

Université de Montréal

**Optimisation et évaluation d'un nouveau test PAMPA
amélioré pour la prédiction de l'absorption intestinale de
médicaments**

par
Sarra Zaraa

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté de pharmacie
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en sciences pharmaceutiques
option technologies pharmaceutiques

Décembre, 2013

© Sarra Zaraa, 2013

Résumé

Ce mémoire rapporte l'optimisation et l'évaluation d'une nouvelle version du test PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) appelée Néo-PAMPA. Ce test qui permet la prédiction de l'absorption intestinale de médicaments consiste en l'utilisation d'une membrane modèle de la paroi intestinale composée d'une bicouche lipidique déposée sur un coussin de polydopamine recouvrant un filtre poreux. En effet, nous nous sommes intéressés lors de ce projet à la mise en place d'une membrane artificielle qui serait plus représentative de la paroi intestinale humaine. Nous avons pu déterminer, suite à une étude comparative des propriétés de huit médicaments ainsi que les coefficients de perméabilité obtenus, que les filtres en polycarbonate présentaient le meilleur choix de support solide pour la membrane. Nous avons également vérifié la déposition du coussin de polydopamine qui apporte le caractère fluide à la bicouche lipidique. Les résultats des tests de perméabilité ont démontré que le coussin de polymère n'obstrue pas les pores du filtre après un dépôt de 4h. Nous avons par la suite étudié la déposition de la bicouche lipidique sur le filtre recouvert de polydopamine. Pour ce faire, deux méthodes de préparation de liposomes ainsi que plusieurs tailles de liposomes ont été testées. Aussi, la composition en phospholipides a été sujette à plusieurs changements. Tous ces travaux d'optimisation ont permis d'aboutir à des liposomes préparés selon la méthode du « film lipidique » à partir d'un mélange de dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) et de cholestérol. Une dernière étape d'optimisation de la déposition de la bicouche reste à améliorer. Enfin, le test standard Caco-2, qui consiste à évaluer la perméabilité des médicaments à travers une monocouche de cellules cancéreuses du colon humain, a été implémenté avec succès dans le but de comparer des données de perméabilité avec un test de référence.

Mots-clés : Optimisation, évaluation, perméabilité intestinale, PAMPA, polydopamine, phospholipides, Caco-2, médicaments

Abstract

This essay reports the optimization and evaluation of a new version of the *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* (PAMPA), called Neo-PAMPA. This test, used for the prediction of the drugs' intestinal absorption, involves the use of a model intestine cell membrane in which a lipid bilayer is supported on a polymeric cushion deposited on a filter. In this project, we are interested in the development of an artificial membrane that is more representative of the human intestinal wall. We determined, based on a comparative study of the properties of 8 drug candidates and their permeability coefficients obtained, that polycarbonate filters were the best choice of solid support for the membrane. We also verified the deposition time of the polydopamine cushion that brings the fluid nature to our membrane. The results from the permeability tests showed that the polymer cushion do not clog the pores of the filter after a 4h deposition. Then, we studied the deposition of the lipid bilayer on the polydopamine-coated filter. To do this, two methods of liposome preparation as well as several liposome sizes were tested. Moreover, several phospholipid compositions were tested. According to our evaluation, liposomes prepared according to the "lipid film" method from a mixture of DOPC and cholesterol are better suited. Nevertheless, a final optimization step for the bilayer deposition is still required. Finally, the gold standard Caco-2 assay used to assess the drug permeability across a monolayer of human Colon Colorectal adenocarcinoma cells was successfully implemented for permeability data comparison.

Keywords: Optimisation, evaluation, intestinal permeability, PAMPA, polydopamine, phospholipids, Caco-2, drugs.

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
REMERCIEMENTS	X
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
1.1 MISE EN CONTEXTE	1
1.2 LA STRUCTURE BIOLOGIQUE DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL HUMAIN	1
1.3 LES MEMBRANES SUPPORTÉES.....	6
1.4 SYSTÈME DE CLASSIFICATION BIOPHARMACEUTIQUE (SCB).....	7
1.5 TESTS PRÉDICTIONNELS DE LA BIODISPONIBILITÉ	9
1.5.1 Tests physicochimiques.....	11
1.5.2 Tests in silico.....	13
1.5.3 Tests ex vivo	14
1.5.4 Tests in situ : La perfusion in situ	15
1.5.5 Tests in vivo : Anse intestinale (perfusion intestinale chez l'homme).....	16
1.5.6 Tests cellulaires	18
1.5.7 Tests In vitro	22
1.5.8 Comparaisons des différents tests prédictifs de la biodisponibilité.....	26
1.6 OBJECTIFS	29
1.6.1 Objectif général	29
1.6.2 Objectifs spécifiques.....	30
CHAPITRE 2. OPTIMISATION DES COMPOSANTES DE LA MEMBRANE PAMPA	31
2.1 INTRODUCTION	31
2.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	35
2.2.1 Matériel.....	35
2.2.2 Méthodes	36

