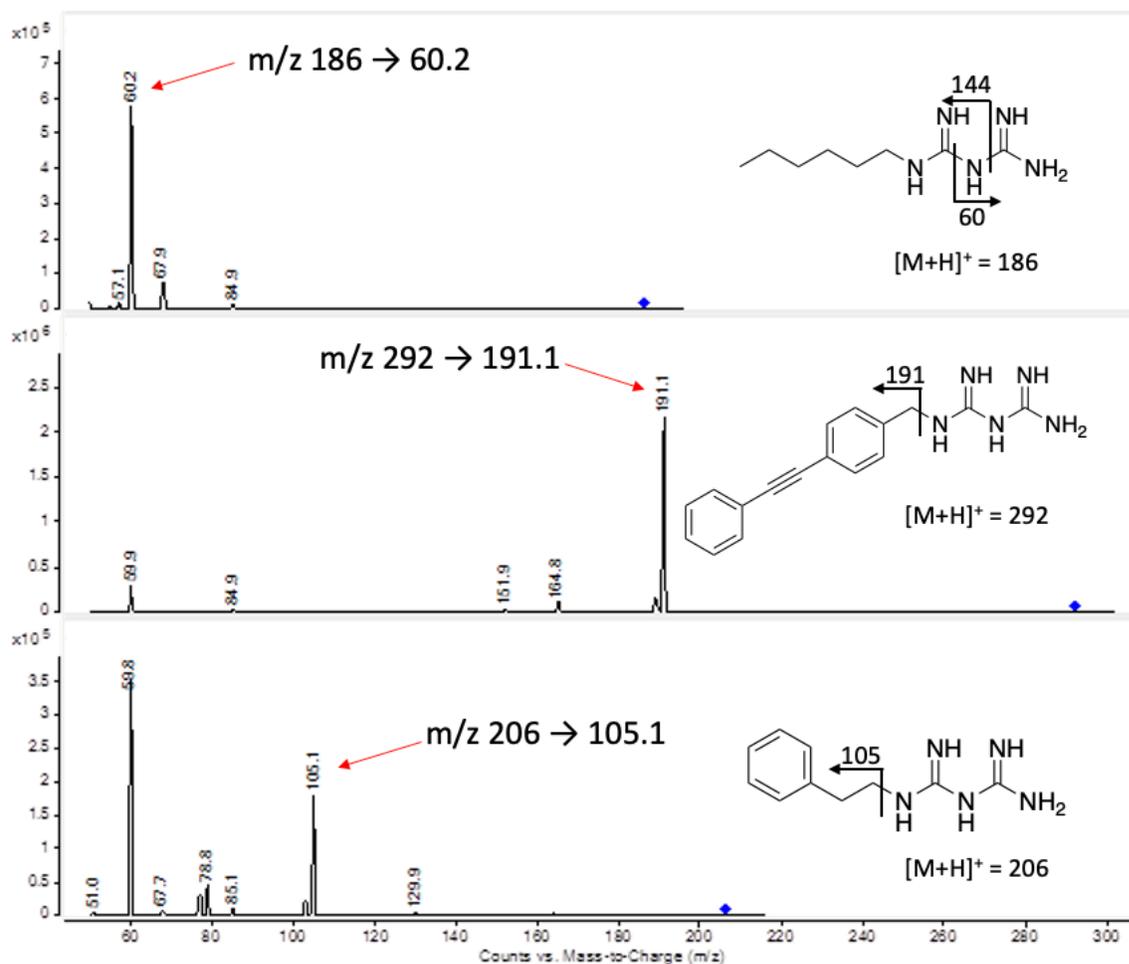


Figure 11 Patron de fragmentation des dérivés biguanidium en solution par LC-MRM. Le signal choisi pour les analyses MRM est montré par la flèche rouge. Le carré bleu représente la masse initiale du biguanide.

Les fragments sélectionnés pour l'analyse ont été choisis en fonction de l'intensité et de la masse de ceux-ci. En effet, plus la masse d'un fragment est élevée, plus elle risque d'être spécifique à l'analyte. Au contraire, plus la masse d'un fragment est petite, plus il peut correspondre à des fragments résiduels d'un mélange complexe. Ensuite, l'énergie de collision est optimisée afin d'obtenir les signaux de fragments les plus intenses. Une collision entre les analogues de biguanide et l'hélium a été provoquée à différents niveaux d'énergie pour avoir les spectres de fragments ayant les meilleures intensités. Selon la littérature, l'énergie de collision optimale pour des molécules organiques comme les biguanides se trouve entre 0 et 70 keV.⁹⁸ Suite à cette

optimisation, les signaux les plus intenses pour les ions fragments sélectionnés sont produits avec une énergie de collision de 33 keV.

Comme il est possible de voir à la **Figure 11**, chaque fragment est propre à une seule molécule. Pour l'hexylbiguanide, le fragment caractéristique est à m/z de 60. De plus, avec l'optimisation de l'énergie de collision, un autre fragment à m/z de 144 apparaît (non visible sur le spectre de masse) et donne une plus grande certitude quant à l'analyse de ce composé puisque sa masse est plus grande. Pour le PEBB, le fragment majoritaire sélectionné pour l'étude est le fragment à m/z de 191, correspondant à la chaîne phényléthylbenzyle (PEB) et donc à la perte de la partie biguanide. Pour la phenformine, le fragment caractéristique choisi est celui à m/z de 105 qui représente la chaîne éthylbenzène et donc la perte de la portion biguanide. Les transitions ion parent / ion fragment choisies (MRM) pour ces trois biguanides donnent une certitude quant à leur présence et permettront leur quantification absolue dans les matrices biologiques.

2.3 Quantification des dérivés de type biguanide dans le plasma

Une méthode analytique a été développée et optimisée afin de quantifier les analogues de type biguanide dans le plasma des souris qui ont reçu l'administration d'un seul de ces composés comme traitement. Premièrement, il se devait de choisir un étalon interne (ÉI) ayant un profil d'ionisation similaire aux biguanides d'intérêt afin d'obtenir un signal de référence pour chaque analyte injecté dans l'instrument. Lors de la quantification du PEBB, l'hexylbiguanide est utilisé comme ÉI, car c'est celui qui a un profil d'ionisation similaire. À l'inverse, lors de la quantification de l'hexylbiguanide, le PEBB est utilisé comme ÉI pour la même raison. La phenformine utilise également l'hexylbiguanide comme ÉI. Par exemple, lors de la quantification du PEBB, si l'hexylbiguanide est toujours 2 fois plus intense que le PEBB, on pourra normaliser les résultats pour que l'intensité du PEBB soit toujours 2 fois moins élevée que celle de l'ÉI. Pour chaque analyse, un contrôle qualité (CQ) a été injecté dans l'instrument pour vérifier la validité de la méthode et de l'instrument. Les CQ sont des échantillons de plasma commerciaux dopés et les concentrations varient d'un CQ à un autre. Il est donc possible de savoir le pourcentage d'erreur sur une mesure grâce au CQ.

2.3.1 Courbes d'étalonnage

L'analyse de l'absorption, distribution et élimination des dérivés biguanidium est très importante afin de savoir comment ils se comportent dans un système complexe comme la souris. Lors des expériences sur les souris de laboratoire (le protocole est présenté dans la **section 2.4.1**), certaines d'entre-elles ont subi un traitement afin d'analyser le comportement d'absorption des composés biguanides. En effet, plusieurs prélèvements sanguins ont été recueillis à différents temps après l'administration des composés. Pour l'analyse, des courbes d'étalonnage ont été faites grâce à plusieurs solutions d'analytes dont la concentration était connue. D'abord, deux types de courbes d'étalonnages ont été faites afin de savoir laquelle était la plus appropriée pour les analyses. Les premières solutions servant à faire la courbe d'étalonnage ont été faites dans un solvant organique, l'acétonitrile, tandis que les deuxièmes solutions ont été faites dans le plasma de souris commercial. Les deux options ont été testées afin de déterminer la meilleure courbe d'étalonnage pour la quantification des analogues de type biguanide (**Figure 12**).

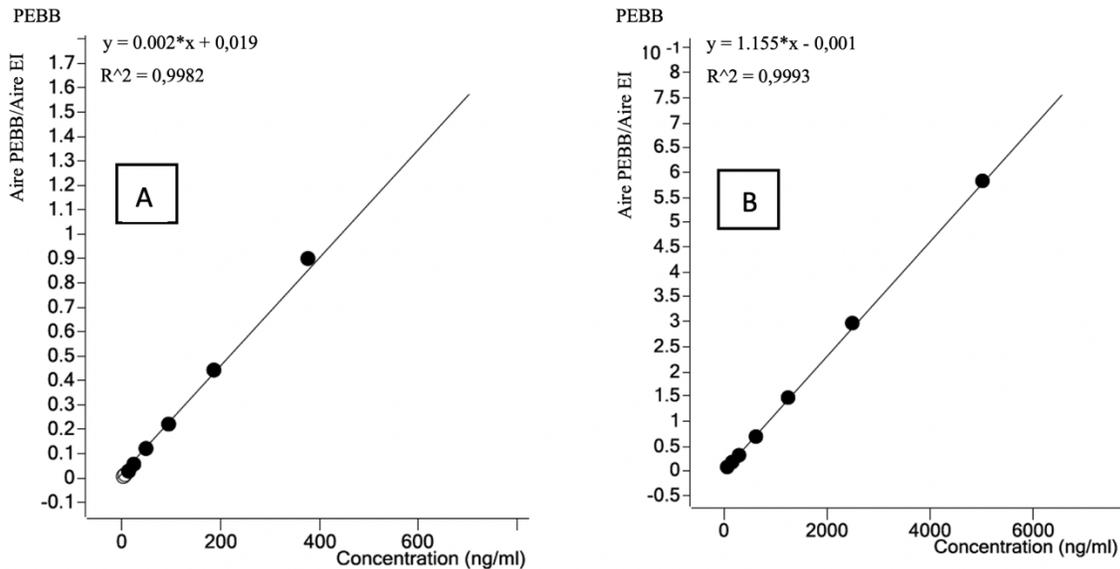


Figure 12 Courbes d'étalonnage du PEBB (A) dans l'acétonitrile et (B) dans le plasma de souris. Les deux courbes d'étalonnage représentent le rapport des aires entre le PEBB et l'étalon interne en LC-MRM en fonction de la concentration du PEBB. (EI = hexylbiguanide). Les points blancs sont exclus de la courbe d'étalonnage.

La comparaison de ces deux courbes d'étalonnage révèle qu'il n'y a pas une différence majeure. En effet, bien que le R^2 de la courbe d'étalonnage B (dans le plasma de souris) démontre une meilleure linéarité que celle de la courbe d'étalonnage A (dans le solvant organique), les deux sont valide à des fins de quantifications. Des CQ seront inclus dans l'analyse lors des expériences de quantifications présentées dans les sections suivantes. Puisque que B tient compte des effets de matrice, il est donc plus approprié et est un milieu plus représentatif, celui-ci a été choisi pour effectuer les futurs courbes d'étalonnage qui seront présentées.

2.3.2 Cinétique du PEBB et de l'hexylbiguanide dans les souris

Comme les données pharmacocinétiques sont importantes pour comprendre le comportement d'un nouveau médicament, une étude *in vivo* a été faite en administrant par injection intrapéritonéale (IP) du PEBB et de l'hexylbiguanide dans les souris (groupe I et II). Des prélèvements sanguins ont été faits à différents moments après l'administration des composés (30 min, 60 min, 120 min et 240 min). La section 2.4.1 de la partie expérimentale détaille les expériences avec les souris. Chaque échantillon a été purifié en faisant précipité les protéines et biomolécules trop volumineuses pour la colonne chromatographique (**Figure 13**). Par la suite, il ne suffit que de filtrer et récupérer le surnageant, où se trouve les biguanides à quantifier.

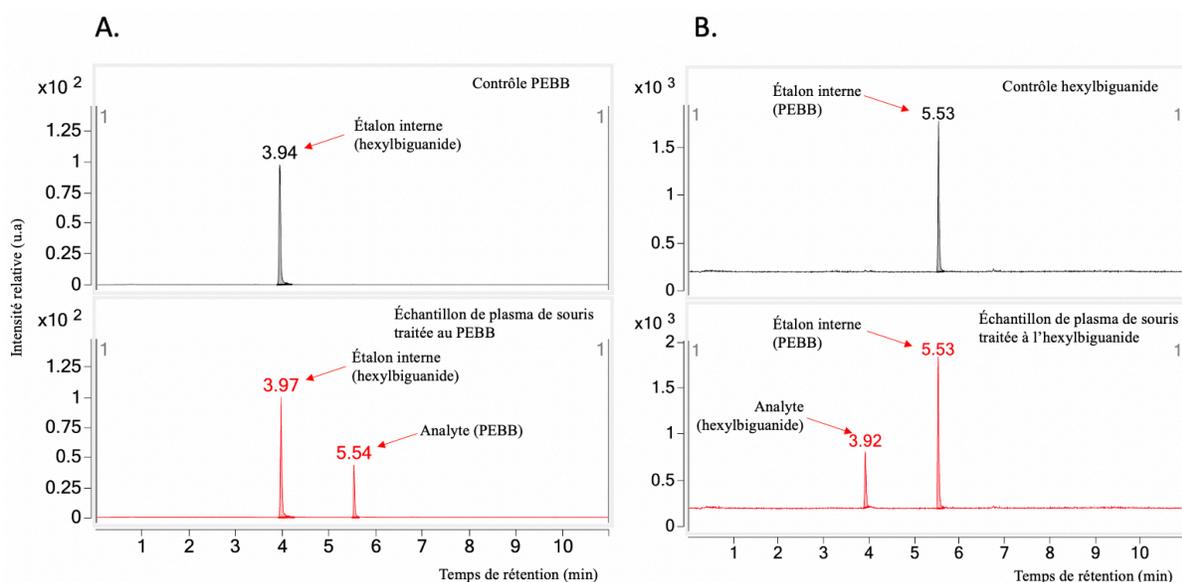


Figure 13 Chromatogrammes des ions extraits par analyses MRM pour (A) l'analyse du PEBB et (B) pour l'analyse de l'hexylbiguanide dans le plasma de souris. Tous les échantillons ont été préalablement purifiés en faisant précipité les protéines suivies d'une filtration afin de rendre les chromatogrammes propres et d'augmenter la résolution des signaux.

Les chromatogrammes de la **Figure 13** montrent les signaux du PEBB et de l'hexylbiguanide suite à leur extraction du plasma à différents temps après l'administration. L'identité de chaque signal a été confirmée par l'analyse en MRM avec les patrons de fragmentation propres à chaque composé (**section 2.2 - Figure 11**). Les chromatogrammes étant très propres, la mesure de l'aire sous la courbe de chaque signal est réalisée dans le but de calculer la concentration. Comme mentionné plus haut, dépendamment de l'analyse, le PEBB sert d'étalon interne pour l'analyse de l'hexylbiguanide et l'hexylbiguanide sert d'étalon interne pour l'analyse du PEBB. De plus, l'hexylbiguanide est détecté avec un temps de rétention d'environ 3,9 minutes tandis que le PEBB est détecté à environ 5,5 minutes. Cela s'explique par l'affinité avec la colonne chromatographique. Comme la colonne utilisée est une phase inverse, c'est-à-dire la phase stationnaire est apolaire, le PEBB est retenu plus longtemps que l'hexylbiguanide comme il est plus apolaire. Leur temps de rétention différents est un autre avantage lors de la quantification de ces composés, car une co-élution rendrait l'étude plus difficile.

Une courbe d'étalonnage dans le plasma de souris a été faite pour chaque biguanide afin de les quantifier. (**Figure 14**).

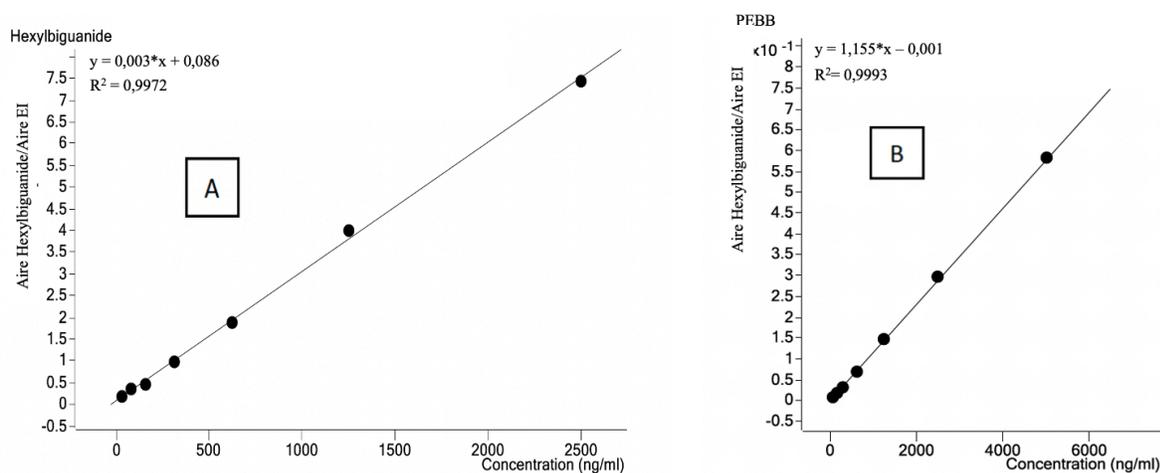


Figure 14 Courbe d'étalonnage dans le plasma pour la quantification de l'hexylbiguanide (A) et du PEBB (B). Chaque courbe d'étalonnage représente le ratio des aires des signaux de biguanides par rapport à l'aire des signaux des EI fonction de la concentration des dérivés biguanidium par LC-MRM. Lors de l'analyse de l'hexylbiguanide, EI = PEBB. Lors de l'analyse du PEBB, EI = hexylbiguanide.

La valeur du R^2 des courbes d'étalonnage permet de valider la gamme linéaire. La quantification d'analytes à l'aide de celles-ci sera donc possible dans le domaine de concentration

choisie. Durant l'injection des échantillons, les CQ ont été injectés également. Le CQ est du plasma commercial dopé à 50 ng/mL mesuré 3 fois afin d'avoir une moyenne sur les mesures (**Tableau I**). Des échantillons de plasma de souris injectées avec une solution sans biguanide en guise de contrôles négatifs ont été analysés et leurs concentrations sont sous la limite de détection de l'instrument, ce qui implique que les quantités sont nulles ou négligeables pour l'expérience. Ainsi, la quantification des composés peut être exécutée interférences.

Tableau I. Valeur des contrôles qualité (CQ) ainsi que du pourcentage d'erreur sur les mesures par LC-MRM à partir d'une solution de PEBB à 50 ng/mL.

	Concentration (ng/ml)	Moyenne	Pourcentage d'erreur	Coefficient de variation
CQ 1	46,8			
CQ 2	48,0	47,6 ± 0,7	4,7%	1,5%
CQ 3	48.1			

Selon les mesures des CQ, le pourcentage d'erreur est d'environ 5% signifiant que les mesures obtenues pour la quantification des échantillons sont justes et précises, car un seuil d'erreur de 5% est acceptable lors de la quantification par LC-MS. Il faut tenir compte cependant de la valeur du CQ choisie qui est dans les faibles concentrations de la gamme d'étalonnage. Normalement, un CQ idéal se situe au centre de la gamme d'étalonnage et s'éloigne le plus possible des extrémités de celle-ci. Il pourrait être source de légère erreur, mais les données montrent, grâce au calcul du coefficient de variation qui est de seulement 1,5%, que la précision est très bonne et c'est pourquoi les mesures ont été prises afin de quantifier le PEBB et l'hexylbiguanide dans le plasma de souris. La **Figure 15** montre la cinétique du PEBB et de l'hexylbiguanide dans le plasma selon le temps.