2.3	RÉSULTATS	39
2.3.1	<i>Nature des filtres</i>	39
2.3.2	<i>Temps de la déposition de la polydopamine sur les différents filtres</i>	41
2.3.3	<i>Effet du Tween-80 sur la déposition de la polydopamine</i>	42
2.3.4	<i>Optimisation de la composition de la bicouche lipidique</i>	44
2.4	CONCLUSION	48
	CHAPITRE 3. LE NÉO-PAMPA OPTIMISÉ.....	49
3.1	INTRODUCTION	49
3.2	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	49
3.2.1	<i>Matériel</i>	49
3.2.2	<i>Méthodes</i>	50
3.3	RÉSULTATS	52
3.3.1	<i>Tests de perméabilité Néo-PAMPA optimisé</i>	52
3.3.2	<i>Quantification de la DOPC présente dans la bicouche</i>	53
3.4	CONCLUSION	55
	CHAPITRE 4. LE TEST CELLULAIRE CACO-2	56
4.1	INTRODUCTION	56
4.2	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	56
4.2.1	<i>Matériel</i>	56
4.2.2	<i>Méthodes</i>	57
4.3	RÉSULTATS	60
	CHAPITRE 5. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	63
5.1	OPTIMISATION DES COMPOSANTES DE LA MEMBRANE PAMPA	63
5.2	PREMIÈRE VERSION DU TEST NÉO-PAMPA	64
5.3	LE TEST CELLULAIRE CACO-2.....	66
5.4	CONCLUSION	67
	BIBLIOGRAPHIE	69

Liste des tableaux

Tableau 1. 1: Tableau récapitulatif des modèles de prédiction de l'absorption de médicaments.	10
Tableau 1. 2: Tableau comparatif entre le test artificiel PAMPA et le test cellulaire Caco-2.	27
Tableau 2. 1 : Caractéristiques des filtres utilisés	32
Tableau 2. 2: Structures, classes et perméabilité apparente des molécules testées.	34
Tableau 2. 3: Coefficients de perméabilité (P_{app}) des 8 composés obtenus avec les différents types de filtres utilisés pour le test PAMPA.	40
Tableau 2. 4: Comparaison des coefficients de perméabilité obtenus avec des membranes de composition en phospholipides différentes (DMPC et DOPC)	45
Tableau 3. 1: Coefficients de perméabilité (P_{app}) obtenus avec le test Néo-PAMPA et de la littérature.	53
Tableau 3. 2: Quantification de la DOPC sur la membrane néo-PAMPA par LC-MS	54
Tableau 4. 1: Valeurs expérimentales de perméabilité apparente obtenues pour le test Caco-2.	61
Tableau 4. 2: Comparaison des coefficients de perméabilité apparente (P_{app}) expérimentaux et théoriques obtenus avec le test Caco-2.	62

Liste des figures

Figure 1. 1: Diagramme du tractus gastro-intestinal humain.....	2
Figure 1. 2: Les tissus du tractus gastro-intestinal.....	3
Figure 1. 3: Vue détaillée sur la structure des villosités présente dans la muqueuse intestinale humaine.....	4
Figure 1. 4: Les trois classes de lipides membranaires.....	5
Figure 1. 5: Exemple de modèle de membrane supportée.....	6
Figure 1. 6: Système de classification biopharmaceutique (SCB).....	8
Figure 1. 7: Structure des phases stationnaires développées par Pidgeon et coll.	13
Figure 1. 8: Étude <i>in situ</i> de l'absorption d'un médicament avec la méthode de perfusion <i>in situ</i>	16
Figure 1. 9: Segment perfusé chez l'homme crée avec le tube multi-canaux et les deux ballons gonflables.....	17
Figure 1. 10: Diagramme d'une monocouche de cellules Caco-2 cultivées sur un filtre perméable.....	19
Figure 1. 11: Schéma de principe du test PAMPA.....	23
Figure 1. 12: Schéma comparatif des données générées avec les tests Caco-2 et PAMPA pouvant indiquer le type de mécanisme de perméabilité mis en jeu.....	28
Figure 1. 13: Schéma comparatif entre la membrane modèle et le membrane biologique.....	29
Figure 2. 1: Structure moléculaire du polysorbate 80.....	33
Figure 2. 2: Les dispositifs utilisés pour les tests de perméabilité.....	35
Figure 2. 3: Déposition de la polydopamine sur le support solide.....	36
Figure 2. 4: Mécanismes de la fusion des vésicules.....	38
Figure 2. 5: Observation en microscopie électronique à balayage (MEB) de la déposition de la polydopamine sur un filtre en PVDF incubé pendant A) 24 heures et B) 4 heures.....	42
Figure 2. 6: Images de MEB de filtre de polycarbonate A) non modifié (diamètre des pores de 400 nm), B) recouvert de pDA et C) de pDA avec utilisation de Tween-80.....	43
Figure 2. 7: Images de MEB de filtre de PVDF hydrophobe	44

Figure 2. 8: Mesure DLS de la taille des liposomes.	47
Figure 2. 9: Schéma récapitulatif des travaux d'optimisation réalisés.	48
Figure 3. 1: Schéma explicatif du dispositif du Néo-PAMPA.	51
Figure 3. 2: Schéma explicatif des étapes de quantification de la DOPC.	52
Figure 4. 1: Schéma du test de perméabilité cellulaire Caco-2.	57
Figure 4. 2: Schéma récapitulatif de la préparation des échantillons à tester.	58

Liste des abréviations

BHA	: Hydroxyanisole butylé
Caco-2	: Cellules cancéreuse de colon humain
CMC	: Concentration micellaire critique
DLS	: Diffusion dynamique de la lumière
DMPC	: Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPC	: Dioléoylphosphatidylcholine
HBSS	: Solution saline équilibrée de Hanks
HEPES	: Acide 4-(-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	: Chromatographie en phase liquide à haute performance
IAM	: Membrane artificielle immobilisée
MDCK	: Madin Darby Canine Kidney
MEB	: Microscopie électronique à balayage
MES	: Acide 2-morpholino-éthanesulfonique
PAMPA	: Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
P_{app}	: Perméabilité apparente
PC	: Phosphatidylcholine
pDA	: Polydopamine
PEG	: Polyéthylène glycol
Pgp	: Glycoprotéines P
PVDF	: Polyfluorure de vinylidène
SCB	: Système de classification biopharmaceutique
TEER	: Résistance électrique transépithéliale
TGI	: Tractus gastro-intestinal
T_m	: Température de fusion
UV	: Ultra-violet

Je dédie ce mémoire à une famille hors du commun, la mienne, qui malgré la distance, m'a accompagnée tout au long de mon parcours, m'a encouragée, m'a soutenue et m'a comblée d'amour et d'affection. Vous êtes et vous serez à jamais ma plus grande fierté.

À mes nièces, sources infinies d'amour et de joie, qui ont ensoleillé ma vie et m'ont rendu le sourire à chaque fois qu'il a fait gris.

Remerciements

Lorsque je repense à ce que j'espérais accomplir au tout début de cette expérience et que je remémore ces deux dernières années de maîtrise, je ne peux qu'être émue et reconnaissante. Il ne s'agit pas d'une simple maîtrise pour moi, il s'agit d'une expérience humaine et professionnelle hors du commun.

Mes premiers remerciements s'adressent à mon directeur de recherche, le Pr. Grégoire Leclair. La liste de mercis est tellement longue qu'il m'est difficile de la dresser ici. Mais j'essaierai de résumer en disant : Merci d'avoir été le meilleur directeur qu'on puisse rêver d'avoir. Votre étiez à la fois, un mentor disponible et à l'écoute, un ami et un conseiller dévoué. Faire partie de la « famille » de recherche sur la biodisponibilité pour la maîtrise et plus tard pour le doctorat est une réelle fierté.

Je remercie également ma co-directrice, la Pr. Isabelle Marcotte, pour ses conseils, sa disponibilité, ses encouragements, son remarquable encadrement et sa grande gentillesse.

Je ne peux certainement pas oublier de remercier Marie-Eve Leclaire, la meilleure coéquipière qu'on puisse avoir dans un projet de recherche et aussi une amie spéciale, et Souryvanh Nirasay, notre partenaire de l'équipe PAMPA. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous deux. À tous les professeurs de l'équipe PAMPA, un grand merci pour vos conseils, votre disponibilité et votre implication dans ce projet.

J'adresse enfin mes sincères remerciements aux professeurs et aux étudiants de l'axe « formulation et analyse des médicaments », à l'équipe de la plateforme de biopharmacie, et tous les stagiaires ayant fait partie de cette grande famille qui est celle du « 4^{ème} étage » et qui ont aidé de près ou de loin à l'élaboration de ce projet de maîtrise. Merci pour vos conseils, votre disponibilité, votre gentillesse, votre implication et surtout pour le bien-être qui règne au sein de cette grande équipe et qui est le fruit de la présence de chacun d'entre vous.

Chapitre 1. Introduction

1.1 Mise en contexte

L'environnement actuel de la recherche et développement (R&D) en médicaments est caractérisé par des défis majeurs, incluant l'apport innovant des industries pharmaceutiques qui est insuffisant pour remplacer les revenus des médicaments qui sont rendus génériques, ce qui diminue le capital investi par les compagnies lors des premiers stages de découverte de médicaments [1]. Cette phase de découverte consiste à identifier de nouvelles entités chimiques non seulement efficaces et sélectives, mais également avec des propriétés pharmacocinétiques *in vivo* appropriées telles que l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME), afin d'augmenter le taux de succès des essais cliniques. Un composé prometteur doit être soluble et perméable pour diffuser vers la circulation systémique après administration orale. Afin de mieux comprendre ces propriétés pharmacocinétiques, telles que l'absorption, il est important de bien connaître son parcours dans le tractus gastro-intestinal humain.

1.2 La structure biologique du tractus gastro-intestinal humain

Le tractus gastro-intestinal (TGI) humain est formé de plusieurs parties (Figure 1.1), mais possède une structure similaire de l'œsophage jusqu'à l'anus, avec quelques variations au niveau de chaque site qui leur confèrent des fonctions spécifiques.

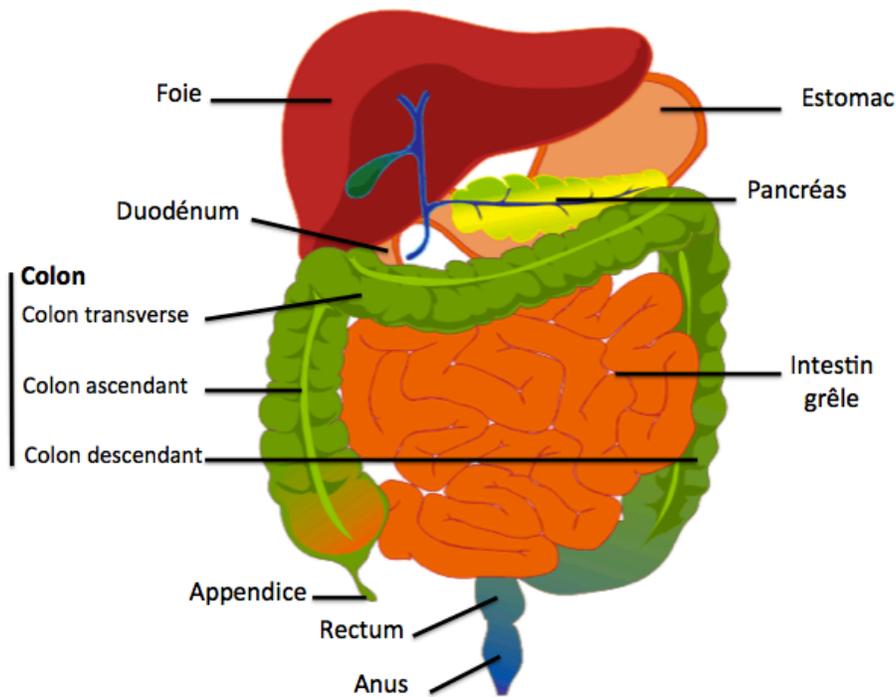


Figure 1. 1: Diagramme du tractus gastro-intestinal humain.