À première vue, il semble que le PEBB entre plus facilement dans la circulation sanguine que l'hexylbiguanide. Les paramètres pharmacocinétiques ont été calculés grâce aux équations présentées dans **section 1.3**. Les données utilisées sont celles qui ont été mesurées et qui sont représentées dans la **Figure 15**. Les paramètres pharmacocinétiques calculés sont disponibles dans le **Tableau II**

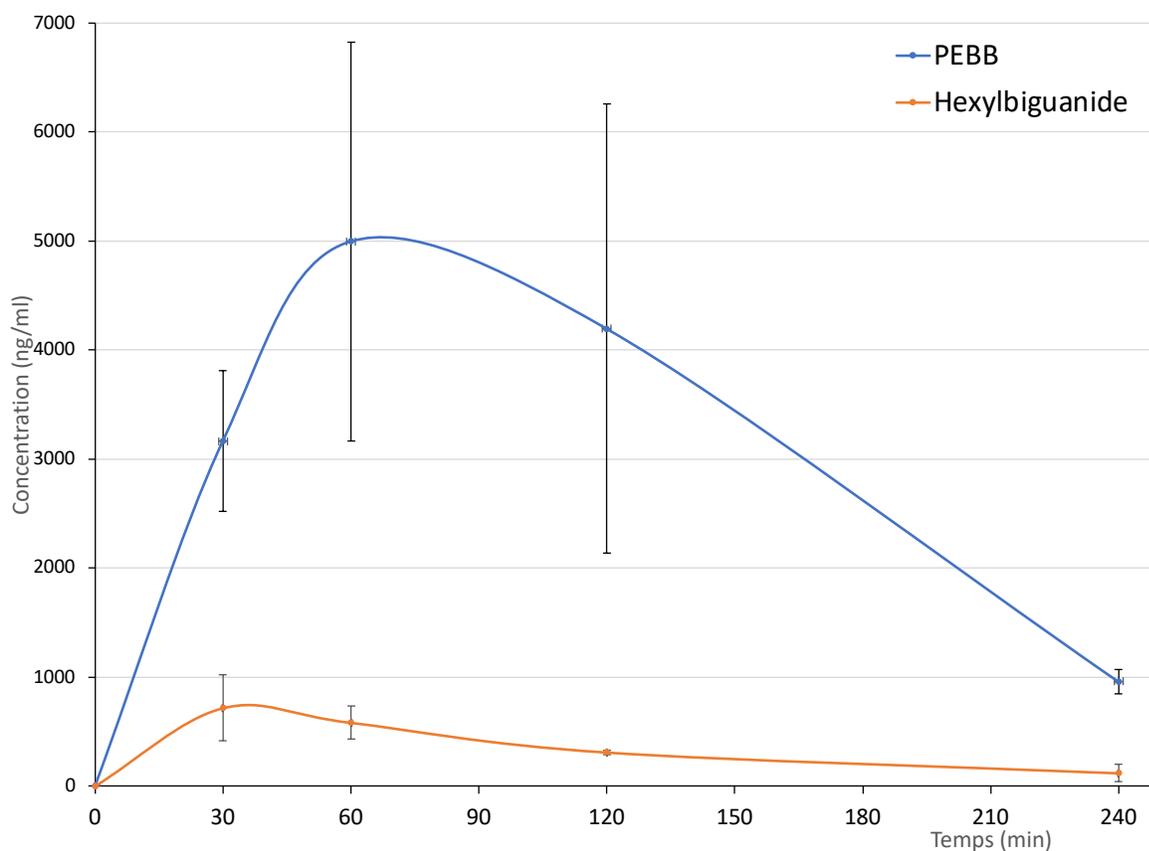


Figure 15 Concentrations plasmatiques du PEBB et de l'hexylbiguanide en fonction du temps après l'administration d'une dose unique. Les doses basées sur les IC₅₀ sont de 35 mg/kg pour le PEBB et 50 mg/kg pour l'hexylbiguanide. n = 3 pour chaque donnée. Masse corporelle moyenne pour les souris : 16 grammes

Tableau II. Paramètres pharmacocinétiques du PEBB et de l'hexylbiguanide dans les souris.

<i>Paramètres</i>	<i>Unité</i>	<i>PEBB</i>	<i>Hexylbiguanide</i>
D	mg/kg	35,0	50,0
C _{max}	ng/ml	5x10 ³ ± 2x10 ³	8x10 ² ± 1x10 ²
T _{max}	h	1,2 ± 0,3	0,7 ± 0,3
k _a (éq 2)	h ⁻¹	1,9 ± 0,3	2,7 ± 0,9
k _e (éq 3)	h ⁻¹	0,27 ± 0,03	0,5 ± 0,2
T _{1/2}	h	2,7 ± 0,3	1,8 ± 0,7
V _d (éq 4)	L/kg	9 ± 2	56 ± 11
CL (éq 7)	L*kg ⁻¹ h ⁻¹	1,7 ± 0,7	28 ± 11

Les paramètres du **Tableau II** permettent d'obtenir de l'information quant au comportement pharmacologique de ces composés dans la souris. Le PEBB semble entrer dans la circulation sanguine plus rapidement que l'hexylbiguanide puisque la pente pour atteindre la concentration maximale est plus grande. Il semble également entrer plus abondamment dans la circulation sanguine comme son C_{\max} est environ 6 fois plus grand que celui de l'hexylbiguanide et ce, bien que la dose de PEBB soit inférieure à celle de l'hexylbiguanide. On peut néanmoins remarquer que l'hexylbiguanide possède une constante d'absorption et d'élimination plus élevée, ce qui fait en sorte qu'il est assimilé et excrété plus rapidement de l'organisme. Ceci se confirme par le fait que le temps de demi-vie soit plus faible que celui du PEBB. Sur la **Figure 15**, la concentration d'hexylbiguanide est presque complètement éliminée de la circulation sanguine à 240 minutes tandis qu'au même temps, le PEBB est environ éliminé à 80%. En effet, on constate dans le **Tableau II** que le temps de demi-vie du PEBB est environ deux fois plus grand, concordant ainsi avec le fait qu'il quitte la circulation sanguine plus lentement que l'hexylbiguanide.

Le volume de distribution des deux composés est très différent. En revanche, dans les deux cas, le volume calculé est élevé pour le volume estimé de liquide contenu dans une souris (environ 15 mL). Ces résultats ne sont pas improbables, car la valeur calculée n'est pas un volume tangible, mais plutôt un ordre de grandeur. Les volumes de distribution suggèrent plusieurs hypothèses, notamment pour l'hexylbiguanide qui a un volume excessivement grand. Habituellement, un volume de telle envergure évoque l'accumulation d'un composé dans les lipides ou dans les membranes lipidiques, car le volume aqueux pour dissoudre le composé est très élevé. Bien que le PEBB ait également un volume de distribution élevé pour une souris, celui-ci suggère plutôt une dispersion dans les tissus, car son volume est tout de même plus faible, mais il est également possible qu'une partie s'accumule dans les lipides également. Pour déterminer où le PEBB s'accumule préférentiellement, la méthode développée par MALDI-TOF sera donc extrêmement utile afin de localiser et quantifier sa bioaccumulation.

Pour finir, la clairance est un paramètre intéressant qui détermine la capacité d'éliminer une quantité d'un composé par unité de temps. Ainsi, plus la clairance est grande, plus le composé est excrété de l'organisme. L'hexylbiguanide est plus rapidement éliminé que le PEBB. En effet, c'est ce qui pourrait aussi expliquer que le temps de demi-vie du PEBB est plus grand que celui de l'hexylbiguanide. Ainsi on peut conclure que ces deux composés ont des profils d'absorption, de

distribution et d'élimination différents. L'hexylbiguanide semble plutôt s'accumuler dans les tissus adipeux alors que le PEBB pourrait s'accumuler dans tous les types de tissus.

Il est à prendre en note que plusieurs autres expériences pourraient être faites afin mieux comprendre l'absorption et la distribution des composés dans l'organisme. Il serait possible de mesurer l'affinité des dérivés de type biguanide aux protéines plasmiques. Cela pourrait donner plusieurs informations quant à l'absorption, mais également par rapport à l'élimination des composés. Le métabolisme de ces composés serait également à investiguer afin de savoir si la clairance est dépendante des biotransformations. En effet, si on compare les dérivés biguanidium avec la metformine, ceux-ci ont une chaîne apolaire supplémentaire. La metformine, étant hydrophile et polaire, n'a pas besoin de subir de biotransformation, elle est directement excrétée dans l'urine et ou hydrolysé pour donner des fragments guanidine. L'ajout d'une chaîne apolaire et hydrophobe pourrait influencer le métabolisme et par conséquent la clairance du PEBB et de l'hexylbiguanide. L'ajout de groupements polaires par les enzymes responsables du métabolisme pourrait être nécessaire afin d'augmenter la solubilité afin de rendre l'excrétion rénale possible. Une série d'expériences serait intéressante à réaliser et d'observer les modifications métaboliques subites par ces deux composés et voir leur impact sur la clairance.

2.3.3 Quantification des dérivés de type biguanide en tant qu'agent anticancéreux

Comme les analogues de type biguanide ont démontrés une efficacité contre les cellules cancéreuse du cancer du pancréas, plusieurs souris ayant une tumeur xénogreffée de type PDAC ont été traitées avec ces composés durant 13 jours dès que la xénogreffe est stable dans l'organisme. Quotidiennement, un groupe de souris (groupe III) recevaient une dose IP de PEBB (35 mg/kg) ou de phenformine (55 mg/kg) ou d'hexylbiguanide (35mg/kg). La présence de tumeurs pourrait influencer l'absorption d'un médicament, car elles sont souvent vascularisées. Comme elles prennent beaucoup plus de nutriments que les cellules saines en raison de leur besoin énergétique supérieur, les tumeurs surexpriment les facteurs de vascularisation pour augmenter la biosynthèse de vaisseaux sanguins afin de leur apporter tout ce qu'il leur faut pour croître. Ainsi, la cinétique d'absorption d'un médicament peut varier si celui-ci est hautement dirigé dans les tumeurs. C'est pourquoi plusieurs échantillons sanguins de souris traitées au PEBB, à l'hexylbiguanide ou à la phenformine ont été prélevés 90 minutes après la dernière dose administrée.

Pour ce faire, la concentration plasmatique des souris traitées avec le PEBB, l'hexylbiguanide ainsi que la phenformine a été déterminée. Pour la quantification de la phenformine, une courbe d'étalonnage a été faite dans le plasma de souris commercial afin de mieux représenter le réel milieu de quantification (**Figure 16**)

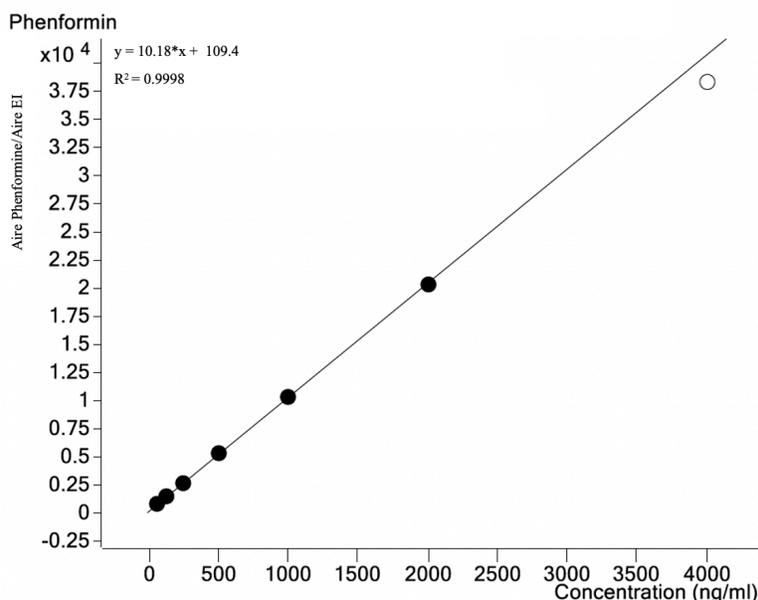


Figure 16 Courbe d'étalonnage dans le plasma de souris pour la quantification de la phenformine. Pour chaque concentration désignée, il est possible de voir l'intensité relative des signaux correspondant à la phenformine. Les points blancs sont exclus de la droite d'étalonnage. (EI = hexylbiguanide)

Pour la quantification du PEBB, la courbe d'étalonnage présentée dans la **section 2.3.2 – Figure 14** a été utilisée, car l'expérience s'est faite la même journée. Également, les CQ présentés dans la **section 2.3.2 – Tableau I** ont été injectés dans la même journée et sont encore pertinents pour cette expérience. Ainsi, l'erreur sur les mesures de l'instrument est d'environ 5%. L'hexylbiguanide a été utilisé comme ÉI pour la quantification de la phenformine. Les temps de rétention présentent un intervalle de temps adéquat pour séparer ces composés. De plus, les profils d'ionisation de l'hexylbiguanide et de la phenformine sont similaires. La **Figure 17** montre le chromatogramme de la phenformine et d'un contrôle.

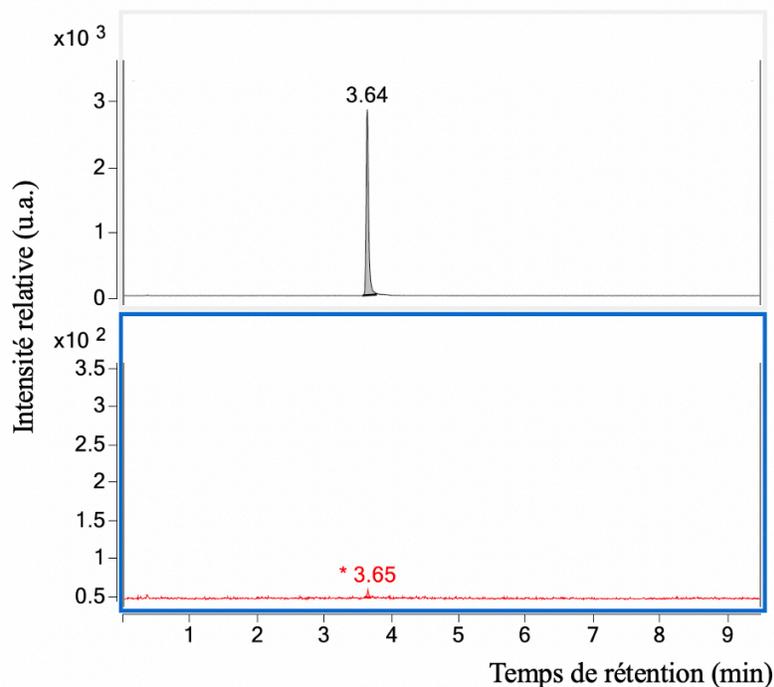


Figure 17 Chromatogramme d'ion extrait type de la phenformine. En noir : chromatogramme d'un échantillon de plasma d'une souris traitée avec la phenformine à 50 mg/kg. En rouge : chromatogramme d'un échantillon de plasma d'une souris contrôle injectée avec un véhicule sans composé. Le temps de rétention de la phenformine est de 3,64 minutes. Les échantillons ont été préalablement extraits afin d'améliorer l'intensité et la propreté des signaux.

Comme il est possible de voir à la **Figure 17**, le chromatogramme de l'échantillon contrôle semble avoir un signal qui correspondrait à la phenformine. Cependant, le ratio signal sur bruit de fond (S/N) de la ligne de base est inférieur à 10. Pour considérer un signal, il doit être au moins 10 fois plus grand que le bruit de fond, ainsi ce signal est négligeable, car il n'influence aucunement les résultats de quantification.

Comme pour les autres quantifications, une courbe d'étalonnage a été faite pour l'hexylbiguanide. Cependant, lors de l'analyse de ce composé, le signal était déformé et non quantifiable (**Figure 18**).

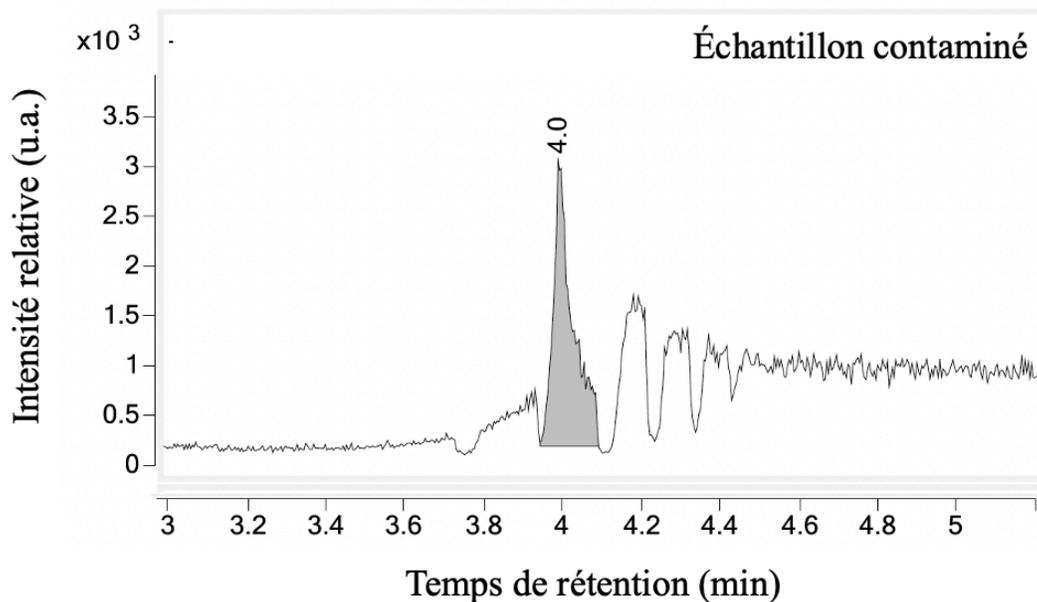


Figure 18 Exemple de chromatogramme où l'échantillon est contaminé (noir).

Dans le chromatogramme de l'échantillon contaminé, la ligne de base est distordue par rapport à celle du contrôle. Le rapport S/N est donc trop faible, ainsi la quantification n'est pas possible. De plus, pour le cas de l'hexylbiguanide, le contaminant co-élue, ce qui fait que la concentration mesurée par l'aire sous le signal est faussée. Tous les échantillons de plasma de souris traitées avec l'hexylbiguanide ont été contaminés. C'est pourquoi un échantillon contrôle de plasma de souris traitée a été analysé dans un LC-TOF afin de savoir quelle impureté contamine les échantillons afin de procéder à une purification supplémentaire (**Figure 19**).

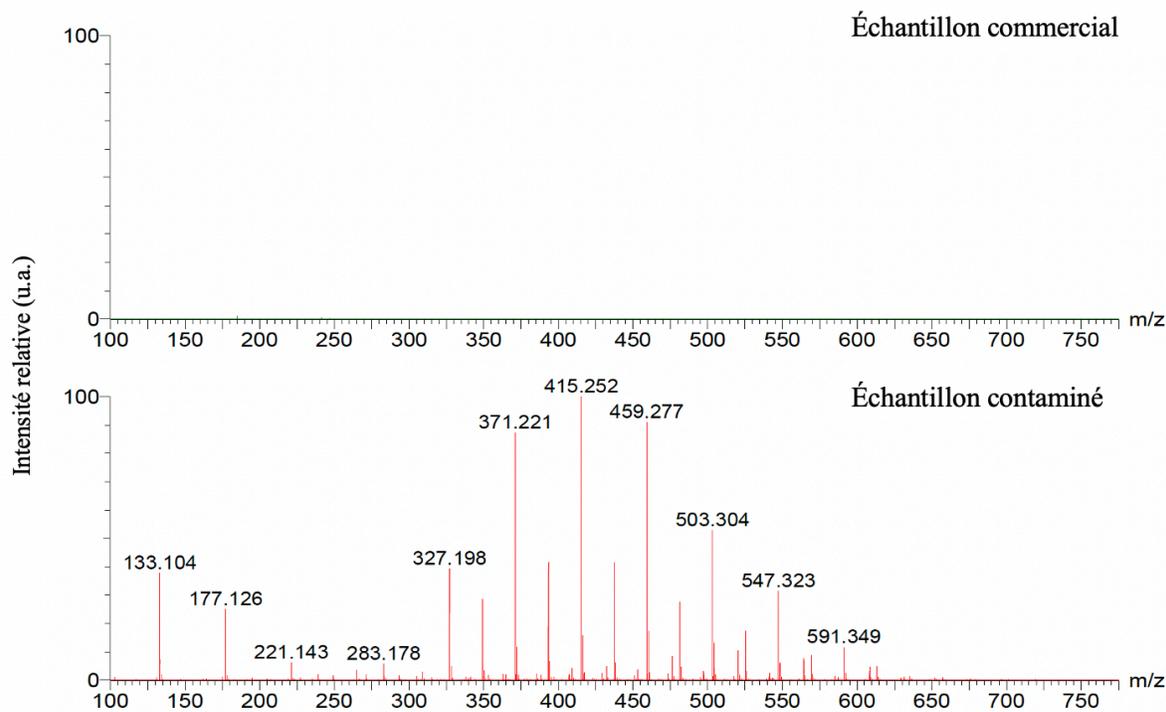


Figure 19 Spectre de masse LC-TOF d'un échantillon contaminé par rapport à un échantillon de référence.

Le spectre de masse à un temps de rétention de 4,0 minutes de l'échantillon contaminé à la **Figure 19** montre qu'une multitude de signaux s'y trouvent. Néanmoins, grâce aux bases de données en MS, il a été possible d'identifier un patron particulier présentant des distributions avec des différences de 44 Da entre les pics de masse correspondant à un contaminant de type polyéthylène glycol (PEG). Ce genre de contamination est souvent reportée dans la littérature lorsqu'il s'agit d'expérience avec des souris traitées.⁹⁹ L'ajout de PEG en tant qu'excipient est commun dans plusieurs solutions véhicules afin d'augmenter la solubilité de certains composés.⁹⁹ Comme le PEG est biocompatible, il ne présente aucun risque lors de son administration, cependant, il peut causer de la contamination comme dans le cas présent.

Afin de décontaminer les échantillons, une purification a été optimisée en utilisant une résine échangeuse d'ions. Comme les biguanides sont cationiques à pH neutre, il est possible d'utiliser une résine chargée négativement à pH > 5. Ainsi, les biguanides seront retenus sur la résine et le PEG, étant neutre, pourra être élué. Une fois, cette étape complétée, il suffit d'acidifier la résine afin de la rendre cationique et ainsi permettre l'éluion des biguanides. Les échantillons

contaminés ont tous été purifiés de cette façon rendant la quantification désormais possible (**Figure 20**).

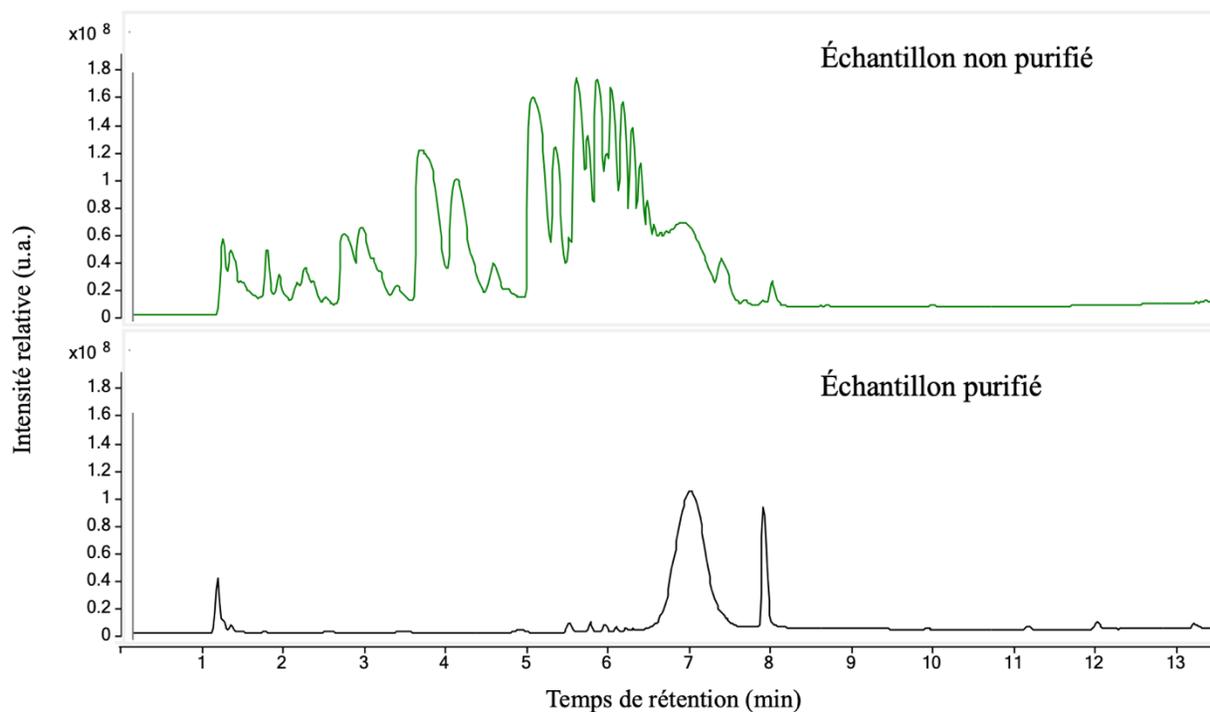


Figure 20 Chromatogramme d'un échantillon de plasma dopé à l'hexylbiguanide ($m/z = 186$) avant purification (vert) et après purification (noir). Les échantillons ont été injectés dans un LC-TOF. Il est possible de voir les contaminants abondants dans le chromatogramme vert comparativement à celui de l'échantillon purifié.

Puisque que la purification fonctionne bien, une courbe d'étalonnage a été faite pour la quantification de l'hexylbiguanide (**Figure 21**). Pour le PEBB et la phenformine, les courbes d'étalonnages précédemment présentées dans la **section 2.3.2 et 2.3.3** ont été utilisées puisque ces échantillons ont été analysés la même journée. De nouveaux CQ ont été injectés pour cette expérience (**Tableau III**).

Tableau III. Valeurs des contrôles qualité (CQ) ainsi que le pourcentage d'erreur sur les mesures mesurées par LC-MRM à partir d'une solution PEBB de 2000 ng/ml.

	Concentration (ng/ml)	Moyenne	Pourcentage d'erreur	Coefficient de variation
CQ 1	2183,9			
CQ 2	2367,6	2208,8 ± 147,9	7,4%	6,7%
CQ 3	2074,9			

Le pourcentage d'erreur, étant d'environ 7%, est un peu plus élevé que ce qui est attendu, mais il est toujours possible d'analyser les données en raison de la linéarité de la courbe d'étalonnage illustrée par sa valeur de R^2 . Évidemment, le pourcentage d'erreur sera à tenir en considération lors de l'analyse des résultats.

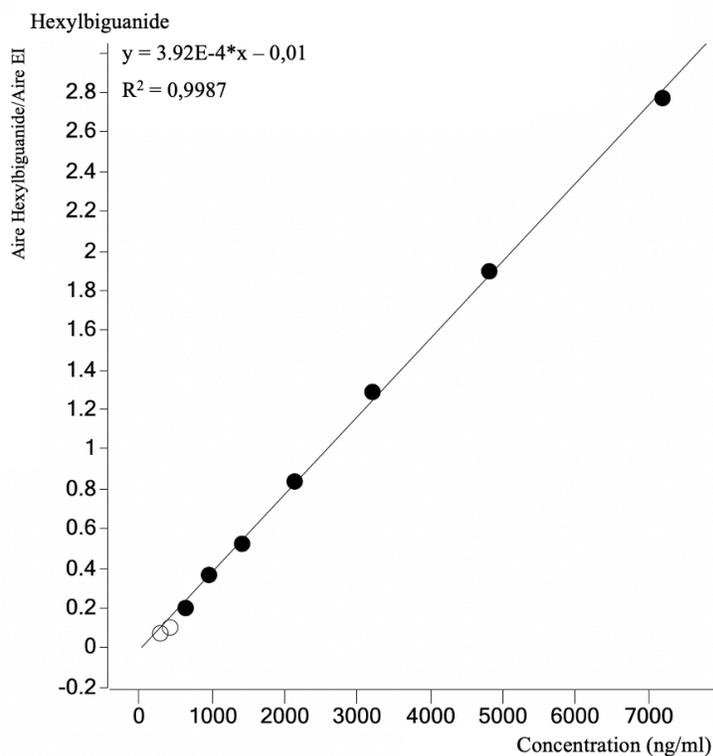


Figure 21 Courbe d'étalonnage pour la quantification de l'hexylbiguanide dans le plasma des souris. Tous les étalons ont été analysés par LC-MRM. Les points blancs ont été exclus de la courbe d'étalonnage. (EI = PEBB)

La quantification dans le plasma de l'hexylbiguanide, du PEBB ainsi que de la phenformine a donc été effectué sur des souris en tant qu'agent anticancéreux (**Figure 22**)

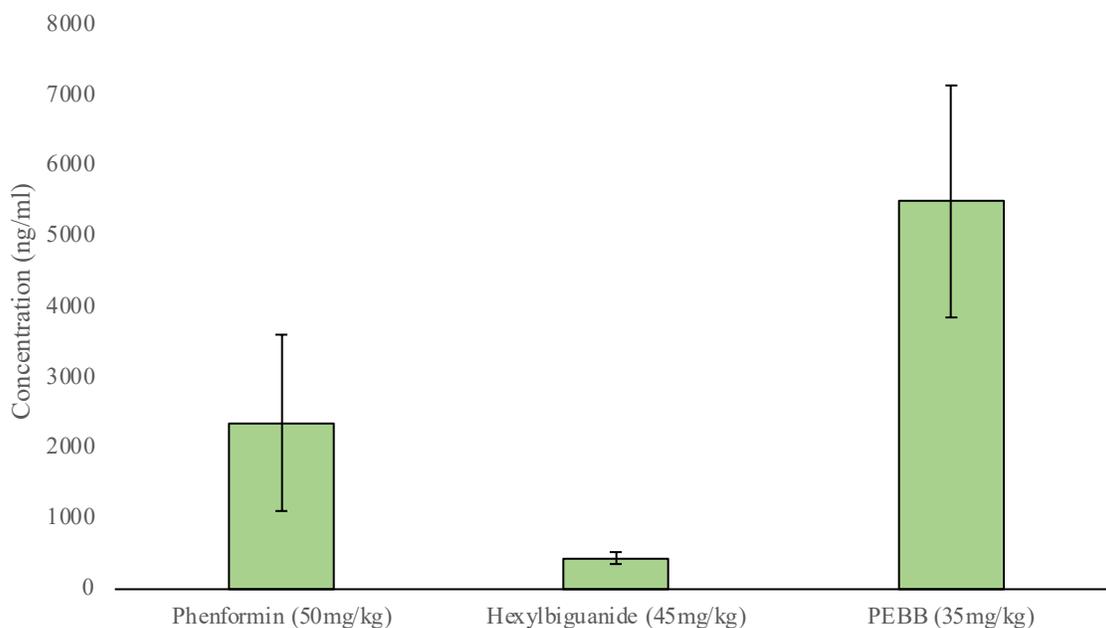


Figure 22 Concentration plasmatique moyenne des souris traitées avec les dérivés de type biguanide 90 minutes après la dernière injection. Les erreurs sur les mesures sont calculées grâce à l'écart type de la moyenne (n = 6).

Bien que l'erreur sur la mesure de la concentration plasmatique de phenformine et de PEBB soit plus grande, les valeurs moyennent semblent concorder avec les résultats des expériences précédentes. En effet, la même tendance se présente : l'hexylbiguanide correspond à la plus petite concentration plasmatique, suivi de la phenformine et du PEBB où sa concentration plasmatique est significativement plus élevée. Les concentrations plasmatiques moyennes de l'hexylbiguanide, de la phenformine ainsi que du PEBB sont respectivement de 426 ± 84 ng/mL, 2350 ± 1251 ng/mL et 5492 ± 1640 ng/mL. Cela suggère que les trois composés ont un mécanisme et une cinétique d'absorption différents.

Des études complémentaires seront abordées dans le chapitre 3 afin de faire le lien entre l'absorption et la distribution dans les tissus de ces mêmes souris traitées.

Somme toute, dans ce chapitre, une méthode par LC-MS a été développée afin de quantifier des dérivés de type biguanide dans le plasma. Cette méthode est linéaire et reproductible. Elle permet de mesurer des concentrations dans l'ordre du nanomolaire. Il est également possible

d'obtenir de l'information quant à la cinétique d'absorption des composés et indirectement sur leur élimination. Cette méthode montre des résultats concluants qui permettent de confirmer que celle-ci est appropriée pour ce type d'analyse.

2.4 Partie expérimentale

2.4.1 Expériences sur les souris

Toutes les expériences faites sur les souris ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr. Michael Pollak (département de médecine et d'oncologie, université McGill) selon un protocole approuvé par le comité de bioéthique des établissements concernés. Pour tous les groupes de souris, le plasma et les organes d'intérêts sont prélevés et congelés dans un congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Groupe I (études pharmacocinétiques) : Les souris BALB/c (10,7 - 20,6 g) ont été traitées pendant 9 jours avec des doses intrapéritonéales de phényléthynylbenzyle biguanide (PEBB) 35 mg/kg (n = 15). Au dernier jour de traitement, les souris ont été sacrifiées à différents moments (30 min, 60 min, 120 min, 240 min) après la dernière injection. n=3 pour chaque temps.

Groupe II (études pharmacocinétiques) : Les souris BALB/c (15,8 - 21,3 g) ont été traitées pendant 9 jours avec des doses intrapéritonéales d'hexylbiguanide 50 mg/kg (n = 15). Au dernier jour de traitement, les souris ont été sacrifiées à différents moments (30 min, 60 min, 120 min et 240 min) après la dernière injection. n=3 pour chaque temps.

Groupe III : Les souris 4T1 (17 – 22,7 g) ont subi une xénogreffe de tumeur pancréatique de type PDAC. 28 jours après la xénogreffe, le traitement débute pour une durée de 13 jours. Quotidiennement, une dose est injectée selon une des conditions suivantes : phenformine 55 mg/kg (n = 6), PEBB 35 mg/kg (n = 6) ou hexylbiguanide 45 mg/kg (n = 6). Les souris sont sacrifiées 90 minutes après la dernière injection.

2.4.2 Préparation des échantillons de plasma de souris

Chaque échantillon de plasma a été prélevé (10µL à 50µL) des souris à la suite du sacrifice de celle-ci par asphyxie par CO₂. Les échantillons ont été immédiatement congelé à l'aide d'azote liquide et placé dans un congélateur à -80°C.

Tout d'abord, l'étalon interne choisi pour l'analyse est ajouté à l'échantillon plasmatique. Ensuite, les protéines ont été précipitées en ajoutant 8 fois le volume d'acétonitrile froid par rapport au volume de l'échantillon plasmatique. Le tout est ensuite mélangé à l'aide d'un vortex pendant un minimum de 15 minutes à température pièce. Par après, l'échantillon est incubé à -20°C durant 30 minutes pour faire précipiter le plus de protéines possibles. Pour finir, l'échantillon est ensuite filtré sous vide avec des pores d'une taille de 80 Å et le filtrat est recueilli pour l'analyse. Prendre note que chaque échantillon a été dilué 20 fois pour pouvoir être analysable par LC-MS.

2.4.3 Purification des échantillons contaminés par le PEG

Afin de retirer les contaminants PEG, les échantillons ont préalablement été préparés pour l'analyse, c'est-à-dire que les ÉI ont été ajoutés avant la purification. Pour la purification, une plaque 96 puits d'extraction sous phase solide *Oasis WCX* a été utilisée. D'abord, les puits utilisés de la plaque WCX sont conditionnés avec 200 µl de méthanol (MeOH) suivi de 200 µl d'eau milliQ de grade HPLC. La plaque est mise sous vide afin d'éluer plus facilement les solvants. Une fois les puits conditionnés, ils ont été chargés avec les échantillons à analyser. Afin de favoriser l'interaction entre la phase WCX et les analytes, les échantillons ont été filtrés par gravité. Ensuite, une première étape de lavage a été réalisée en ajoutant 200 µl d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) 5% dans l'eau. Cette étape est répétée une fois. Une deuxième étape de lavage est effectuée en ajoutant 200 µl de MeOH. Cette étape est répétée une fois. Une fois les lavages terminés, l'étape d'élution suit en ajoutant 50 µl d'acide formique 2% dans l'eau. L'élution est répétée une deuxième fois afin de récolter tout l'analyte. Afin de laver les puits après l'étape d'élution, 500 µl d'eau est ajouté aux puits et est laissé filtrer par gravité.

Les échantillons purifiés peuvent être injectés dans l'instrument pour l'analyse en suivant les conditions de la **section 2.4.4**

2.4.4 Conditions de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse pour la quantification des biguanides

La séparation des composés a été faite grâce à une colonne Extend-C18 Agilent Tech. 2.1 x 50 mm avec des particules de 1.8 μm . La phase mobile est composée de deux éluants : A, H₂O avec acide formique 0,1% et B, acétonitrile avec acide formique 0,1%. Le gradient d'élution est de 0% à 95% B en 11 minutes. Le volume d'injection de chaque échantillon est de 1 μL . L'acquisition des données et la détection des composés et des étalons internes ont été faites en utilisant un LC-MS QqQ Agilent 6490 en mode positif (ESI+) et par MRM. Les m/z utilisés pour la détection en MRM sont : 292.0 \rightarrow 191.1 pour le PEBB, 186.1 \rightarrow 144.1 et 186.1 \rightarrow 60.2 pour l'hexylbiguanide ainsi que 206.1 \rightarrow 105.0 pour la phenformine.

Chapitre 3 - Quantification et imagerie de dérivés de type biguanide dans les tissus par MALDI-TOF-MS

3.1 Mise en contexte

La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) est une technique d'ionisation, considérée comme douce, grandement utilisée en spectrométrie de masse. Cette technique a connu un essor de popularité depuis les 20 dernières années principalement grâce à son utilité dans l'analyse de macromolécules biologiques comme les protéines, lipides et glucides. Le séquençage protéique et peptidique par MALDI-TOF-MS a aussi fortement contribué à la popularité de cette technique, car elle est rapide et hautement efficace comparativement aux méthodes traditionnelles.^{100, 101} L'un des grands avantages de la technique MALDI est qu'elle favorise la formation d'ions moléculaires simplement chargés. Cela permet donc l'analyse de mélanges complexes de biomolécules en minimisant la superposition des pics de masse.

Une des applications courantes qui rend cette méthode si intéressante est l'imagerie par spectrométrie de masse (IMS). Comme il est possible de faire l'analyse de surfaces solides par MALDI-TOF-MS, il est possible d'analyser des fines coupes de tissus ainsi que leur contenu moléculaire afin de produire une image de l'échantillon. Des études de colorations complémentaires peuvent être faites afin de mettre en relation l'IMS et les analyses histologiques de tissus.^{102, 103} Cet outil a permis de faire plusieurs analyses dans le domaine médical à des fins d'identification de biomarqueurs pour le diagnostic de certaines maladies.¹⁰⁴ Bien que le MALDI-TOF-MS soit connu pour l'analyse de macromolécules biologiques, plusieurs groupes de recherche ont développé des méthodes afin d'analyser des composés de faible poids moléculaire tels que les lipides¹⁰⁵, métabolites¹⁰⁶ et les xénobiotiques.¹⁰⁷ Cette application donc est grandement utilisée au sein d'analyses pharmacocinétiques afin de suivre la distribution des composés dans les tissus.¹⁰⁸

3.1.1 Mécanisme d'ionisation

Comme mentionné précédemment, le MALDI est une technique permettant d'analyser des surfaces solides par spectrométrie de masse. Pour ce faire, une impulsion laser est dirigée sur l'échantillon à analyser afin d'ioniser les molécules neutres et chargées qui s'y trouvent. Il s'en suit une désorption/ionisation qui permettra de diriger les ions vers l'analyseur (TOF) pour se rendre finalement au détecteur. Pour que la désorption et l'ionisation soient optimales, l'échantillon doit

être recouvert d'une matrice en excès. Elle a pour but de faciliter la désorption puis l'ionisation des analytes en leur transférant un proton. La matrice est un composé organique qui contient habituellement un groupement acide et qui est capable d'absorber l'énergie du laser sans engendrer sa dégradation. Quand la matrice en solution est appliquée sur l'échantillon, elle s'évapore en co-cristallisant avec les analytes et ces cristaux seront sublimés par l'énergie du laser. Dans cette phase gazeuse, l'énergie des particules augmente, favorisant ainsi les collisions et par conséquent le transfert du proton de la matrice vers l'analyte (**Figure 23**). Les ions formés seront dirigés vers l'analyseur grâce une différence de potentiel de plusieurs kilovolts appliqués entre la plaque échantillon et les électrodes d'extraction. Selon la polarité appliquée, il est possible d'analyser les ions positifs ou les ions négatifs.

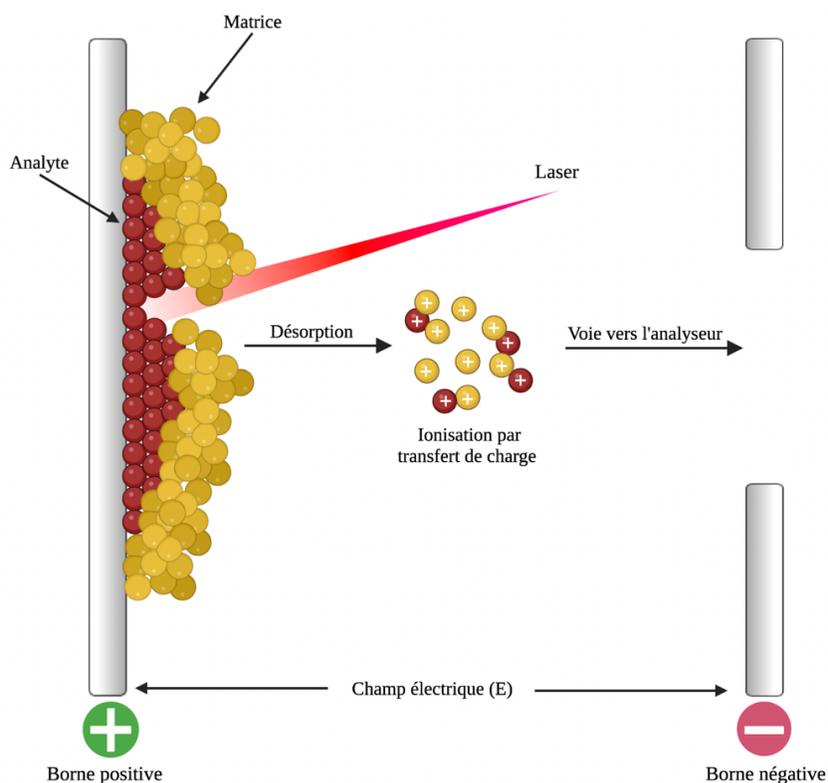


Figure 23 Schéma du principe d'ionisation d'un analyte par MALDI.

Il existe plusieurs types de matrices qui ont tous une utilité différente. La principale caractéristique à évaluer afin de choisir une matrice est la nature de l'analyte. En effet, une matrice donnera une intensité de signal différente selon la nature du composé étudié. Toutes les matrices possèdent un groupement donneur de proton afin de permettre l'ionisation en mode positif, ou un groupement qui peut recevoir un proton afin d'analyser les anions. Elles possèdent également des

groupements chromophores leur permettant ainsi d'absorber l'énergie dans la gamme d'émission du laser qui se trouve soit dans l'UV ou dans l'IR. Selon l'énergie d'émission, certaines matrices seront plus susceptibles d'être utilisées par rapport à d'autres. De plus, dans tous les cas, il est important que la matrice puisse co-cristalliser avec l'analyte afin de favoriser la désorption et l'ionisation.