Adaptée avec permission [2]

La paroi digestive est composée de quatre couches majeures : le péritoine viscéral (composé de séreuse et de sous-séreuse), les couches musculuse, sous-muqueuse et muqueuse (Figure 1. 2). La couche séreuse est la couche externe du tractus gastro-intestinal et comprend des tissus conjonctifs. Juste au-dessous se trouve une double couche de muscles lisses qui forment la couche musculuse et qui ne sont pas sous le contrôle du cerveau. La couche d'après, appelée sous-muqueuse, comprend les vaisseaux lymphatiques ainsi que les vaisseaux sanguins. Vient enfin la dernière couche qui est en contact direct avec les composés qui traversent le système : la muqueuse constituée de cellules épithéliales dans ses extrémités [3].

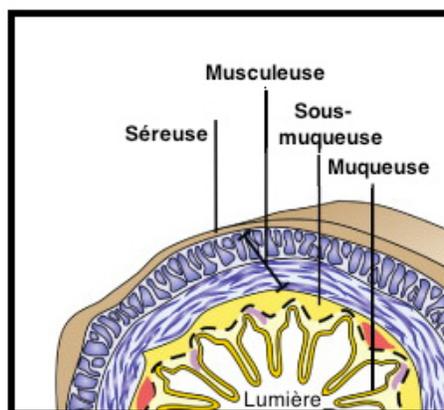


Figure 1. 2: Les tissus du tractus gastro-intestinal.

Modifiée avec permission [4].

Bien que les composés puissent avoir des sites d'absorption différents au niveau du TGI à cause de leurs propriétés physicochimiques (lipophile ou hydrophile), le site d'absorption par excellence reste l'intestin grêle qui fait aux alentours de 3 mètres de long et approximativement 2,5 cm de diamètre. En effet, dans l'intestin grêle, les molécules rencontrent une anatomie qui augmente leur absorption. La surface intérieure de la lumière intestinale est augmentée à peu près de 400 fois grâce à des caractéristiques morphologiques appelées villosités, et qui dépassent de 1 mm dans la lumière intestinale. Une couche de cellules épithéliales couvre ces villosités et forme une première barrière de perméabilité aux médicaments (Figure 1.3). Un composé doit traverser la membrane cellulaire avant d'atteindre les capillaires sanguins et ainsi la circulation systémique.

Une autre particularité morphologique qui augmente la surface : les microvillosités présentes dans les cellules épithéliales du côté de la lumière intestinale. Ces microvillosités se trouvent à une fréquence de 40 microvillosités par mm^2 , dépassent d'1 μm dans la lumière et augmentent la surface d'un facteur 10; elles sont appelées bordure en brosse [3, 5]. Ces cellules épithéliales forment une monocouche avec des jonctions serrées et comportent différents transporteurs qui constituent l'acteur principal dans la diffusion active de certains composés. Ces cellules possèdent des propriétés uniques dues à leur composition lipidique et protéique.

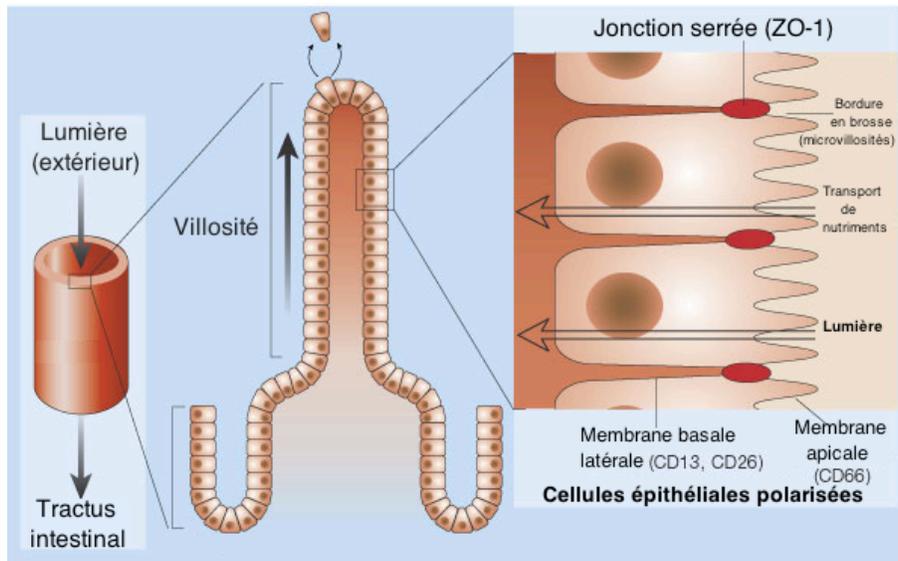


Figure 1. 3: Vue détaillée sur la structure des villosités présente dans la muqueuse intestinale humaine.

Adaptée avec permission [6]

Des protéines ancrées dans la bicouche ainsi que les carbohydrates attachés à la surface facilitent la communication et le transport via la membrane. Ces caractéristiques permettent à la membrane de se comporter comme un réel filtre. Les substances toxiques sont tenues en dehors des cellules alors que les nutriments, les métabolites et les déchets peuvent passer à travers la membrane des organelles et atteindre leur destination.