3.1.2 L'analyseur par temps de vol

L'analyseur par temps de vol (TOF) permet de séparer les ions selon leur m/z . Il est grandement utilisé pour l'analyse de biomolécules. Le principe de cet analyseur repose sur le temps de voyage des ions formés; lorsque les ions arrivent dans l'analyseur, ils traverseront un tube de temps de vol de longueur (L) sans champ électrique et seront séparés en fonction du temps requis pour arriver au détecteur. Le temps de vol dépend du rapport m/z de chaque ion selon l'équation suivante :

$$m/z = \left(\frac{2eV_s}{L^2} \right) t^2 \quad (8)$$

où t est le temps de parcours, V_s est le potentiel d'accélération à la source d'ionisation dans la zone entre la plaque et la grille et e est la charge élémentaire. Comme tous ces derniers paramètres sont constants à l'exception du ratio m/z et du temps, on voit que pour un potentiel d'accélération fixe et pour un même état de charge, ces deux paramètres sont dépendants de sorte qu'un ion ayant une plus grande masse par unité de charge prend plus de temps pour traverser le tube de vol et se rendre au détecteur qu'un ion de faible m/z (**Figure 24**). Cette méthode de séparation des ions comporte cependant quelques inconvénients. En effet, puisque les analytes ne sont pas tous ionisés exactement en même temps, certains s'engagent dans l'analyseur TOF avant d'autres, augmentant ainsi la dispersion spatiale des ions. Plusieurs méthodes ont été employées pour réduire cette dispersion et par conséquent augmenter la résolution en masse d'un signal.

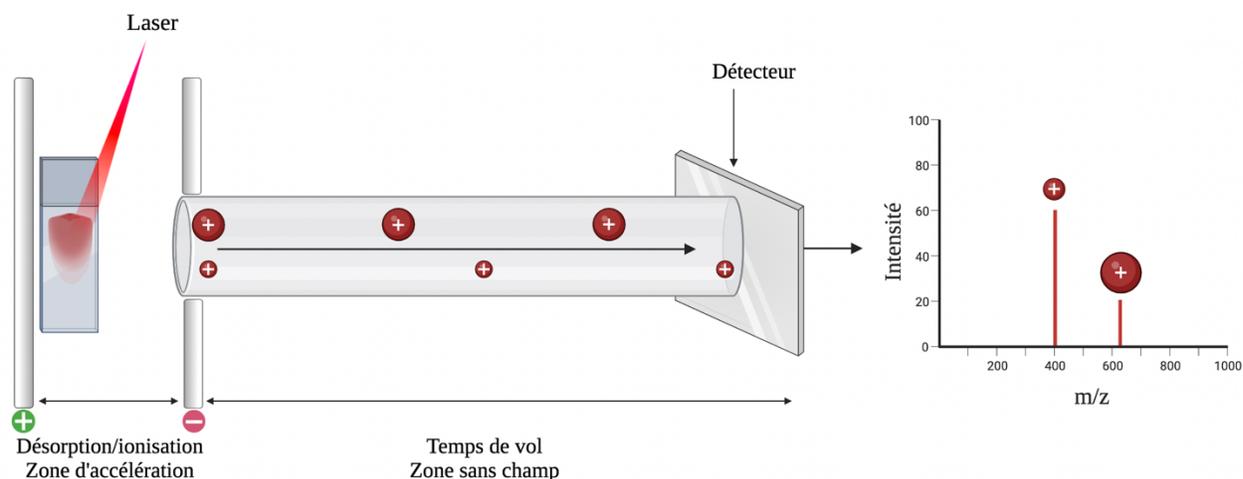


Figure 24 Schéma d'un analyseur à temps de vol (TOF).

3.1.3 L'imagerie assistée par la spectrométrie de masse (IMS)

L'IMS est une technique d'analyse qui permet d'investiguer le contenu moléculaire des surfaces comme des tissus. Lorsqu'une section de tissu est analysée, l'instrument visualise une grille où chaque carré représente un pixel concordant avec une position précise du tissu. La distance entre chaque pixel est choisie préalablement selon la résolution spatiale de l'image désirée. De ce fait, chaque pixel est par MALDI afin d'obtenir un spectre de masse pour chaque coordonnée de la grille préalablement établie. Il est par la suite possible de sélectionner la masse d'un analyte afin d'avoir une cartographie complète de la section analysée où l'intensité de chaque pixel est directement proportionnelle à l'abondance d'un analyte (**Figure 25**). Cet outil est particulièrement bien adapté pour la cartographie de la plupart des molécules endogènes (protéines¹⁰⁹, lipides¹⁰⁵, métabolites¹⁰⁶) ainsi que de beaucoup de xénobiotiques.¹¹⁰ Les domaines d'application sont nombreux tels que la biologie du développement, les applications préclinique et clinique, ainsi que pharmaceutique pour la distribution et le métabolisme des médicaments.

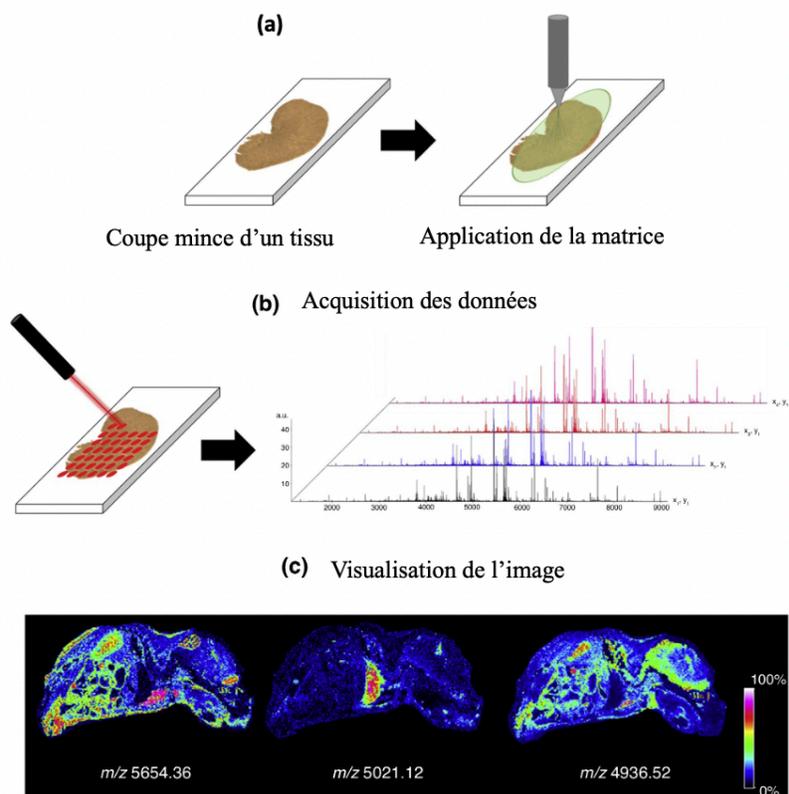


Figure 25 Processus pour l'analyse tissulaire mince par MALDI IMS. Modifiée et adaptée de l'article en citation¹¹¹

3.2 Développement et optimisation de la méthode

Plusieurs paramètres sont importants dans l'optimisation de cette méthode. La matrice et sa déposition, le solvant des analytes, le nombre de tirs par pixel et l'irradiance du laser sont tous des caractéristiques à optimiser avant d'analyser les tissus. Le développement de la méthode sera abordé dans les sections à venir afin de mieux comprendre les analyses de quantification. La méthode a été développée pour l'analyse du PEBB et de la phenformine puisque ce sont les tissus traités par ceux-ci qui ont été collectés. Les détails expérimentaux se trouvent dans la section **3.5 Partie expérimentale**

3.2.1 La matrice et la détection des analogues de type biguanide

Le choix de la matrice est essentiel afin de maximiser le signal des analytes. Alexandra Doré, une ancienne étudiante du groupe Schmitzer, a déterminé les types de matrice qui améliorent les signaux des biguanides. Comme il est possible de voir à la **Figure 26**, trois matrices connues

pour l'analyse de composés de faible poids moléculaire ont été testées : l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) 5 mg/ml, 50/50 ACN: H₂O + 0,1 % TFA, le 2-mercaptobenzothiazole (MBT) 10 mg/ml, 50/50 ACN: H₂O + 0,1 % TFA ainsi que l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) 30 mg/ml, 50/50 MeOH: H₂O + 0,1 % TFA.

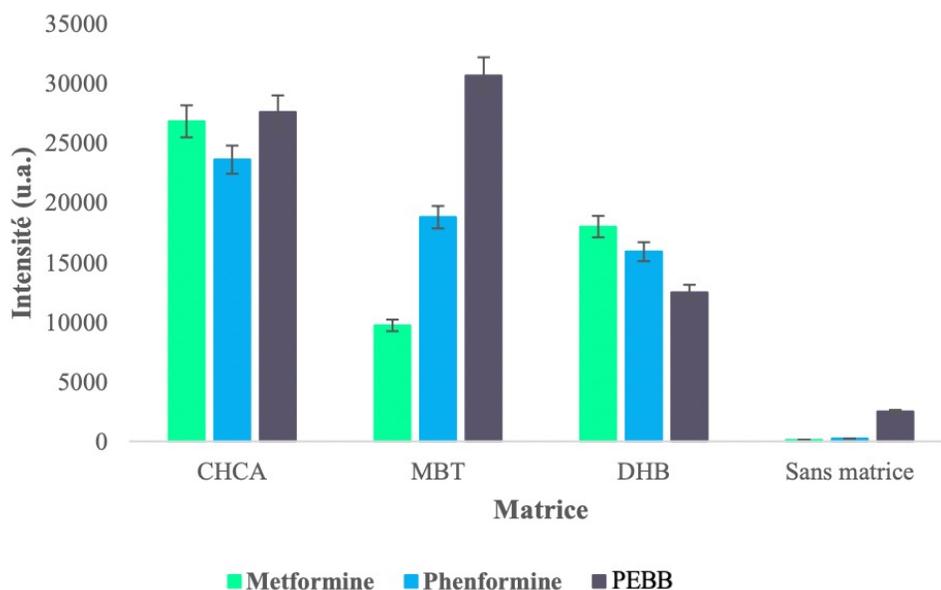


Figure 26 Intensité de différents biguanides selon le type de matrice employée. Les solutions de biguanide utilisées sont à une concentration de 1 mg/mL. Crédit à Alexandra Doré.

Dans tous les cas, il est nécessaire de mélanger une matrice avec l'échantillon pour améliorer l'intensité des signaux perçus. L'intensité que confère le CHCA semble plus uniforme comparativement au MBT qui présente une efficacité particulière pour le PEBB. Cependant, le MBT semble moins efficace pour les autres biguanides. De son côté, le DHB ne semble pas être une matrice intéressante dans cette application puisqu'elle présente une intensité moindre auprès des trois analytes étudiés. De plus, le CHCA ne possède pas de fragment qui interfère avec les masses de la phenformine et du PEBB, d'où pourquoi elle est la meilleure matrice à utiliser pour les analyses. Les spectres de masse des solutions standards du PEBB et de la phenformine détectés montrent que le CHCA permet de les détecter avec une bonne intensité (**Figure 27**).

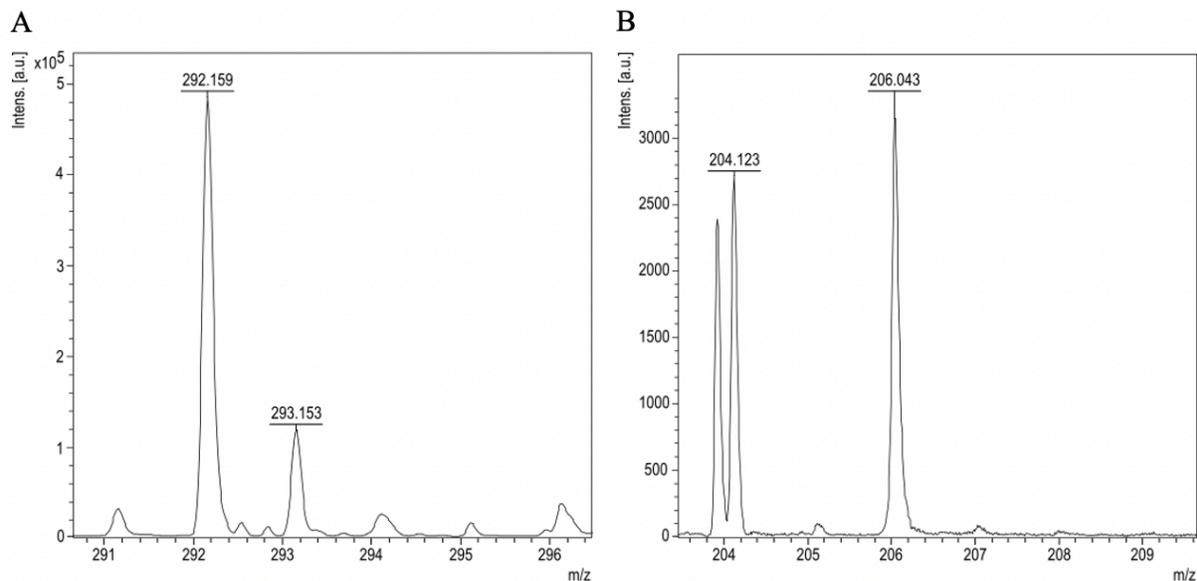


Figure 27 Spectre de masse par MALDI-TOF des solutions standards (A) du PEBB ($m/z = 292$) et (B) de la phenformine ($m/z = 206$)

Ces expériences ont été réalisées en déposant une goutte de matrice par-dessus une goutte d'analyte sur une plaque échantillon métallique (spotting). Cependant, la méthode de déposition par *spotting* n'est pas assez uniforme et reproductible pour faire des expériences d'imagerie moléculaire sur des tissus. C'est pourquoi la méthode d'application de matrice par nébulisation pneumatique est utilisée lors d'analyses plus complexes.^{112, 113} Cette méthode d'application de matrice est possible grâce à un instrument spécialement conçu à cet effet dans le laboratoire du professeur Pierre Chaurand. Plusieurs paramètres de l'instrument sont à considérer lors de l'optimisation d'une méthode de dépôt de matrice comme la température, le débit, la concentration de la solution de matrice et le nombre de couches appliquées sur l'échantillon. Plusieurs essais ont été faits afin de trouver la meilleure proportion de volume aqueux par rapport au volume d'acétonitrile pour la solution de matrice. Une proportion d'eau trop élevée provoque la délocalisation de l'analyte à la surface de l'échantillon tissulaire tandis qu'une proportion trop faible empêche la resolubilisation locale des analytes en vue de leur analyse par MALDI-IMS. Le **Tableau IV** montre les différentes conditions testées à cet effet.

Tableau IV. Condition d'application de la matrice CHCA par nébulisation pneumatique selon la composition du solvant.

Essais	Solvant	Uniformité du dépôt
1	ACN/H ₂ O 7 : 3	Excellent
2	ACN/H ₂ O 8 : 2	Moyen
3	ACN/H ₂ O 9 : 1	Moyen
4	ACN	Pauvre

Grâce aux conditions optimisées **Tableau IV** la déposition de matrice est uniforme et il sera possible d'efficacement co-cristalliser la matrice et l'analyte. La surface de la lame où la matrice a été appliquée a été observée au microscope afin de s'assurer que la couche de matrice soit répartie de façon uniforme. Bien que la déposition soit bonne, une autre problématique est survenue; le ratio optimal pour la détection du signal de 7 : 3 ACN : H₂O cause la délocalisation des biguanides hors des tissus. L'eau solubilise une partie des biguanides déposés sur le tissu et le jet vaporisant la matrice les étale hors du tissu, rendant ainsi la quantification impossible. Pour corriger ce défaut, le débit a été grandement diminué afin de rendre le jet vaporisateur moins puissant. Comme il est possible de voir à la **Figure 28**, quand le débit est réduit à 0,05 mL/min, aucune délocalisation des analytes est visible contrairement à quand le débit est plus élevé.

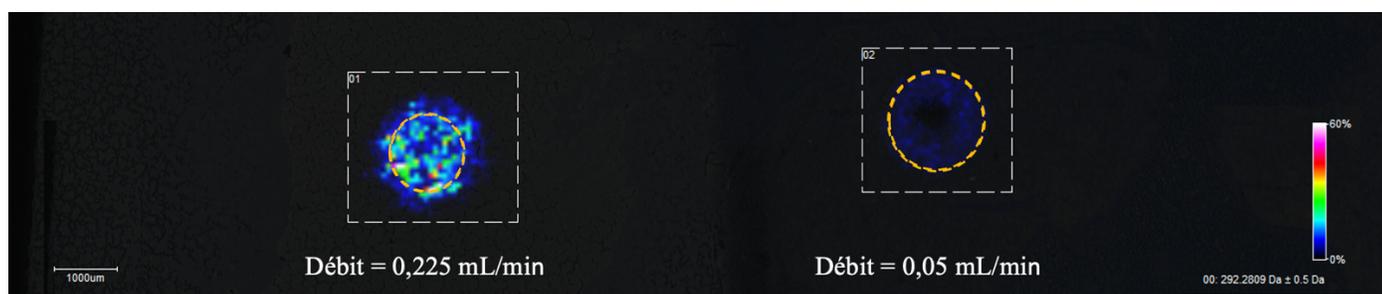


Figure 28 Délocalisation des biguanides en fonction du débit de matrice appliqué. L'imagerie à m/z 292 d'une goutte de PEBB déposé sur des homogénats de foies a été faite. La résolution spatiale de l'image est de 150 μm . La matrice a été appliquée à deux débits, soit 0,225 mL/min ou 0,05 mL/min. Lorsqu'un débit de 0,225 mL/min est employé, le PEBB est détectable

hors de la goutte (cercle orange). À l'inverse, lorsque le débit est à 0,05 mL/min, aucun PEBB n'a été détecté à l'extérieur de la goutte.

Le dernier paramètre optimisé est le nombre de couches de matrice appliquées sur les échantillons. Puisque le ratio de molécules de matrice/analyte doit être d'environ 5000 : 1, il est nécessaire de faire des tests de passages afin de voir le nombre de couches qui permet d'obtenir le meilleur rapport signal sur bruit sur l'ensemble de la section. Il faut un nombre de passages assez précis, car une trop faible quantité de matrice ne permettrait pas une extraction suffisante de l'analyte, mais au contraire, s'il y a trop de matrice sur l'échantillon, le bruit de fond généré par les signaux de matrice augmente, créant ainsi de l'interférence avec les analytes. C'est pourquoi des tests ont été effectués en appliquant entre 6 et 12 passages sur des tissus traités au PEBB. La **Figure 29** montre bien l'intensité observée du PEBB dans les échantillons selon le nombre de passages. Pour toutes les expériences d'imagerie à venir, une normalisation par le courant ionique total (TIC, *Total Ion Current*) a été faite. Cette méthode de normalisation stipule que l'intensité totale d'un analyte donné est proportionnelle à sa concentration dans le milieu.¹¹⁴

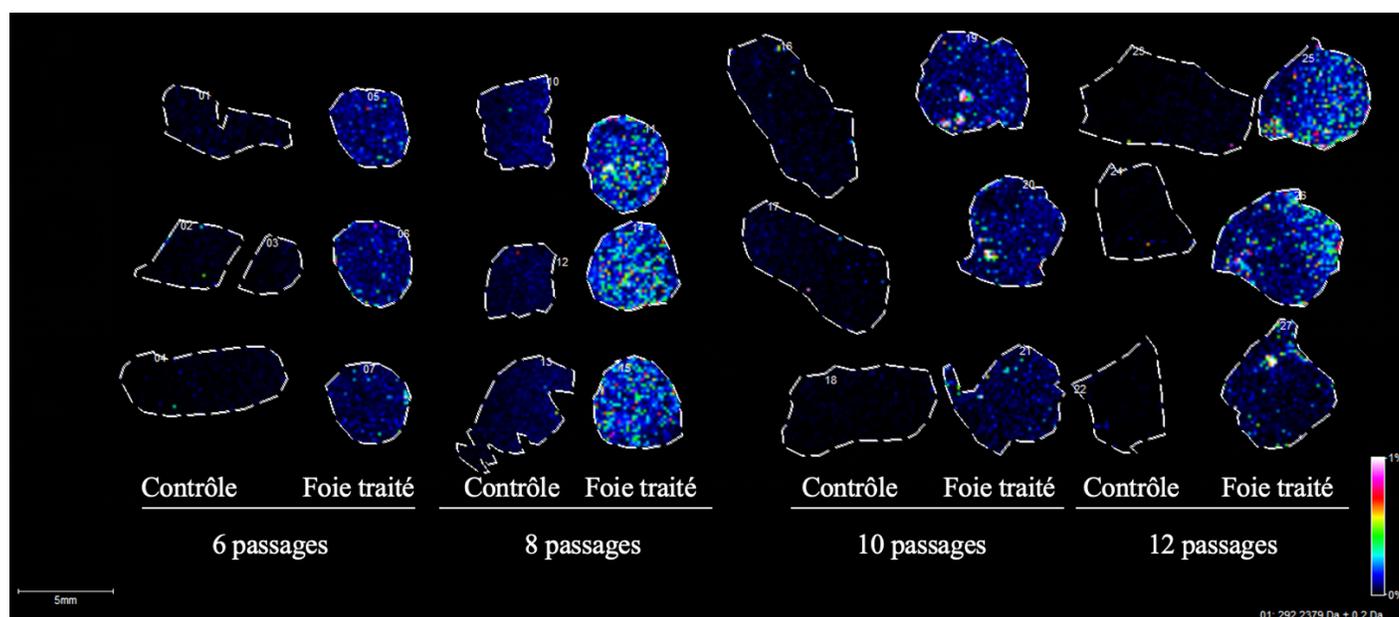


Figure 29 Optimisation de la quantité de matrice pour l'analyse de PEBB par MALDI-IMS. L'analyse a été faite avec du CHCA à 5 mg/mL préparé dans un mélange 7 : 3 ACN/H₂O appliqué sur des foies contrôles et traités par nébulisation pneumatique en augmentant le nombre de passages. La résolution spatiale de l'image est de 150 μ m. Une normalisation des signaux par le TIC (*Total Ion Current*) a été faite afin de compter le nombre de pixels significatifs à m/z 292.