Les lipides présents dans les membranes peuvent être regroupés dans trois classes : phosphoglycérides, sphingolipides et cholestérol (Figure 1.4). Les différences au niveau de la composition lipidique correspondent à une fonction spécifique de la membrane. La membrane plasmique des cellules épithéliales de l'intestin (Figure 1.3) présente deux surfaces, l'une apicale du côté de la lumière intestinale et l'autre basolatérale qui interagit avec d'autres cellules épithéliales ou le milieu extracellulaire. Ces deux surfaces présentent deux compositions lipidiques différentes :

- Du côté basolatéral : le rapport entre sphingolipides, phosphoglycérides et cholestérol est de 0,5 :1,5 :1 (Rapport observé chez ces cellules non polarisées soumises à de très faibles perturbations).
- Du côté apical: le rapport entre sphingolipides, phosphoglycérides et cholestérol est de 1 :1 :1 (Rapport observées chez des cellules soumises à des perturbations élevées) [7].

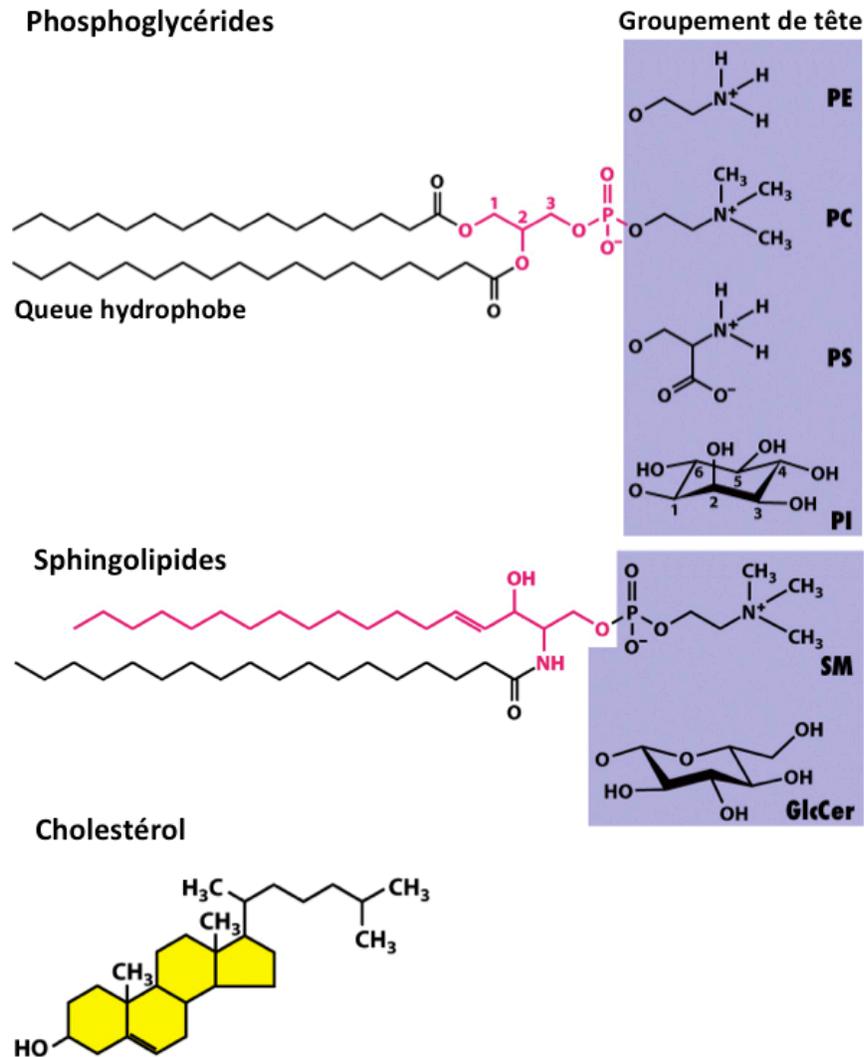


Figure 1. 4: Les trois classes de lipides membranaires.

Adaptée avec permission [7]

PE : Phosphatidyléthanolamine; PC : Phosphatidylcholine; PS : Phosphatidylsérine; PI : Phosphatidylinositol; SM : Sphingomyéline; GlcCer : Glucosylcéramide.

La présence abondante de sphingolipides dans les surfaces apicales des cellules épithéliales confère à la membrane une grande stabilité qui est due aux liaisons hydrogènes établies avec les groupements $-OH$ des sphingolipides (Figure 1.4). Le caractère fluide connu des membranes biologiques est dû quant à lui à la composition lipidique, à la structure des queues hydrophobes des phospholipides et à la température corporelle. En effet, les queues polaires d'acides gras des phospholipides s'agrègent suite à des interactions hydrophobes et de van der Waals. Plus les chaînes d'acides gras sont longues, plus elles auront tendance à s'agréger et à adopter un état gélifié alors que celles qui sont courtes présentent une surface moindre pour les interactions et forment des bicouches plus fluides. Également, lorsque les phospholipides présentent des chaînes insaturées, ils forment des interactions de van der Waals moins stables et créent donc des bicouches plus fluides [7].

1.3 Les membranes supportées

La nature complexe de cette monocouche a attiré l'intérêt d'un bon nombre de chercheurs qui ont essayé de reproduire ce modèle cellulaire *in vitro* afin de mieux comprendre les processus biologiques. Certains autres chercheurs se sont intéressés à la bicouche lipidique présente au niveau des membranes biologiques et ont centré leurs efforts au développement de systèmes artificiels appelés « membranes supportées ».