Le meilleur résultat est de 8 passages, car les signaux de PEBB sont plus intenses et plus homogène sur l'ensemble des sections. Bien qu'il semble y avoir un signal non-négligeable dans

les échantillons contrôles, tous les signaux sont en réalité du bruit de fond avec un rapport signal sur bruit faible.

En somme, plusieurs paramètres ont été optimisés afin d'avoir la meilleure méthode de déposition de matrice pour l'analyse et la quantification des biguanides par MALDI IMS. Le **Tableau V** montre les paramètres optimisés qui ont été utilisés pour l'acquisition des données.

Tableau V. Conditions optimisées d'application de matrice CHCA pour l'analyse des biguanides dans les tissus biologiques par MALDI-IMS

Paramètres	
Concentration et diluent CHCA	5 mg/mL dans ACN/H ₂ O 7:3
Débit (mL/min)	0,05
Température du jet (°C)	45
Pression du jet (PSI)	10
Nombre de passages	8
Vitesse d'expulsion (mm/min)	1170
Espacement entre chaque passage (mm)	3

Avant de débiter les analyses de quantification dans les tissus, il est nécessaire d'établir la limite de détection (LOD) du PEBB et de la phenformine par MALDI-TOF-MS. Cette limite donnera une idée de la gamme de concentrations pour la courbe d'étalonnage. La limite de détection des biguanides peut être déterminée dans un premier temps avec des solutions standards diluées déposées sur une plaque échantillon métallique. Les LOD doivent ensuite être déterminées dans les tissus biologiques. Le **Tableau VI** liste les LOD de chaque composé selon la surface métallique ou tissulaire.

Tableau VI. Limites de détection du PEBB et de la phenformine par MALDI-TOF-MS.

	LOD sur métal	LOD sur tissu
PEBB	1 ng/mL	100 ng/mL
Phenformine	100 ng/mL	500 ng/mL

3.2.2 La courbe d'étalonnage

Les courbes d'étalonnage pour la quantification du PEBB et de la phenformine ont été faites sur des homogénats de foie en fonction du tissu à analyser. Les homogénats sont des tissus broyés et moulés qui permettent d'avoir une surface d'analyse uniforme ayant l'apparence d'un organe et sert de simulation et de modèle représentant un l'organe entier.¹¹⁵ L'utilisation d'homogénats est une méthode courante, fréquemment utilisée dans la quantification par IMS d'organes et de tissus.

Les courbes d'étalonnage sont conçues en déposant de fines tranches d'homogénat congelé sur une lame d'analyse. Une goutte de solution étalon de concentration connue sera déposée sur l'homogénat. La plus faible concentration est choisie en fonction de la limite de quantification des composés sur tissus. Évidemment, elle sera légèrement supérieure à la LOD afin d'assurer une bonne linéarité de la courbe d'étalonnage. La concentration de l'étalon la plus élevée est choisie en se basant sur les résultats pharmacocinétiques de la **section 2.3.2 – Figure 15**. Sachant que la concentration maximale de PEBB est d'environ 10 µg/ml, il est donc impossible que la concentration dans les tissus soit supérieure à cette dernière. La concentration la plus élevée sera donc légèrement supérieure à celle de la concentration plasmatique maximale afin d'assurer la linéarité de la courbe d'étalonnage. Après le dépôt de la gamme de concentrations sur les sections d'homogénats, la matrice est appliquée et l'acquisition est lancée (**Figure 30**). Cette courbe d'étalonnage a permis de mettre en relation la somme des intensités des signaux en fonction la quantité de PEBB par goutte. Afin de trouver la concentration, il suffit de multiplier par le nombre de pixels de la section imagée. Comme on connaît l'aire occupée par un pixel, il est possible de calculer la quantité par pixel, et donc dans la totalité du tissu.

Le R^2 de la courbe d'étalonnage est de 0,9971. Cette courbe pourra donc être utilisée, car une erreur en dessous de 20% avec la méthode de quantification par MALDI-TOF peut être acceptable et représente une erreur acceptable pour cette méthode. Cette variabilité peut être expliquée en raison de la complexité à déposer des gouttes ayant exactement le même volume. L'erreur sur la mesure peut influencer la reproductibilité de la méthode d'où l'importance de répéter les expériences de quantifications au moins 3 fois afin de tenir compte de la dispersion des données dues aux variations biologiques. Tout cela considéré, la méthode de quantification et localisation des biguanides sur les homogénats par IMS est linéaire et fiable et cette courbe d'étalonnage pourra être réutilisée afin de poursuivre l'étude dans les tissus traités.

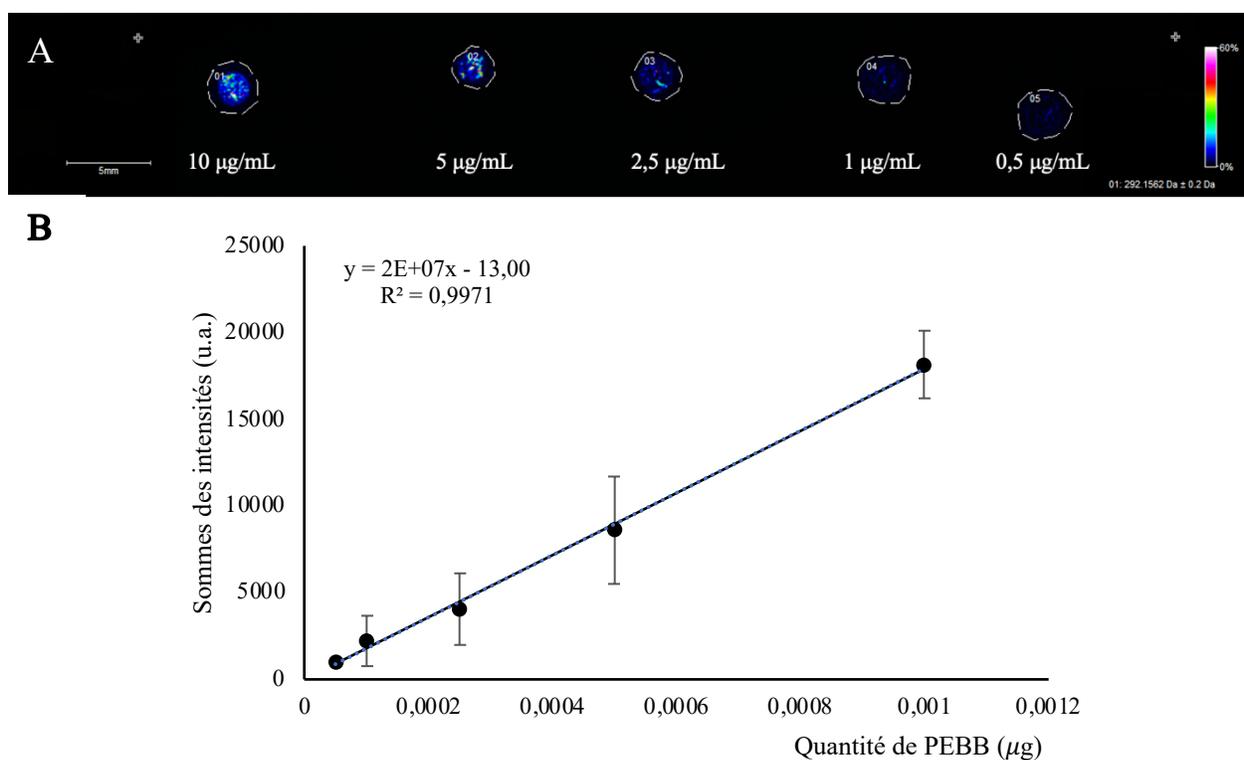


Figure 30 Courbe d'étalonnage du PEBB. (A) Imagerie d'homogénat de foie après le dépôt d'une goutte de solution de concentration croissante de PEBB. (B) Une régression linéaire de l'intensité maximale en fonction de la concentration est observée après normalisation des signaux par le TIC. La droite a été tracée en prenant la moyenne des intensités pour une même concentration ($n = 3$). Les barres d'erreurs représentent la déviation standard.

3.3 Quantification et cinétique de distribution du PEBB dans le foie

Dans le chapitre 2, des études pharmacocinétiques ont été faites afin de comprendre le comportement d'absorption des analogues de biguanides. Dans ce chapitre, les études sont poussées plus loin afin de comprendre le comportement de distribution de ces analogues dans les tissus.

En se référant aux expériences pharmacocinétiques de la **section 2.3.2**, on voit que la concentration plasmatique de PEBB augmente jusqu'à 60 minutes où elle atteint un plateau puisqu'une partie commence à être éliminée. Si le PEBB se distribue dans le foie, on s'attendrait donc à ce que son accumulation débute entre 0 et 60 minutes. Des expériences d'imagerie sur des foies de souris sacrifiées à différents temps post injection des biguanides ont été faites (**Figure 31**). Ces expériences fournissent des informations quant à la localisation du PEBB, mais également sur sa cinétique de distribution.

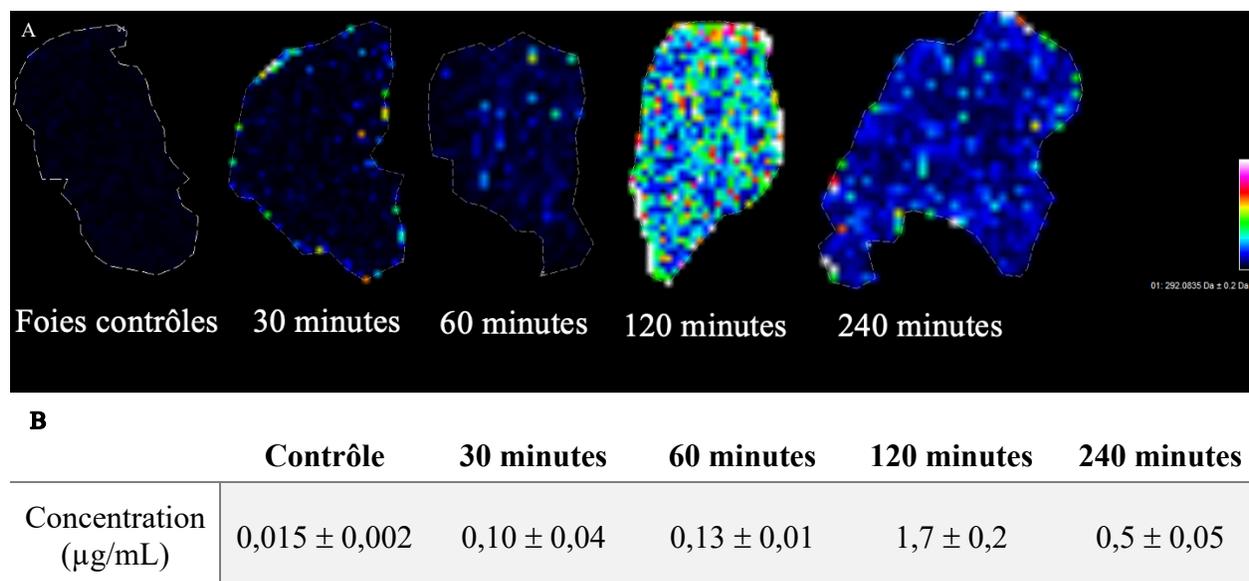


Figure 31 MALDI IMS de foie de souris traitées au PEBB en fonction du temps post administration. La dose administrée aux souris est de 35 mg/kg. (A) Images ioniques du PEBB ($m/z = 292$) en fonction du temps après l'administration. La résolution spatiale est de 150 µm. Les données ont été normalisées par le TIC. (B) Concentrations de PEBB dans les foies calculées en fonction du temps.

Après la normalisation des données, il est possible de conclure d'observer un léger bruit de fond dans les images contrôles correspondant à une concentration environ 7 fois moins élevée que dans les foies traités à 30 minutes. Cette faible valeur est due au bruit de fond et il est donc possible de dire que les contrôles ne contiennent pas de PEBB contrairement aux autres foies traités. De 30 à 60 minutes, les signaux de PEBB sont clairement détectés, confirmant ainsi sa présence dans le foie. Cependant, comme il est possible de voir dans la **Figure 31 B**, la concentration à 30 et 60 se trouve hors de la gamme d'étalonnage, donc il n'est pas possible de considérer ces valeurs comme étant exactes. Malgré tout, la tendance observée est celle à laquelle on s'attendrait normalement. La faible quantité de PEBB à 30 minutes était un résultat attendu puisque que l'étape initiale est l'absorption du PEBB dans la circulation sanguine. Puisque les études précédentes ont montré que la concentration maximale plasmatique de PEBB est atteinte à 60 minutes après l'administration, il aurait été surprenant que la distribution dans les foies ait été bien enclenchée en aussi peu de temps. Même s'il n'est pas possible d'obtenir sa concentration absolue, on peut estimer que sa concentration se trouve entre la limite de détection et la limite de quantification soit entre 100 à 500 ng/mL. Comme attendu, le PEBB se distribue dans le foie, mais il ne semble pas s'y accumuler. En effet, le PEBB semble se distribuer uniformément dans les tissus et on voit sur l'image que l'intensité des signaux augmente globalement de 30 à 120 minutes pour ensuite atteindre un plateau. Au bout de 240 minutes, la quantité est moindre qu'à 120 minutes ce qui signifie qu'il n'y a pas d'accumulation et que le PEBB est éliminé. La courbe d'étalonnage présentée à la **Figure 30** a permis de calculer la concentration de PEBB dans chaque tissu confirmant ainsi le résultat d'imagerie. Ces résultats montrés à la **Figure 31 B** concordent avec ceux observés dans le plasma. La tendance montre que 6 heures après l'administration du PEBB, celui-ci est éliminé à environ 80%. Cette cinétique est encourageante, car l'accumulation prolongée de certains composés dans le foie peut causer des dommages hépatiques. Or, ce n'est pas le cas pour le PEBB faisant de lui un composé ayant un potentiel thérapeutique.

Le volume de distribution du PEBB déterminé plus haut indiquait qu'il pouvait s'accumuler dans les tissus, mais également dans les tissus adipeux. Ceux-ci ont également été collectés à différents moments après la dernière dose de PEBB administrée, permettant de produire des résultats d'imagerie MS des tissus adipeux des même souris. L'imagerie de ce type de tissus comporte plusieurs inconvénients. Puisque les tissus adipeux sont liquides à température ambiante, leur manipulation est complexe. L'ajout de matrice cause souvent de la délocalisation des tissus

adipeux sur la lame d'analyse rendant ainsi l'imagerie difficile. Néanmoins, il a été possible de prendre la mesure de plusieurs spectres en fonction du temps afin d'observer une tendance. Ces mesures ont été prises sur une région de tissus adipeux après le dépôt de matrice par nébulisation afin d'obtenir un spectre de masse. Pour chaque tissu adipeux, trois acquisitions ont été faites afin de recueillir un spectre de masse. Ainsi, la moyenne des intensités de PEBB dans les tissus adipeux est représentée en fonction du temps. (Figure 32).

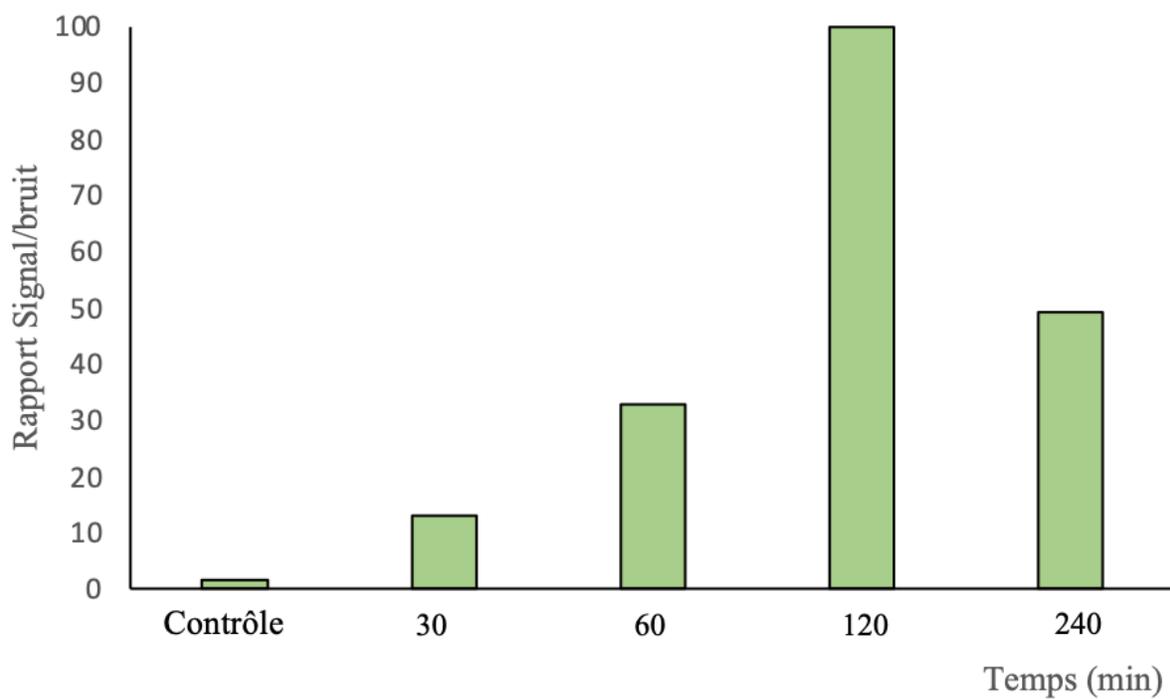


Figure 32 Spectres de masse montrant la présence de PEBB ($m/z = 292$) dans les tissus adipeux selon le temps.

Bien que l'imagerie des tissus adipeux n'ait pas été possible, chaque spectre de masse montre l'intensité moyenne du PEBB après 3 mesures prises par échantillon tissulaire. D'abord, le contrôle confirme qu'aucun interférent ou contamination n'est présent dans les tissus adipeux à la même masse que le PEBB. Ainsi, on peut constater que les signaux observés à m/z 292 sont bien ceux du PEBB. Avec ces quantifications relatives, il est possible de voir une tendance qui concorde avec la distribution vue dans les foies à la Figure 31. Il semble y avoir une augmentation de l'intensité du signal de PEBB dans les tissus adipeux de 30 minutes à 120 minutes où un plateau a été atteint. Il n'y aurait donc pas d'accumulation puisqu'à 240 minutes, l'intensité moyenne est

plus basse qu'à 120 minutes. On voit donc que le PEBB est détecté dans les tissus adipeux et ne semble pas s'accumuler. En faisant le ratio des intensités entre le signal à 240 minutes et à 120 minutes, il est possible d'estimer que le PEBB est éliminé à environ 70% après 240 minutes. Cependant, pour avoir des données de quantification absolue du PEBB dans les tissus adipeux, la méthode doit être modifiée afin de rendre l'imagerie possible en modifiant les surfaces d'analyses et la mesure devrait être faite plusieurs fois afin d'avoir une valeur statistique à l'étude.¹¹⁶

Les tissus musculaires ont également été analysés par IMS en fonction du temps après avoir administré le PEBB aux souris (**Figure 33**).