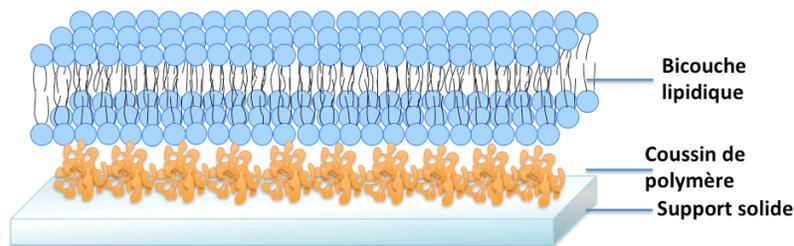


Figure 1. 5: Exemple de modèle de membrane supportée.

Adaptée avec permission [8].

Les systèmes de membranes supportées sont des modèles artificiels *in vitro* qui essaient de reproduire la structure des membranes naturelles afin de mieux comprendre les processus qui y règnent. Les membranes biologiques sont composées principalement d'une bicouche lipidique en phase fluide. Étant donné que les membranes biologiques sont assez complexes à étudier à cause de leurs compositions et leurs structures, mais aussi à cause de leurs interactions avec les milieux intra- et extracellulaire, les modèles de membranes artificielles ont été très utiles afin de déterminer les caractéristiques physiques et chimiques et à comprendre comment ces dernières contribuent au fonctionnement de la membrane. Depuis plus de vingt ans, les bicouches lipidiques déposées sur un support solide ont été exploitées comme modèle expérimental de surface cellulaire et ont contribué à la compréhension des réactions immunitaires, d'adhésion cellulaire, d'interaction cellules-substrats et au développement de biocapteurs comme les biocapteurs optiques développés pour une meilleure compréhension des interactions ligands- récepteurs. Ces biocapteurs sont couplés à des technologies comme la résonance de plasmons de surface (SPR) afin de convertir le signal en réponse traitable [9-11]. Ces modèles sont rapidement mis en place en déposant une monocouche ou une bicouche lipidique sur un support solide tel que le mica, les électrodes d'or ou la silice pour former de larges surfaces stables mécaniquement [12]. Malgré le grand intérêt que ces membranes ont connu, seul un travail rapporté en littérature les utilise pour l'évaluation de la perméabilité membranaire de médicaments [13].

1.4 Système de classification biopharmaceutique (SCB)

La solubilité dans les fluides intestinaux et la perméabilité au travers de la membrane intestinale sont deux caractéristiques critiques de l'absorption intestinale. Elles représentent également les deux composantes majeures du système de classification biopharmaceutique et limitent l'absorption des composés des classes II, III et IV (Figure 1.6). Ce système de classification qui a été introduit en 1995 constitue non seulement un outil utile pour les études *in vivo* de bioéquivalence, mais joue aussi un rôle important lors de la prise de décision au cours des premières phases de découverte de médicaments [14-16].

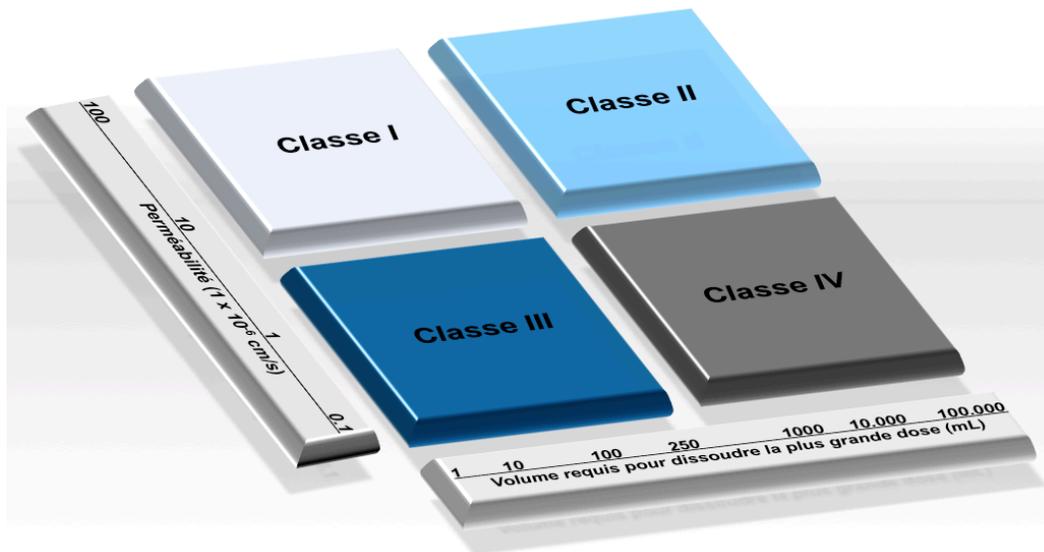


Figure 1. 6: Système de classification biopharmaceutique (SCB).

Ce système est basé sur une structure scientifique qui décrit les trois étapes limitantes de l'absorption orale. Ces trois étapes nécessaires pour qu'une molécule soit absorbée sont :

- La libération du principe actif de la formulation pharmaceutique;
- Le maintien de l'état dissous du principe actif tout au long de son passage dans le tractus gastro-intestinal;
- La perméabilité du principe actif à travers la membrane gastro-intestinale vers la circulation systémique.

Il existe une quatrième étape qui influence la biodisponibilité ainsi que la libération des métabolites dans la circulation systémique qui est le mécanisme entéro-hépatique. L'évaluation de ces quatre étapes de l'absorption orale devient alors critique lors de la découverte de médicaments efficaces administrés par voie orale étant donné que plus de 40% des composés échouent lors de cette phase de découverte à cause de leurs mauvaises propriétés pharmacocinétiques. De ce fait, la majorité des compagnies pharmaceutiques ont intégré la détermination de la solubilité, de la perméabilité et de la stabilité métabolique dans leurs processus de criblage lors des premières phases afin d'éviter des pertes financières colossales évaluées à des millions de dollars engendrées par l'échec de composés testés en clinique [14, 17, 18].

Plusieurs tests *in vitro* et *in silico* ont donc été mis en place afin d'évaluer les propriétés physicochimiques de nouvelles entités chimiques. Une des propriétés est la lipophilicité. Elle peut être calculée à l'aide du coefficient de partage octanol-eau, mesurée par la partition liposome-eau ou par la chromatographie par membrane artificielle immobilisée (IAM). Une des autres propriétés d'intérêt est le potentiel de liaison hydrogène mesuré par le $\Delta\text{Log P}$ (voir section 1.5.1.1) ou encore l'aire de la surface de la molécule polaire (*molecular polar surface area* (PSA)) [19].

1.5 Tests prédictifs de la biodisponibilité

Une grande gamme de techniques *in vivo* et *ex vivo* existent comme modèles de prédiction de l'absorption intestinale, tel que résumé dans le Tableau 1.1 Le choix de la technique de prédiction dépendra de l'objectif final de l'étude.

Tableau 1. 1: Tableau récapitulatif des modèles de prédiction de l'absorption de médicaments.

Type de modèles	Modèle	Description
Physicochimique	Coefficient de partage	Mesure la lipophilicité des médicaments, généralement entre octanol/ eau, calculée avec la méthode par agitation de flacon.
	Membranes artificielles immobilisées (IAM)	Mesure le coefficient de partition dans une phase lipidique en utilisant une colonne HPLC.
<i>In silico</i>	clog P	Application commerciale calculant le coefficient de partition octanol/eau, communément appelée méthode de Leo-Hansch.
	<i>mlog P</i>	Méthode de calcul du <i>log P</i> , appelée méthode de Moroguchi.
<i>ex vivo</i>	Tissus isolés	Mesure le transport à travers des tissus d'intestin.
	Anneau intestinal éversé	Étudie la cinétique d'absorption dans la muqueuse intestinale.
Études <i>in situ</i>	Perfusion <i>in situ</i>	Mesure la disparition des médicaments 'une anse fermée ou ouverte d'un segment d'intestin d'animaux anesthésiés.
Études <i>in vivo</i>	Anse intestinale	Mesure la disparition des médicaments à partir d'un perfusât d'une anse d'intestin d'un animal éveillé.
Tests cellulaires	Caco-2	Mesure le transport à travers une monocouche de cellules cancéreuses de colon humain.
	HT-29	Mesure le transport à travers une monocouche de cellules polarisées productrice de mucine.
	MDCK	Mesure le transport à travers une monocouche de cellules de rein de chien.
<i>in vitro:</i> PAMPA	PAMPA lécithine d'œuf	PAMPA qui utilise un filtre imbibé dans une solution de lécithine d'œuf dissous dans du n-dodecane.
	PAMPA-DOPC	PAMPA qui utilise de la DOPC dissoute dans du n-dodecane.
	HDM-PAMPA	PAMPA qui utilise des filtres imbibés de n-hexadecane seulement.
	BM-PAMPA	PAMPA qui utilise un mélange de phospholipides dissous dans du 1,7-octadiène.
	DS-PAMPA	PAMPA qui utilise un gradient de pH (condition double sink).

1.5.1 Tests physicochimiques

1.5.1.1 Coefficient de partage par la méthode par agitation de flacon

L'une des premières propriétés qui doivent être prédites ou mesurées pour une molécule est son coefficient de partage entre une phase aqueuse et huileuse (log P). Ceci donne une mesure de la lipophilicité de la molécule et aide à prédire son comportement à travers une membrane biologique. Le solvant utilisé pour la phase huileuse est souvent l'octanol puisqu'il possède des propriétés similaires à celle de la membrane biologique. Ce coefficient de partage est mesuré à l'aide d'une méthode par agitation de flacon. Avant le début de l'expérience, la phase aqueuse doit être saturée avec la phase huileuse et vice versa. L'expérience doit être réalisée à une température variant entre 20° et 25°C et maintenue constante à ±1°C. Le composé doit être rajouté aux deux phases. Le dispositif est agité puis laissé au repos (généralement pendant 24h) afin d'observer la séparation de phase. La concentration dans chaque phase est calculée et le coefficient de partage est déterminé selon l'équation suivante :

$$P_{oe} = \frac{C_{n\text{-octanol}}}{C_{eau}} \quad (1.1)$$

Avec :

P_{oe} : Coefficient de partage octanol-eau;

$C_{n\text{-octanol}}$: Concentration de la substance à l'équilibre dans du n-octanol;

C_{eau} : Concentration de la substance à l'équilibre dans l'eau.

Comme le coefficient est le rapport de deux concentrations, c'est un nombre sans dimension. Plus souvent, il est présenté sous la forme de son logarithme décimal (log P) [15].

Un autre coefficient de partage, plus pertinent, qui prend compte du degré d'ionisation des composés est le coefficient de distribution, exprimé également sous forme logarithmique (log D). Ce coefficient varie en fonction du pH et s'exprime comme suit :

Pour les acides :

$$D = \log P - (1 + \text{antilog}(\text{pH} - \text{p}k_a)) \quad (1.2)$$

Pour les bases :

$$D = \log P - (1 + \text{antilog}(pk_a - pH)) \quad (1.3)$$

Avec :

Log P : Coefficient de partage du composé;

pH : pH de la solution.

pk_a : pk_a de la molécule.