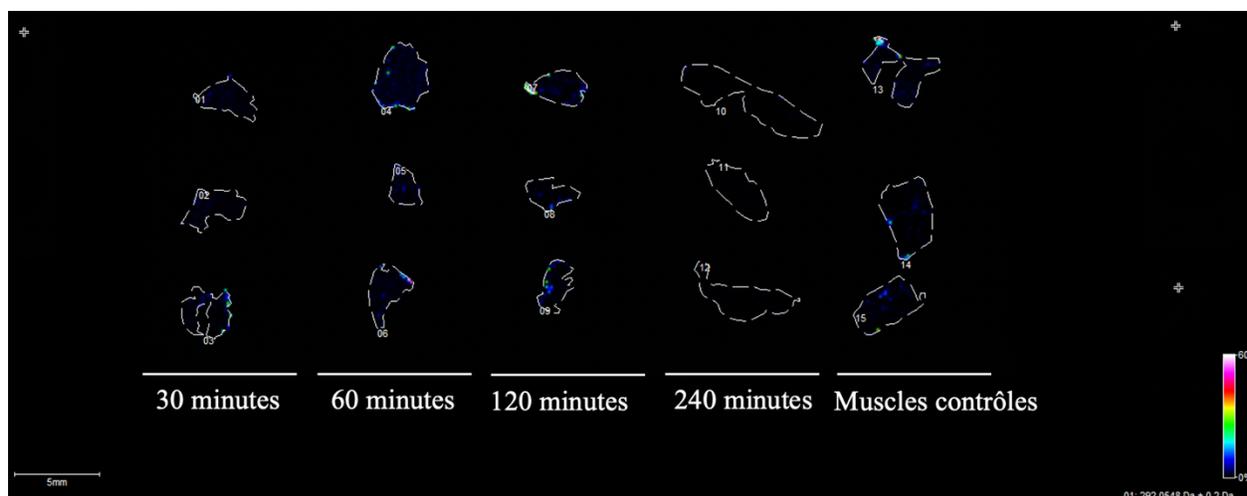


Figure 33 MALDI IMS de tissus musculaires de souris traitées au PEBB en fonction du temps après l'administration. La dose administrée aux souris est de 35 mg/kg. La résolution spatiale est de 150 μm . Les données sont présentées après normalisation par TIC.

L'IMS révèle que le PEBB s'accumule peu, voire pas du tout dans les tissus musculaires. En effet, l'imagerie ne montre que très peu de signaux à partir des tissus et les signaux perçus ne sont essentiellement que du bruit de fond. En somme, le PEBB se distribue dans le foie et les tissus adipeux avec un plateau à 120 minutes et il ne pénètre pas les tissus musculaires. Le PEBB ne semble donc pas s'accumuler dans l'organisme selon les expériences qui ont été menées jusqu'à présent.

3.4 Quantification et localisation du PEBB et de la phenformine dans les tumeurs PDAC

Pour donner suite aux résultats de la **section 2.3.3 Quantification des dérivés de type biguanide en tant qu'agent anticancéreux**, l'IMS des xénogreffes de type PDAC des souris traitées avec des doses thérapeutique de PEBB et phenformine durant 13 jours a été faite afin de voir si l'accumulation dans les tumeurs sera plus importante. Malheureusement, la présence d'un signal au même m/z que la phenformine apparaît dans les section tumorales traités rendant ainsi la quantification impossible avec l'instrumentation disponible (**Figure 34**).

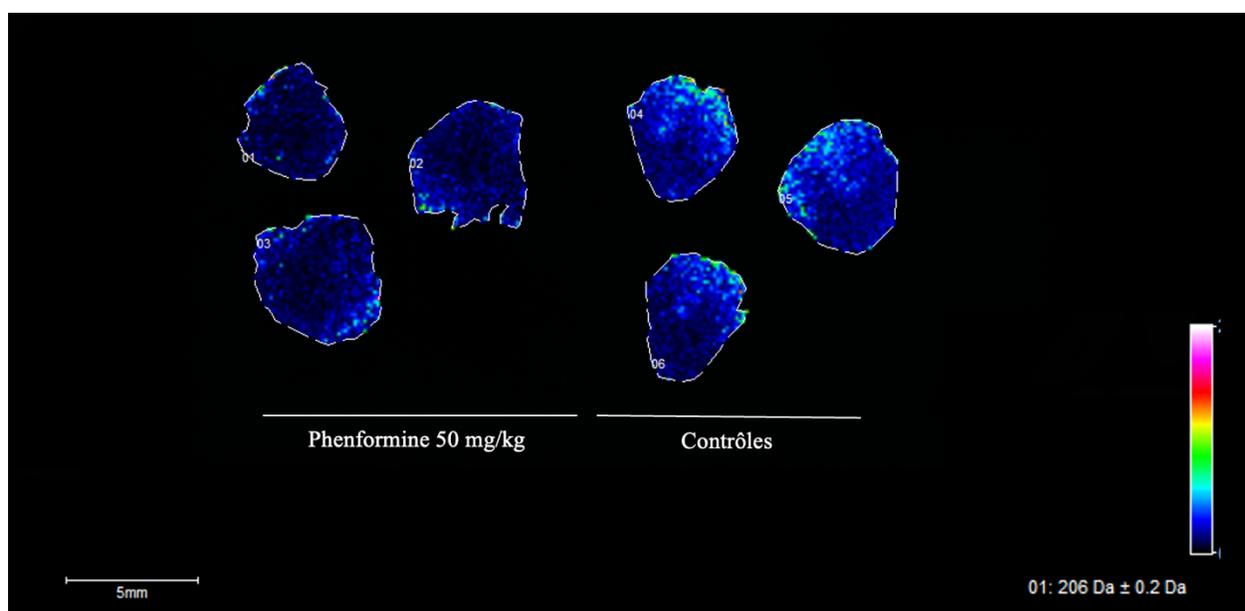


Figure 34 Imagerie MALDI IMS de sections tumorales après traitement par de la phenformine et contrôle montrant la présence d'un interférent à m/z 206.

Après avoir constaté cette interférence dans les tissus, une normalisation de type TIC a été faite afin de savoir s'il était possible de soustraire l'intensité de base dû à l'interférent dans un tissu contrôle des tissus traités. Cependant, l'intensité de l'interférence est beaucoup trop élevée par rapport au bruit de fond pour simplement le soustraire des tissus. Comme les homogénats de foie ne contiennent pas ce signal à m/z 206, cet interférent pourrait provenir d'ailleurs. Une des hypothèses serait que cet interférent soit se dégrade ou se métabolise lors de la préparation des homogénats. Bien qu'il ne soit pas possible de faire de l'IMS avec ces tissus, il serait possible

d'extraire la phenformine de l'organe et de faire de la quantification par LC-MS en utilisant les méthodes développées précédemment.

Une dernière expérience a été faite afin de comprendre le potentiel anticancéreux du PEBB. À la **section 2.3.4 – Figure 22**, la concentration plasmatique des analogues de type biguanide ont été mesurés dans les souris xénogreffées avec une tumeur de type PDAC. Afin de pousser l'expérience plus loin, l'IMS des tumeurs a été faite pour savoir si le PEBB s'y retrouve après 28 jours de traitement.

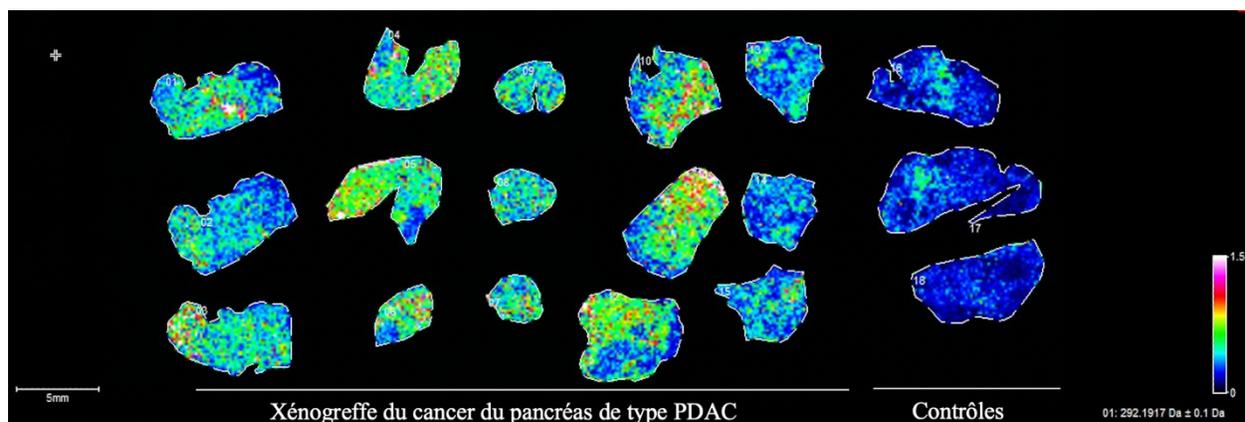


Figure 35 MALDI IMS des tumeurs de type PDAC après 13 jours de traitement au PEBB ($m/z = 292$).

Tous comme dans les tissus hépatiques, le PEBB semble se distribué dans les tumeurs de type PDAC suite à un traitement de 13 jours où les souris recevaient une dose quotidienne de PEBB (35 mg/kg) (**Figure 35**). Le PEBB s'accumule d'autant plus dans les tumeurs traitées que dans les tumeurs contrôles où il est possible de constater que la différence entre l'intensité des signaux de PEBB est significative. Les signaux perceptibles dans les tumeurs contrôle sont du bruit de fond et donc la quantification du PEBB dans ces tumeurs est possible. Cependant, puisque que la seule courbe d'étalonnage disponible a été réalisée avec des homogénats de foies, elle ne pourra pas être utilisée afin de quantifier ce résultat en raison de la différence entre les composantes moléculaires ainsi que les caractéristiques tissulaires des deux tissus. Pour faire la quantification du PEBB dans les tissus des xénogreffes de type PDAC, il faudrait faire une courbe d'étalonnage sur des homogénats de tumeurs de type PDAC non traitées afin d'avoir le milieu le plus représentatif possible. Le ratio entre les signaux de PEBB dans les tumeurs et le bruit de fond des contrôles

révèle que le signal de PEBB est $5,7 \pm 1,1$ fois plus intense dans les tumeurs que dans les contrôles. Ainsi, il est clair que le PEBB s'accumule dans les tumeurs pancréatiques représentant un résultat encourageant quant au développement de nouveaux agents anticancéreux contre le cancer du pancréas.

En résumé, La méthode de quantification développée permet de détecter des dérivées de type biguanides à des concentrations plus grandes que $0,5 \mu\text{g/mL}$. La variation sur la courbe d'étalonnage fait en sorte que l'incertitude sur une mesure peut vite devenir très grande surtout si les mesures sont disparates. En tenant compte de cette variation lors de l'interprétation des résultats, il est possible de définir de façon précise et reproductible la quantité de dérivées de biguanides dans les tissus.

3.5 Partie expérimentale

3.5.1 Préparation des homogénats de foies de souris

Tout d'abord, une fois les souris sacrifiées par asphyxie au CO_2 , une dissection a été effectuée afin de récupérer les organes d'intérêt et ils ont été directement gelés sur glace sèche et placés dans un congélateur -80°C jusqu'à leur utilisation.

Par la suite, les foies congelés sont découpés en fines sections avec un cryostat de type microtome (Thermo Fisher Scientific MicromTM HM550, MI, USA). Plusieurs centaines de sections tissulaires sont placées dans un tube de 15 ml et le tout est conservé sur glace afin d'assurer la bonne préservation des tissus. Des billes métalliques sont ajoutées dans le tube contenant les tissus. Ensuite, le tube est refermé et agité à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes et remis dans la glace pendant 30 secondes. Cette dernière étape a été répétée pendant environ 15 minutes ou jusqu'à ce que les tranches de foies soient bien homogénéisées. Ensuite, les billes métalliques sont retirées du tube grâce à un aimant et le mélange homogène est centrifugé à 2000 rpm pendant 30 secondes et remis sur glace. Cette étape a été faite deux fois. S'il y a présence d'une émulsion à la surface du mélange, elle est retirée à l'aide d'une pipette Pasteur. Le tube est ensuite mis au bain à ultrasons pendant 30 minutes afin d'éliminer les bulles d'air qui auraient pu s'y introduire. Ensuite, une paille est insérée dans le tube afin de donner la forme désirée à l'homogénat et le tout est

congelé rapidement avec de l'azote liquide pour solidifier l'homogénéat qui est par la suite conservé à -80°C. Une fois l'homogénéat congelé, il est retiré de la paille et mis dans un moule de plastique de 2 cm x 2 cm x 1 cm préalablement refroidi dans le cryostat. Une fois l'homogénéat stable dans le moule, il est entreposé dans le cryostat à une température de -20°C. Pour faciliter la découpe de l'homogénéat, celui-ci est complètement encasté dans un polymère de carboxyméthylcellulose (CMC), qui se solidifie à des températures en dessous de 0°C. Lorsque que la CMC est complètement solidifiée, l'excédent est éliminé avec une lame de rasoir donnant ainsi l'homogénéat final. Tout comme les organes, l'homogénéat est conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

3.5.2 Préparation de coupes de tissus biologiques

Les organes ou l'homogénéat de foies préalablement conservés dans un congélateur à -80°C sont transférés rapidement dans la chambre du cryostat. Pour faciliter la découpe, les organes sont laissés environ 30 minutes afin les laisser s'acclimater à la température du cryostat qui est de -20°C. Les tissus sont ensuite déposés sur un support amovible et fixés sur celui-ci avec une goutte de polyéthylène glycol (PEG) qui se solidifie en dessous de 0°C. Le support amovible est alors installé sur la tête du cryostat. Le bloc tissulaire est ensuite découpé à une épaisseur de 12 µm. Chaque section tissulaire est transférée avec un pinceau sur une lame de format microscopique recouverte d'une fine couche d'oxyde d'indium-étain (ITO, de l'anglais : *Indium Tin Oxide*) qui assure la conductivité de la lame.¹⁰² Quand la position des sections sur la lame de microscope est optimale, celle-ci est chauffée à l'aide d'un bloc de métal à température pièce afin de fixer les tissus en les faisant fondre. Finalement, la lame est mise dans un dessiccateur à vide pendant 30 minutes jusqu'à ce que la lame soit totalement sèche.

3.5.3 Application de la matrice

Pour la méthode de *spotting*, les solutions de CHCA à une concentration de 5mg/ml ont été préparées avec différents ratios de solvant organique/eau dépendamment des meilleures conditions déterminées pour les analyses. Ensuite, une goutte de la matrice est appliquée sur l'échantillon. Celui-ci est prêt à être analysé lorsque la goutte de matrice s'est évaporée.

Pour la méthode de déposition automatisée de la matrice par nébulisation pneumatique, un TMSprayer® de 1ère génération (HTX Technologies, Chapel Hill, NC, USA) est utilisé. Les

solutions de matrices ont également été préparées suivant les ratios de solvant organique/eau qui donnent une analyse optimale. La solution est prélevée avec une seringue de 5 ml et placée sur un pousse-seringue. Une fois bien fixé, le bout de la seringue est connecté à un capillaire qui fera circuler la solution de matrice dans l'instrument. La lame contenant les tissus est fixée sur le porte-lame du système à l'aide de ruban adhésif. Quand le montage est terminé, tous les paramètres sont choisis et sélectionnés sur l'ordinateur relié à l'instrument.

Les paramètres optimisés pour la déposition de matrice avec le TMsprayer sur les sections tissulaires sont les suivants :

- Débit : 0,05 mL/min
- Température du jet : 45°C
- Pression du jet : 10 PSI
- Vitesse d'expulsion : 1170 mm/min
- Espacement entre les passages : 3 mm
- Nombre de passes : 8

3.5.4 Imagerie par MALDI-TOF-MS

Toutes les expériences d'imagerie par MS ont été réalisées avec un ultrafleXtreme MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) équipé d'un laser SmartBeam II Nd:Yag/355 nm. L'acquisition des données a été produite en ionisation positive avec l'analyse en mode réflectron et les logiciels utilisés à cet effet sont FlexControl version 3.4 et FlexImaging version 4.1 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

Le potentiel de la source, l'extraction retardée, l'énergie du laser et la gamme de masse sont tous des paramètres qui ont été optimisés selon la nature de l'analyte à analyser afin d'obtenir un ratio signal sur bruit (S/N) optimal. La résolution spatiale pour les analyses d'imagerie varie entre 75 et 150 μm . L'étalonnage en masse de l'instrument est effectué en utilisant les pics de la matrice ainsi que des agrégats d'iodure de césium (CsI) afin d'obtenir un minimum de 5 points d'étalonnage.

L'analyse des données d'imagerie est faite grâce au logiciel FlexAnalysis version 2.3 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Les analyses statistiques des données ont été faites grâce au logiciel RStudio (version 3.4.4) pour la quantification de tous les composés biguanidium.

Chapitre 4 - Conclusion et perspectives

4.1 Conclusion

Ce manuscrit présente des travaux qui visaient à dans un premier temps à développer une méthode de quantification des analogues de biguanides dans les liquides biologiques par LC-MS. Il a été possible d'analyser le plasma sanguin de différentes souris traitées avec des analogues de type biguanide ayant des propriétés anticancéreuses comme le phényléthynylbenzyle biguanide et l'hexylbiguanide. L'acquisition des données a été faite avec un spectromètre de masse de type triple quadripôle en mode MRM offrant une précision supplémentaire pour à la quantification. Cette méthode est rapide, précise et très reproductible, et permettrait de quantifier tout type de biguanide dans le plasma à l'aide d'un étalon interne afin d'obtenir des informations sur la cinétique d'absorption du composé.

Une méthode pour localiser et quantifier les dérivés de type biguanide dans les tissus par MALDI-TOF-IMS a été développée. Pour ce faire, parmi les matrices étudiées, le CHCA permet l'obtention d'un meilleur signal et la méthode de déposition a été choisi de sorte à limiter la délocalisation des dérivés de type biguanide et pour avoir le meilleur ratio signal sur bruit possible. Bien que ces analyses doivent être répétées le plus de fois possible pour éliminer la variation entre les données, cette méthode est tout de même fiable. Des expériences d'IMS ont été réalisées dans le but de comprendre le comportement de distribution des biguanides d'intérêt dans les tissus et tumeurs de type PDAC. Elles ont permis de constater que le PEBB se localise dans le foie et les tissus adipeux post administration, mais ne s'y accumule pas. Il est également possible de détecter avec une intensité significative le PEBB dans les tumeurs PDAC en faisant ainsi un composé anticancéreux avec un haut potentiel. Cependant, la concentration exacte n'a pas pu être déterminée, la courbe d'étalonnage n'est pas adaptée aux tissus cancéreux. Une nouvelle courbe d'étalonnage devra être faite avec des homogénats de tumeur PDAC non traitées afin de rendre la quantification représentative.

Ces méthodes permettent l'analyse de dérivés de type biguanide qui ont été préalablement synthétisés dans le groupe Schmitzer. L'utilisation de méthodes LC-MS et MALDI-TOF-IMS a permis d'obtenir un profil pharmacologique au niveau de l'absorption du PEBB, de l'hexylbiguanide ainsi que de la phenformine, un médicament commercial, mais également au niveau de la distribution du PEBB. Ces méthodes sont de puissants outils de bioanalyse qui pourront être utilisées avec d'autres types de biguanide.

4.2 Perspectives

Comme la quantification de la phenformine et du PEBB dans certains tissus fut impossible, il serait envisageable de changer d'instrumentation pour obtenir ces informations. Il serait, dans un premier temps, possible d'utiliser la méthode LC-MS développée dans le **chapitre 2** de ce manuscrit afin de déterminer la concentration de phenformine et de PEBB dans les organes où la quantification n'a pas été possible par MALDI-IMS. Il faudrait d'abord l'extraire par des méthodes disponibles dans la littérature pour obtenir un échantillon liquide. Celui-ci serait ensuite purifié sur une phase solide, comme une échangeuse d'ions, pour minimiser la présence de contaminant avant son analyse par LC-MS. Bien qu'il ne serait pas possible de faire l'IMS de ces échantillons, la concentration moyenne des analytes dans les organes pourrait tout de même être mesurée.

L'imprécision lors de la déposition des gouttes de solution étalon lors de l'élaboration de la courbe d'étalonnage de la méthode de quantification par MALDI-IMS occasionne un haut écart-type sur ses mesures par IMS. Plusieurs autres méthodes pourraient être envisagées afin de pallier ce problème. L'ajout d'EI pourrait également être une idée afin d'améliorer la méthode de quantification. Une des méthodes bien décrites dans la littérature est de simplement faire plusieurs homogénats dopés avec une concentration connue d'analytes (**Figure 36**). L'avantage de cette méthode est que l'analyte est distribué de façon homogène réduisant ainsi la variation d'un échantillon à un autre.¹¹⁵ De plus, ce tissu mimétique est une meilleure représentation d'un médicament ayant diffusé dans un tissu.

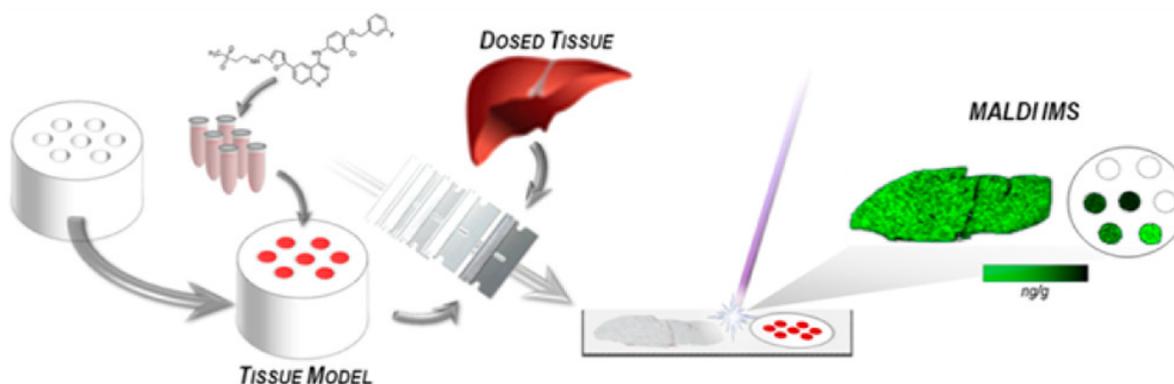


Figure 36 Méthode employant un tissu mimétique dope pour l'établissement d'une courbe d'étalonnage par MALDI-IMS. La méthode consiste à doper plusieurs homogénats afin d'obtenir une gamme de concentrations. Tous les homogénats sont par la suite encastrés dans un même bloc de polymère CMC afin d'être simultanément découpe et analyse par MALDI-IMS. Les signaux récupérés en provenance de chaque bloc permettent de construire la courbe d'étalonnage.¹¹⁵

Comme mentionné à la **section - 3.3**, l'IMS des tissus adipeux est difficile dû à leur forte délocalisation sur la surface d'analyse. Plusieurs chercheurs développent des méthodes afin de remédier à ce problème. L'une d'entre elles est de recouvrir la surface d'analyse d'oxyde d'aluminium ce qui aiderait à maintenir le gras viscéral en place et de grandement réduire sa diffusion.¹¹⁶ L'ajout d'oxyde d'aluminium augmente la porosité et l'hydrophobicité de la surface amenant une meilleure affinité pour les tissus adipeux. Cette voie est facile et peu coûteuse et pourrait permettre l'analyse de tels échantillons.

Les études présentées au sein de ce mémoire se sont concentrées sur des méthodes nous renseignant principalement sur l'absorption et la distribution des composés biguanides. Il serait intéressant de poursuivre l'étude en explorant le métabolisme et l'élimination de ces composés. Comme les analogues de type biguanide synthétisés dans le groupe Schmitzer sont plus lipophiles que la metformine, il est vrai de présumer que ceux-ci devront subir des biotransformations afin d'être plus solubles pour être éliminés. L'étude des métabolites est cruciale lors du développement de médicaments, car certains métabolites secondaires peuvent être toxiques.¹¹⁷ De plus, la clairance métabolique est un processus qui influence l'élimination de tous médicaments. Plusieurs protocoles ont été conçus pour faire de l'analyse de biotransformations avec des composés pharmaceutiques.¹¹⁸⁻¹²⁰ Les microsomes de foie sont un modèle *in vitro* grandement utilisé pour mimer les biotransformations de phase I et II du métabolisme.¹²¹ Il s'agit de parties subcellulaires extraites du réticulum endoplasmique du foie contenant toutes les enzymes de type CYP. Il suffit

d'ajouter le co-facteur des enzymes afin d'enclencher la réaction. Suite à la biotransformation des composés par les microsomes, il sera possible de déterminer la structure des métabolites par LC-MS en mode MRM. Des logiciels ont été développés afin de trouver par spectrométrie de masse le type de transformation que l'analyte a subi en se basant sur le déplacement de masse sur le spectre.¹²² Plusieurs études *in silico* permettent de prédire la biotransformation que subit un composé en se basant sur la polarité, la conformation et l'hydrophobie de celui-ci.¹²³ Ces dernières méthodes peuvent être utilisées en parallèle afin de confirmer la classe de CYP qui est intervenue dans la réaction. De plus, il existe des marqueurs spécifiques aux transformations des différents isoformes de CYP. Il suffit d'en ajouter dans le milieu réactionnel afin d'identifier quel CYP catalyse la biotransformation.¹²¹

En complémentarité avec cette analyse, il serait intéressant d'analyser l'urine de souris traitées avec les dérivés de type biguanides afin de voir dans un premier temps la proportion non métabolisée par rapport à la dose administrée. Ensuite, il serait intéressant de confirmer si le modèle *in vitro* de microsome se produit bien *in vivo*. L'identification des métabolites et des analogues de biguanide pourrait être faite en suivant la méthode de quantification dans les liquides biologiques développée au **chapitre 2**.

Références

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F., Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2021**, *71* (3), 209-249.
2. Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Fuchs, H. E.; Jemal, A., Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2022**, *72* (1), 7-33.
3. Small Jr, W.; Bacon, M. A.; Bajaj, A.; Chuang, L. T.; Fisher, B. J.; Harkenrider, M. M.; Jhingran, A.; Kitchener, H. C.; Mileskin, L. R.; Viswanathan, A. N.; Gaffney, D. K., Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer* **2017**, *123* (13), 2404-2412.
4. Musacchio, A., The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Current Biology* **2015**, *25* (20), R1002-R1018.
5. Fisher, R. P., The CDK Network: Linking Cycles of Cell Division and Gene Expression. *Genes & Cancer* **2012**, *3* (11-12), 731-738.
6. McDonald, E. R.; El-Deiry, W. S., Checkpoint genes in cancer. *Annals of Medicine* **2001**, *33* (2), 113-122.
7. Lee, J. M.; Bernstein, A., Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer and Metastasis Reviews* **1995**, *14* (2), 149-161.
8. Carvajal, L. A.; Manfredi, J. J., Another fork in the road—life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO reports* **2013**, *14* (5), 414-421.
9. Payne, S. R.; Kemp, C. J., Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis* **2005**, *26* (12), 2031-2045.
10. Kleeff, J.; Korc, M.; Apte, M.; La Vecchia, C.; Johnson, C. D.; Biankin, A. V.; Neale, R. E.; Tempero, M.; Tuveson, D. A.; Hruban, R. H.; Neoptolemos, J. P., Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers* **2016**, *2* (1), 16022.
11. D'Amour, K. A.; Bang, A. G.; Eliazar, S.; Kelly, O. G.; Agulnick, A. D.; Smart, N. G.; Moorman, M. A.; Kroon, E.; Carpenter, M. K.; Baetge, E. E., Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* **2006**, *24* (11), 1392-1401.
12. Porte Jr, D.; Bagdade, J. D., Human insulin secretion: an integrated approach. *Annual review of medicine* **1970**, *21* (1), 219-240.
13. Hatting, M.; Tavares, C. D. J.; Sharabi, K.; Rines, A. K.; Puigserver, P., Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2018**, *1411* (1), 21-35.
14. Yuan, L.; Wang, M.; Zhang, X.; Wang, Z., Effects of protease and non-starch polysaccharide enzyme on performance, digestive function, activity and gene expression of endogenous enzyme of broilers. *PLoS One* **2017**, *12* (3), e0173941.
15. Isenman, L.; Liebow, C.; Rothman, S., The endocrine secretion of mammalian digestive enzymes by exocrine glands. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **1999**, *276* (2), E223-E232.
16. Figarella, C.; Clemente, F.; Guy, O., On zymogens of human pancreatic juice. *FEBS letters* **1969**, *3* (5), 351-353.
17. Brissova, M.; Shostak, A.; Shiota, M.; Wiebe, P. O.; Poffenberger, G.; Kantz, J.; Chen, Z.; Carr, C.; Jerome, W. G.; Chen, J.; Baldwin, H. S.; Nicholson, W.; Bader, D. M.; Jetton, T.; Gannon,

- M.; Powers, A. C., Pancreatic Islet Production of Vascular Endothelial Growth Factor-A Is Essential for Islet Vascularization, Revascularization, and Function. *Diabetes* **2006**, *55* (11), 2974-2985.
18. Carlsson, P. O.; Liss, P.; Andersson, A.; Jansson, L., Measurements of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. *Diabetes* **1998**, *47* (7), 1027-1032.
19. Adamska, A.; Domenichini, A.; Falasca, M., Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18* (7), 1338.
20. Vincent, A.; Herman, J.; Schulick, R.; Hruban, R. H.; Goggins, M., Pancreatic cancer. *The Lancet* **2011**, *378* (9791), 607-620.
21. Bond-Smith, G.; Banga, N.; Hammond, T. M.; Imber, C. J., Pancreatic adenocarcinoma. *BMJ : British Medical Journal* **2012**, *344*, e2476.
22. Chen, L. L.; Blumm, N.; Christakis, N. A.; Barabási, A. L.; Deisboeck, T. S., Cancer metastasis networks and the prediction of progression patterns. *British Journal of Cancer* **2009**, *101* (5), 749-758.
23. Locker, G. Y.; Hamilton, S.; Harris, J.; Jessup, J. M.; Kemeny, N.; Macdonald, J. S.; Somerfield, M. R.; Hayes, D. F.; Jr, R. C. B., ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2006**, *24* (33), 5313-5327.
24. Goonetilleke, K. S.; Siriwardena, A. K., Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* **2007**, *33* (3), 266-270.
25. Sun, Z.; Zhang, N., Clinical evaluation of CEA, CA19-9, CA72-4 and CA125 in gastric cancer patients with neoadjuvant chemotherapy. *World Journal of Surgical Oncology* **2014**, *12* (1), 397.
26. Scarpa, M.; Noaro, G.; Saadeh, L.; Cavallin, F.; Cagol, M.; Alfieri, R.; Plebani, M.; Castoro, C., Esophageal Cancer Management: Preoperative CA19.9 and CEA Serum Levels May Identify Occult Advanced Adenocarcinoma. *World Journal of Surgery* **2015**, *39* (2), 424-432.
27. Kodama, T.; Satoh, H.; Ishikawa, H.; Ohtsuka, M., Serum Levels of CA19-9 in patients with nonmalignant respiratory diseases. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **2007**, *21* (2), 103-106.
28. Luo, G.; Jin, K.; Deng, S.; Cheng, H.; Fan, Z.; Gong, Y.; Qian, Y.; Huang, Q.; Ni, Q.; Liu, C.; Yu, X., Roles of CA19-9 in pancreatic cancer: Biomarker, predictor and promoter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2021**, *1875* (2), 188409.
29. Ethun, C. G.; Kooby, D. A., The importance of surgical margins in pancreatic cancer. *Journal of Surgical Oncology* **2016**, *113* (3), 283-288.
30. Michalski, C. W.; Weitz, J.; Büchler, M. W., Surgery Insight: surgical management of pancreatic cancer. *Nature Clinical Practice Oncology* **2007**, *4* (9), 526-535.
31. Reddy, S. K.; Tyler, D. S.; Pappas, T. N.; Clary, B. M., Extended Resection for Pancreatic Adenocarcinoma. *The Oncologist* **2007**, *12* (6), 654-663.
32. Rahib, L.; Smith, B. D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A. B.; Fleshman, J. M.; Matrisian, L. M., Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research* **2014**, *74* (11), 2913-2921.
33. 3rd, H. A. B.; Moore, M. J.; Andersen, J.; Green, M. R.; Rothenberg, M. L.; Modiano, M. R.; Cripps, M. C.; Portenoy, R. K.; Storniolo, A. M.; Tarassoff, P.; Nelson, R.; Dorr, F. A.; Stephens, C. D.; Hoff, D. D. V., Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* **1997**, *15* (6), 2403-2413.

34. Landry, J.; Catalano, P. J.; Staley, C.; Harris, W.; Hoffman, J.; Talamonti, M.; Xu, N.; Cooper, H.; Benson III, A. B., Randomized phase II study of gemcitabine plus radiotherapy versus gemcitabine, 5-fluorouracil, and cisplatin followed by radiotherapy and 5-fluorouracil for patients with locally advanced, potentially resectable pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Surgical Oncology* **2010**, *101* (7), 587-592.
35. Ychou, M.; Conroy, T.; Seitz, J. F.; Gourgou, S.; Hua, A.; Mery-Mignard, D.; Kramar, A., An open phase I study assessing the feasibility of the triple combination: oxaliplatin plus irinotecan plus leucovorin/ 5-fluorouracil every 2 weeks in patients with advanced solid tumors. *Annals of Oncology* **2003**, *14* (3), 481-489.
36. Conroy, T.; Desseigne, F.; Ychou, M.; Bouché, O.; Guimbaud, R.; Bécouarn, Y.; Adenis, A.; Raoul, J.-L.; Gourgou-Bourgade, S.; de la Fouchardière, C.; Bennouna, J.; Bachet, J.-B.; Khemissa-Akouz, F.; Péré-Vergé, D.; Delbaldo, C.; Assenat, E.; Chauffert, B.; Michel, P.; Montoto-Grillot, C.; Ducreux, M., FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine* **2011**, *364* (19), 1817-1825.
37. Mahaseh, H.; Brucher, E.; Kauh, J.; Hawk, N.; Kim, S.; Chen, Z.; Kooby, D. A.; Maithel, S. K.; Landry, J.; El-Rayes, B. F., Modified FOLFIRINOX Regimen With Improved Safety and Maintained Efficacy in Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas* **2013**, *42* (8), 1311-1315.
38. Iwai, Y.; Ishida, M.; Tanaka, Y.; Okazaki, T.; Honjo, T.; Minato, N., Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (19), 12293-12297.
39. Allard, B.; Pommey, S.; Smyth, M. J.; Stagg, J., Targeting CD73 Enhances the Antitumor Activity of Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 mAbs. *Clinical Cancer Research* **2013**, *19* (20), 5626-5635.
40. Royal, R. E.; Levy, C.; Turner, K.; Mathur, A.; Hughes, M.; Kammula, U. S.; Sherry, R. M.; Topalian, S. L.; Yang, J. C.; Lowy, I.; Rosenberg, S. A., Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother* **2010**, *33* (8), 828-833.
41. O'Reilly, E. M.; Oh, D.-Y.; Dhani, N.; Renouf, D. J.; Lee, M. A.; Sun, W.; Fisher, G.; Hezel, A.; Chang, S.-C.; Vlahovic, G.; Takahashi, O.; Yang, Y.; Fitts, D.; Philip, P. A., Durvalumab With or Without Tremelimumab for Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology* **2019**, *5* (10), 1431-1438.
42. Weiss, G. J.; Blaydorn, L.; Beck, J.; Bornemann-Kolatzki, K.; Urnovitz, H.; Schütz, E.; Khemka, V., Phase Ib/II study of gemcitabine, nab-paclitaxel, and pembrolizumab in metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Investigational New Drugs* **2018**, *36* (1), 96-102.
43. Jaffee, E. M.; Hruban, R. H.; Biedrzycki, B.; Laheru, D.; Schepers, K.; Sauter, P. R.; Goemann, M.; Coleman, J.; Grochow, L.; Donehower, R. C.; Lillemoe, K. D.; O'Reilly, S.; Abrams, R. A.; Pardoll, D. M.; Cameron, J. L.; Yeo, C. J., Novel Allogeneic Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor–Secreting Tumor Vaccine for Pancreatic Cancer: A Phase I Trial of Safety and Immune Activation. *Journal of Clinical Oncology* **2001**, *19* (1), 145-156.
44. Weitzenfeld, P.; Bournazos, S.; Ravetch, J. V., Antibodies targeting sialyl Lewis A mediate tumor clearance through distinct effector pathways. *The Journal of Clinical Investigation* **2019**, *129* (9), 3952-3962.
45. Le, D. T.; Picozzi, V. J.; Ko, A. H.; Wainberg, Z. A.; Kindler, H.; Wang-Gillam, A.; Oberstein, P.; Morse, M. A.; Zeh, H. J., III; Weekes, C.; Reid, T.; Borazanci, E.; Crocenzi, T.; LoConte, N. K.; Musher, B.; Laheru, D.; Murphy, A.; Whiting, C.; Nair, N.; Enstrom, A.; Ferber, S.; Brockstedt,

- D. G.; Jaffee, E. M., Results from a Phase IIb, Randomized, Multicenter Study of GVAX Pancreas and CRS-207 Compared with Chemotherapy in Adults with Previously Treated Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma (ECLIPSE Study). *Clinical Cancer Research* **2019**, *25* (18), 5493-5502.
46. Osborne, N.; Sundseth, R.; Gay, M. D.; Cao, H.; Tucker, R. D.; Nadella, S.; Wang, S.; Liu, X.; Kroemer, A.; Sutton, L.; Cato, A.; Smith, J. P., Vaccine against gastrin, a polyclonal antibody stimulator, decreases pancreatic cancer metastases. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2019**, *317* (5), G682-G693.
47. Luo, W.; Yang, G.; Luo, W.; Cao, Z.; Liu, Y.; Qiu, J.; Chen, G.; You, L.; Zhao, F.; Zheng, L.; Zhang, T., Novel therapeutic strategies and perspectives for metastatic pancreatic cancer: vaccine therapy is more than just a theory. *Cancer Cell International* **2020**, *20* (1), 66.
48. Ouyang, X.; Liu, Y.; Zhou, Y.; Guo, J.; Wei, T.-T.; Liu, C.; Lee, B.; Chen, B.; Zhang, A.; Casey, K. M.; Wang, L.; Kooreman, N. G.; Habtezion, A.; Engleman, E. G.; Wu, J. C., Antitumor effects of iPSC-based cancer vaccine in pancreatic cancer. *Stem Cell Reports* **2021**, *16* (6), 1468-1477.
49. Wang, H. X.; Ng, T. B., Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life Sciences* **1999**, *65* (25), 2663-2677.
50. Curd, F. H. S.; Davey, D. G.; Rose, F. L., Studies on Synthetic Antimalarial Drugs. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **1945**, *39* (3-4), 208-216.
51. Skeith, A. E.; Morgan, D. M.; Schmidt, P. C., Vaginal preparation with povidone-iodine or chlorhexidine before hysterectomy: a propensity score matched analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **2021**, *225* (5), 560.e1-560.e9.
52. Russell, A. D.; Day, M. J., Antibacterial activity of chlorhexidine. *Journal of Hospital Infection* **1993**, *25* (4), 229-238.
53. Hundal, R. S.; Krssak, M.; Dufour, S.; Laurent, D.; Lebon, V.; Chandramouli, V.; Inzucchi, S. E.; Schumann, W. C.; Petersen, K. F.; Landau, B. R.; Shulman, G. I., Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* **2000**, *49* (12), 2063-2069.
54. Shen, S.-W.; Bressler, R., Clinical pharmacology of oral antidiabetic agents. *New England journal of medicine* **1977**, *296* (9), 493-497.
55. Sekso, M.; Solter, M.; Zjačić, V.; Čabrijan, T., Treatment of reactive hypoglycemia with buformin. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1975**, *28* (11), 1271-1276.
56. Luft, D.; Schmülling, R. M.; Eggstein, M., Lactic acidosis in biguanide-treated diabetics. *Diabetologia* **1978**, *14* (2), 75-87.
57. Le, S.; Lee, G. C., Emerging Trends in Metformin Prescribing in the United States from 2000 to 2015. *Clinical Drug Investigation* **2019**, *39* (8), 757-763.
58. Madiraju, A. K.; Qiu, Y.; Perry, R. J.; Rahimi, Y.; Zhang, X.-M.; Zhang, D.; Camporez, J.-P. G.; Cline, G. W.; Butrico, G. M.; Kemp, B. E.; Casals, G.; Steinberg, G. R.; Vatner, D. F.; Petersen, K. F.; Shulman, G. I., Metformin inhibits gluconeogenesis via a redox-dependent mechanism in vivo. *Nature Medicine* **2018**, *24* (9), 1384-1394.
59. Memmott, R. M.; Mercado, J. R.; Maier, C. R.; Kawabata, S.; Fox, S. D.; Dennis, P. A., Metformin Prevents Tobacco Carcinogen-Induced Lung Tumorigenesis. *Cancer Prevention Research* **2010**, *3* (9), 1066-1076.

60. Kumar, S.; Meuter, A.; Thapa, P.; Langstraat, C.; Giri, S.; Chien, J.; Rattan, R.; Cliby, W.; Shridhar, V., Metformin intake is associated with better survival in ovarian cancer. *Cancer* **2013**, *119* (3), 555-562.
61. Hadad, S.; Iwamoto, T.; Jordan, L.; Purdie, C.; Bray, S.; Baker, L.; Jellema, G.; Deharo, S.; Hardie, D. G.; Pusztai, L.; Moulder-Thompson, S.; Dewar, J. A.; Thompson, A. M., Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. *Breast Cancer Research and Treatment* **2011**, *128* (3), 783-794.
62. Lee, M.-S.; Hsu, C.-C.; Wahlqvist, M. L.; Tsai, H.-N.; Chang, Y.-H.; Huang, Y.-C., Type 2 diabetes increases and metformin reduces total, colorectal, liver and pancreatic cancer incidences in Taiwanese: a representative population prospective cohort study of 800,000 individuals. *BMC Cancer* **2011**, *11* (1), 20.
63. Luengo, A.; Sullivan, L. B.; Heiden, M. G. V., Understanding the complexity of metformin action: limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy. *BMC Biology* **2014**, *12* (1), 82.
64. Ding, Y.; Jia, Y.; Song, Y.; Lu, C.; Li, Y.; Chen, M.; Wang, M.; Wen, A., The effect of lansoprazole, an OCT inhibitor, on metformin pharmacokinetics in healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology* **2014**, *70* (2), 141-146.
65. Takane, H.; Shikata, E.; Otsubo, K.; Higuchi, S.; Ieiri, I., Polymorphism in human organic cation transporters and metformin action. *Pharmacogenomics* **2008**, *9* (4), 415-422.
66. Gong, L.; Goswami, S.; Giacomini, K. M.; Altman, R. B.; Klein, T. E., Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and Genomics* **2012**, *22* (11), 820-827.
67. LaMoia, T. E.; Butrico, G. M.; Kalpage, H. A.; Goedeke, L.; Hubbard, B. T.; Vatner, D. F.; Gaspar, R. C.; Zhang, X.-M.; Cline, G. W.; Nakahara, K.; Woo, S.; Shimada, A.; Hüttemann, M.; Shulman, G. I., Metformin, phenformin, and galegine inhibit complex IV activity and reduce glycerol-derived gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2022**, *119* (10), e2122287119.
68. Sabatini, D. M., mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6* (9), 729-734.
69. Veiga, S. R.; Ge, X.; Mercer, C. A.; Hernández-Álvarez, M. I.; Thomas, H. E.; Hernandez-Losa, J.; Ramón y Cajal, S.; Zorzano, A.; Thomas, G.; Kozma, S. C., Phenformin-Induced Mitochondrial Dysfunction Sensitizes Hepatocellular Carcinoma for Dual Inhibition of mTOR. *Clinical Cancer Research* **2018**, *24* (15), 3767-3780.
70. Cameron, M. E.; Yakovenko, A.; Trevino, J. G., Glucose and Lactate Transport in Pancreatic Cancer: Glycolytic Metabolism Revisited. *Journal of Oncology* **2018**, *2018*, 6214838.
71. Kumar, C. S.; Raja, M. D.; Sundar, D. S.; Gover Antoniraj, M.; Ruckmani, K., Hyaluronic acid co-functionalized gold nanoparticle complex for the targeted delivery of metformin in the treatment of liver cancer (HepG2 cells). *Carbohydrate Polymers* **2015**, *128*, 63-74.
72. Snima, K. S.; Jayakumar, R.; Unnikrishnan, A. G.; Nair, S. V.; Lakshmanan, V.-K., O-Carboxymethyl chitosan nanoparticles for metformin delivery to pancreatic cancer cells. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *89* (3), 1003-1007.
73. Wang, J.; Chin, D.; Poon, C.; Mancino, V.; Pham, J.; Li, H.; Ho, P.-Y.; Hallows, K. R.; Chung, E. J., Oral delivery of metformin by chitosan nanoparticles for polycystic kidney disease. *Journal of Controlled Release* **2021**, *329*, 1198-1209.

74. Shukla, S. K.; Kulkarni, N. S.; Chan, A.; Parvathaneni, V.; Farrales, P.; Muth, A.; Gupta, V., Metformin-Encapsulated Liposome Delivery System: An Effective Treatment Approach against Breast Cancer. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (11), 559.
75. Chengnan, L.; Pagneux, Q.; Voronova, A.; Barras, A.; Abderrahmani, A.; Plaisance, V.; Pawlowski, V.; Hennuyer, N.; Staels, B.; Rosselle, L.; Skandrani, N.; Li, M.; Boukherroub, R.; Szunerits, S., Near-infrared light activatable hydrogels for metformin delivery. *Nanoscale* **2019**, *11* (34), 15810-15820.
76. Ubaid, M.; Murtaza, G., Fabrication and characterization of genipin cross-linked chitosan/gelatin hydrogel for pH-sensitive, oral delivery of metformin with an application of response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *114*, 1174-1185.
77. Secret, E.; Kelly, S. J.; Crannell, K. E.; Andrew, J. S., Enzyme-Responsive Hydrogel Microparticles for Pulmonary Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6* (13), 10313-10321.
78. Kim, J.-H.; Randall Lee, T., Discrete thermally responsive hydrogel-coated gold nanoparticles for use as drug-delivery vehicles. *Drug Development Research* **2006**, *67* (1), 61-69.
79. Hébert, A.; Parisotto, M.; Rowell, M.-C.; Doré, A.; Fernandez Ruiz, A.; Lefrançois, G.; Kalegari, P.; Ferbeyre, G.; Schmitzer, A. R., Phenylethynylbenzyl-modified biguanides inhibit pancreatic cancer tumor growth. *Scientific Reports* **2021**, *11* (1), 9854.
80. Hébert, A.; Parisotto, M.; Ferbeyre, G.; Schmitzer, A. R., Membrane permeabilization and perturbation induced by alkyl-biguanidium salts. *Supramolecular Chemistry* **2019**, *31* (3), 127-139.
81. Chillistone, S.; Hardman, J. G., Factors affecting drug absorption and distribution. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* **2017**, *18* (7), 335-339.
82. Martinez, M. N.; Amidon, G. L., A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals. *The Journal of Clinical Pharmacology* **2002**, *42* (6), 620-643.
83. Nelson, E., Kinetics of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1961**, *50* (3), 181-192.
84. Lin, L.; Wong, H., Predicting Oral Drug Absorption: Mini Review on Physiologically-Based Pharmacokinetic Models. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (4), 41.
85. Glen, I., Pharmacokinetic variation. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* **2005**, *6* (8), 282-285.
86. Benet, L. Z.; Zia-Amirhosseini, P., Basic Principles of Pharmacokinetics. *Toxicologic Pathology* **1995**, *23* (2), 115-123.
87. van de Waterbeemd, H.; Gifford, E., ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2* (3), 192-204.
88. Mahmood, I., Dosing in children: a critical review of the pharmacokinetic allometric scaling and modelling approaches in paediatric drug development and clinical settings. *Clin Pharmacokinet* **2014**, *53* (4), 327-46.
89. Zuckerman, M.; Greller, H. A.; Babu, K. M., A Review of the Toxicologic Implications of Obesity. *Journal of Medical Toxicology* **2015**, *11* (3), 342-354.
90. Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E., Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **2010**, *154* (2), 103-116.

91. Krueger, S. K.; Williams, D. E., Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* **2005**, *106* (3), 357-387.
92. Androulakakis, A.; Alygizakis, N.; Gkotsis, G.; Nika, M.-C.; Nikolopoulou, V.; Bizani, E.; Chadwick, E.; Cincinelli, A.; Claßen, D.; Danielsson, S.; Dekker, R. W. R. J.; Duke, G.; Glowacka, N.; Jansman, H. A. H.; Krone, O.; Martellini, T.; Movalli, P.; Persson, S.; Roos, A.; O'Rourke, E.; Siebert, U.; Treu, G.; van den Brink, N. W.; Walker, L. A.; Deaville, R.; Slobodnik, J.; Thomaidis, N. S., Determination of 56 per- and polyfluoroalkyl substances in top predators and their prey from Northern Europe by LC-MS/MS. *Chemosphere* **2022**, *287*, 131775.
93. Sivanich, M. K.; Gu, T.-J.; Tabang, D. N.; Li, L., Recent advances in isobaric labeling and applications in quantitative proteomics. *PROTEOMICS n/a* (n/a), 2100256.
94. Montiel-León, J. M.; Munoz, G.; Vo Duy, S.; Do, D. T.; Vaudreuil, M.-A.; Goery, K.; Guillemette, F.; Amyot, M.; Sauvé, S., Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environmental Pollution* **2019**, *250*, 29-39.
95. Merone, G. M.; Tartaglia, A.; Rossi, S.; Santavenere, F.; Bassotti, E.; D'Ovidio, C.; Rosato, E.; de Grazia, U.; Locatelli, M.; Boccio, P. D.; Savini, F., Fast LC-MS/MS screening method for the evaluation of drugs, illicit drugs, and other compounds in biological matrices. *Talanta Open* **2022**, *5*, 100105.
96. Kebarle, P.; Tang, L., From ions in solution to ions in the gas phase-the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical chemistry* **1993**, *65* (22), 972A-986A.
97. Xie, Z.; Ferreira, C. R.; Virequ, A. A.; Cooks, R. G., Multiple reaction monitoring profiling (MRM profiling): Small molecule exploratory analysis guided by chemical functionality. *Chemistry and Physics of Lipids* **2021**, *235*, 105048.
98. Vékey, K., Internal Energy Effects in Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **1996**, *31* (5), 445-463.
99. Weaver, R.; Riley, R. J., Identification and reduction of ion suppression effects on pharmacokinetic parameters by polyethylene glycol 400. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20* (17), 2559-2564.
100. Zhao, Y.; Tsang, C.-C.; Xiao, M.; Chan, J. F. W.; Lau, S. K. P.; Kong, F.; Xu, Y.; Woo, P. C. Y., Yeast identification by sequencing, biochemical kits, MALDI-TOF MS and rep-PCR DNA fingerprinting. *Medical Mycology* **2017**, *56* (7), 816-827.
101. Yergey, A. L.; Coorsen, J. R.; Backlund, P. S.; Blank, P. S.; Humphrey, G. A.; Zimmerberg, J.; Campbell, J. M.; Vestal, M. L., De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13* (7), 784-791.
102. Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Billheimer, D.; Xu, B. J.; Crecelius, A.; Caprioli, R. M., Integrating Histology and Imaging Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2004**, *76* (4), 1145-1155.
103. Castellino, S.; Groseclose, M. R.; Wagner, D., MALDI imaging mass spectrometry: bridging biology and chemistry in drug development. *Bioanalysis* **2011**, *3* (21), 2427-2441.
104. Bowman, A. P.; Heeren, R. M. A.; Ellis, S. R., Advances in mass spectrometry imaging enabling observation of localised lipid biochemistry within tissues. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *120*, 115197.

105. Fuchs, B.; Schiller, J., Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2009**, *111* (1), 83-98.
106. Clark, C. M.; Costa, M. S.; Sanchez, L. M.; Murphy, B. T., Coupling MALDI-TOF mass spectrometry protein and specialized metabolite analyses to rapidly discriminate bacterial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2018**, *115* (19), 4981-4986.
107. Yao, Y.; Wang, P.; Shao, G.; Del Toro, L. V. A.; Codero, J.; Giese, R. W., Nontargeted analysis of the urine nonpolar sulfatome: a pathway to the nonpolar xenobiotic exposome. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2016**, *30* (21), 2341-2350.
108. Ntshangase, S.; Mdanda, S.; Naicker, T.; Kruger, H. G.; Baijnath, S.; Govender, T., Spatial distribution of elvitegravir and tenofovir in rat brain tissue: Application of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2019**, *33* (21), 1643-1651.
109. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J., Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry* **1997**, *69* (23), 4751-4760.
110. Yao, Y. Nontargeted Discovery of Xenobiotics in Human Urine by MALDI-TOF/TOF-MS. Ph.D., Northeastern University, Ann Arbor, 2018.
111. Ryan, D. J.; Spraggins, J. M.; Caprioli, R. M., Protein identification strategies in MALDI imaging mass spectrometry: a brief review. *Current Opinion in Chemical Biology* **2019**, *48*, 64-72.
112. Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C., Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18* (9), 1646-1652.
113. Gemperline, E.; Rawson, S.; Li, L., Optimization and Comparison of Multiple MALDI Matrix Application Methods for Small Molecule Mass Spectrometric Imaging. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (20), 10030-10035.
114. Comparison of Normalization Methods for the Identification of Biomarkers Using MALDI-TOF and SELDI-TOF Mass Spectra. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **2010**, *14* (1), 115-126.
115. Groseclose, M. R.; Castellino, S., A Mimetic Tissue Model for the Quantification of Drug Distributions by MALDI Imaging Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (21), 10099-10106.
116. Fournelle, F.; Yang, E.; Dufresne, M.; Chaurand, P., Minimizing Visceral Fat Delocalization on Tissue Sections with Porous Aluminum Oxide Slides for Imaging Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2020**, *92* (7), 5158-5167.
117. Guengerich, F. P., Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The AAPS Journal* **2006**, *8* (1), E101-E111.
118. Clements, M.; Li, L., Strategy of using microsome-based metabolite production to facilitate the identification of endogenous metabolites by liquid chromatography mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *685* (1), 36-44.
119. Wang, P.; Zhao, Y.; Zhu, Y.; Sun, J.; Yerke, A.; Sang, S.; Yu, Z., Metabolism of dictamnine in liver microsomes from mouse, rat, dog, monkey, and human. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, *119*, 166-174.
120. Vikingsson, S.; Josefsson, M.; Gréen, H., Identification of AKB-48 and 5F-AKB-48 Metabolites in Authentic Human Urine Samples Using Human Liver Microsomes and Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* **2015**, *39* (6), 426-435.

121. Asha, S.; Vidyavathi, M., Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs—A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, *160* (6), 1699-1722.
122. Zhang, H.; Zhang, D.; Ray, K.; Zhu, M., Mass defect filter technique and its applications to drug metabolite identification by high-resolution mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *44* (7), 999-1016.
123. Attwa, M. W.; Kadi, A. A.; Abdelhameed, A. S., Phase I metabolic profiling and unexpected reactive metabolites in human liver microsome incubations of X-376 using LC-MS/MS: bioactivation pathway elucidation and in silico toxicity studies of its metabolites. *RSC Advances* **2020**, *10* (9), 5412-5427.

Annexes

A-1 Exemple de calculs

À noter que tous les exemples de calculs sont faits à partir des données mesurées pour le PEBB.

Calcul de la constante d'absorption et l'incertitude sur la mesure

À partir de l'équation 2 :

$$k_a = \frac{\ln(2)}{t_{\frac{1}{2}a}} = \frac{\ln(2)}{0,365 h} = 1,90 h^{-1}$$

Afin de calculer Δk_a , l'écart-type (σ) sur la moyenne des k_a ($\overline{k_a}$) pour chaque mesure de temps de demi-absorption a été calculé.

$$k_{a1} = \frac{\ln(2)}{0,35 h} = 1,98 h^{-1} \quad k_{a2} = \frac{\ln(2)}{0,43 h} = 1,61 h^{-1} \quad k_{a3} = \frac{\ln(2)}{0,32 h} = 2,17 h^{-1}$$

$$\overline{k_a} = \frac{(1,98 + 1,61 + 2,17)h^{-1}}{3} = 1,92 h^{-1}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(k_a - \overline{k_a})^2}{n}} = \sqrt{\frac{(1,98 - 1,92)^2 + (1,61 - 1,92)^2 + (2,17 - 1,92)^2}{3}} = 0,3$$

$$k_a = 1,9 \pm 0,3 h^{-1}$$

Calcul de la constante d'élimination et l'incertitude sur la mesure

À partir de l'équation 3 :

$$k_e = \frac{\ln(2)}{\frac{t_1}{2}} = \frac{\ln(2)}{2,73 \text{ h}} = 0,254 \text{ h}^{-1}$$

Afin de calculer Δk_e , l'écart-type (σ) sur la moyenne des k_e ($\overline{k_e}$) pour chaque mesure de temps de demi-vie a été calculé.

$$k_{e1} = \frac{\ln(2)}{3,06 \text{ h}} = 0,227 \text{ h}^{-1} \quad k_{e2} = \frac{\ln(2)}{2,43 \text{ h}} = 0,285 \text{ h}^{-1} \quad k_{e3} = \frac{\ln(2)}{2,70 \text{ h}} = 0,257 \text{ h}^{-1}$$

$$\overline{k_e} = \frac{(0,227 + 0,285 + 0,257) \text{ h}^{-1}}{3} = 0,256 \text{ h}^{-1}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(k_e - \overline{k_e})^2}{n}} = \sqrt{\frac{(0,227 - 0,256)^2 + (0,285 - 0,256)^2 + (0,257 - 0,256)^2}{3}} = 0,0292$$

$$k_e = 0,25 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$$

Calcul du volume de distribution et son incertitude

À partir de l'équation 4 :

$$V_d = \frac{D}{C_p} = \frac{35 \text{ mg/kg}}{5695 \text{ ng/mL}} = 6,14 \text{ L/kg}$$

$$D = 35 \text{ mg/kg}$$

$$C_p = 5034,5 \text{ ng/mL}$$

$$\text{Conversion : } \frac{35 \text{ mg}}{\text{kg}} \times \frac{10^6 \text{ ng}}{1 \text{ mg}} \times \frac{10^{-3} \text{ L}}{5034,5 \text{ ng}} = 35 \times 10^3$$

Afin de calculer ΔV_d , l'écart-type (σ) sur la moyenne des V_d ($\overline{V_d}$) pour chaque mesure de concentration plasmatique moyenne (C_p) a été calculée.

$$V_{d1} = \frac{35 \text{ mg/kg}}{7071 \text{ ng/mL}} = 4,95 \text{ L/kg}$$

$$V_{d2} = \frac{35 \text{ mg/kg}}{6304 \text{ ng/mL}} = 5,55 \text{ L/kg}$$

$$V_{d3} = \frac{35 \text{ mg/kg}}{3710 \text{ ng/mL}} = 9,43 \text{ L/kg}$$

$$\overline{V_d} = \frac{(4,95 + 5,55 + 9,43) \text{ L/kg}}{3} = 6,64 \text{ L/kg}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (k_e - \overline{k_e})^2}{n}} = \sqrt{\frac{(4,95 - 6,64)^2 + (5,55 - 6,64)^2 + (9,43 - 6,64)^2}{3}} = 2,43 \text{ L/kg}$$

$$V_d = 7 \pm 2 \text{ L/kg}$$

Calcul de la clairance et de son incertitude

À partir de l'équation 7 :

$$CL = V_d \times k_e = \frac{6,64L}{kg} \times 0,256 h^{-1} = 1,69 L * kg^{-1}h^{-1}$$

Afin de calculer ΔCL , l'écart-type (σ) sur la moyenne des CL (\overline{CL}) pour chaque mesure de concentration plasmatique moyenne (C_p) a été calculée.

$$CL1 = 4,95 \frac{L}{kg} \times 0,227 h^{-1} = 1,12 L * kg^{-1}h^{-1}$$

$$CL2 = 5,55 \frac{L}{kg} \times 0,285 h^{-1} = 1,58 L * kg^{-1}h^{-1}$$

$$CL3 = 9,43 \frac{L}{kg} \times 0,257 h^{-1} = 2,42 L * kg^{-1}h^{-1}$$

$$\overline{CL} = \frac{(1,12 + 1,58 + 2,42)L * kg^{-1}h^{-1}}{3} = 1,71 L * kg^{-1}h^{-1}$$

$$\begin{aligned} \sigma &= \sqrt{\frac{\sum(CL - \overline{CL})^2}{n}} = \sqrt{\frac{(1,12 - 1,71)^2 + (1,58 - 1,71)^2 + (2,42 - 1,71)^2}{3}} \\ &= 0,660 L * kg^{-1}h^{-1} \end{aligned}$$

$$CL = 1,7 \pm 0,7 L * kg^{-1}h^{-1}$$

Calcul de la concentration de PEBB dans les tissus et son incertitude.

L'exemple est montré pour la quantification de la concentration de PEBB dans le foie 120 minutes après son administration

La somme des intensités pour chaque foie est : 1939,74, 3013,20 et 2497,08

Afin d'approximer le volume analysé pour chaque tissu, on sait qu'un pixel de 150 μm équivaut à 0,00012 μL . Sachant que chacun des trois foies ont 585, 745 et 708 pixels, il est possible de calculer le volume à analyser :

$$\text{Volume 1 : } 585 \times 0,00012 \mu\text{L} = 7,02 \times 10^{-2} \mu\text{L}$$

$$\text{Volume 2 : } 745 \times 0,00012 \mu\text{L} = 8,94 \times 10^{-2} \mu\text{L}$$

$$\text{Volume 3 : } 708 \times 0,00012 \mu\text{L} = 8,50 \times 10^{-2} \mu\text{L}$$

Afin de calculer la quantité de PEBB dans chaque tissu, il suffit d'isoler x à partir de la courbe d'étalonnage à la **section 3.2.3 – Figure 30**.

$$x_1 = \frac{1939,74 - 2,8 \times 10^2}{1,7 \times 10^7} = 9,76 \times 10^{-5} \mu\text{g}$$

$$x_2 = \frac{3013,20 - 2,8 \times 10^2}{1,7 \times 10^7} = 1,61 \times 10^{-4} \mu\text{g}$$

$$x_3 = \frac{2497,08 - 2,8 \times 10^2}{1,7 \times 10^7} = 1,30 \times 10^{-4} \mu\text{g}$$

La concentration finale est :

$$\text{Concentration 1} = \left(\frac{9,76 \times 10^{-5} \mu\text{g}}{7,02 \times 10^{-2} \mu\text{L}} \right) \times 1000 = 1,39 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Concentration 1} = \left(\frac{1,61 \times 10^{-4} \mu\text{g}}{8,94 \times 10^{-2} \mu\text{L}} \right) \times 1000 = 1,80 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Concentration 1} = \left(\frac{1,30 \times 10^{-4} \mu\text{g}}{8,50 \times 10^{-2} \mu\text{L}} \right) \times 1000 = 1,53 \mu\text{g/mL}$$

La moyenne des concentrations est calculée de la façon suivante :

$$\overline{\text{Conc.}} = \frac{(1,39 + 1,80 + 1,53) \mu\text{g/mL}}{3} = 1,57 \mu\text{g/mL}$$

L'écart-type est calculée pour déterminer l'erreur sur la moyenne

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(\text{conc.} - \overline{\text{conc.}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{(1,39 - 1,57)^2 + (1,80 - 1,57)^2 + (1,53 - 1,57)^2}{3}} = 0,19 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Concentration de PEBB} = 1,6 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$$