1.5.1.2 Membranes artificielles immobilisées (IAM)

Il s'agit d'une méthode largement utilisée pour l'évaluation du transport passif des molécules à travers la membrane ainsi que pour la purification et la reconstitution des protéines membranaires. La membrane artificielle immobilisée est une membrane en phase solide préparée en réalisant des liaisons covalentes entre un substrat en silice et des lipides en monocouche confluite.

Cette méthode a été introduite par Pidgeon et coll. [20] qui ont initialement lié de la lécithine sur un support chromatographique. Ils ont par la suite greffé chimiquement des phospholipides sur une phase stationnaire en aminopropyl silice en utilisant une chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Plusieurs autres phases stationnaires IAM ont été développées et les plus connues sont présentées dans la Figure 1.7. Ces phases contiennent une tête phosphatidylcholine (PC), des liaisons ester ou éther entre les deux chaînes acyl et le squelette glycérol de la molécule de PC. D'autres colonnes utilisées lors de la phase de découverte sont appelées DD pour « *Drug Discovery* » sont courtes (5 cm) et ont été conçues pour une détermination rapide du temps de rétention (t_r) de composés qui sont présents dans la phase stationnaire IAM [21]. Ce temps de rétention permet la détermination du coefficient de partage (k'_{IAM}) selon l'équation suivante :

$$k'_{IAM} = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1.4)$$

Avec :

- t_r : Temps de rétention en minutes du composé à tester;
- t_0 : Temps d'élution pour les composés non retenus.

Ce coefficient est utilisé en analogie au coefficient de partage membranaire (K_m) qui représente la distribution entre la phase aqueuse et la membrane permettant de caractériser les interactions entre les biomolécules et la membrane biologique. Ce dernier était déterminé grâce aux coefficients de partage eau-octanol ou encore avec des systèmes chromatographiques de partage. Étant donné que les colonnes IAM possèdent des surfaces recouvertes de monocouches de phospholipides immobilisés et qu'elles ont le même caractère fluide que les membranes biologiques, elles sont devenues un très bon outil de prédiction de la perméabilité intestinale [20].

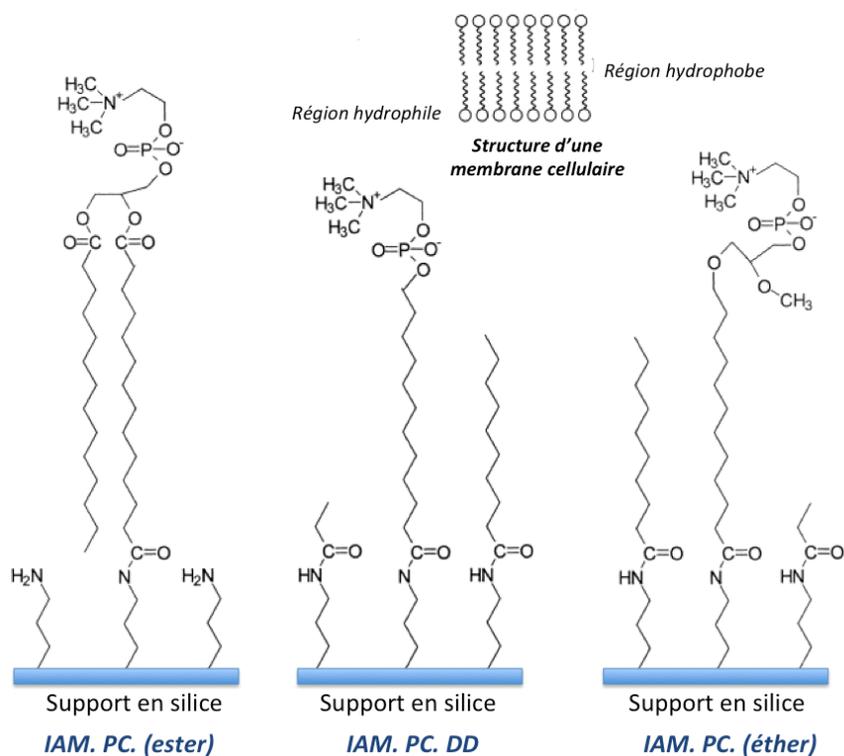


Figure 1. 7: Structure des phases stationnaires développées par Pidgeon et coll.

Modifiée avec permission [22]

1.5.2 Tests *in silico*

D'autres méthodes qui permettraient de déterminer le log P sans passer par une étape d'expérimentation sont les tests *in silico*. Un grand nombre de logiciels tels que ACD/logP, Osiris P, S+log P, MolLog P [23] sont disponibles et offrent une bonne corrélation entre les

valeurs calculées et mesurées. Le log P peut être calculé en fragmentant la molécule et en estimant l'apport de chaque fragment à la lipophilicité totale de la molécule (appelé cLog P), ou encore en se basant sur la méthode de Moriguchi qui utilise 13 paramètres pour les atomes hydrophiles et hydrophobes, l'effet de proximité, les liaisons insaturées et intramoléculaires, les propriétés amphotères et plusieurs fonctions spécifiques pour obtenir le coefficient de partition (appelé souvent *mlog P*) [15].

1.5.3 Tests *ex vivo*

Parmi les modèles *ex vivo* les plus populaires et les plus utilisés, on retrouve:

1.5.3.1 Tissus intestinaux isolés

Ce sont des tissus isolés de la muqueuse intestinale, coupés en bande après avoir enlevé la musculature et attachés dans une chambre de diffusion ou une chambre Ussing remplie avec le tampon adéquat. La résistance transépithéliale est mesurée afin de vérifier l'intégrité du tissu. Le système est maintenu à 37°C et sous agitation pour pouvoir contrôler l'épaisseur de la couche d'eau stationnaire et apporter l'oxygène nécessaire au tissu. Le médicament est introduit dans le compartiment donneur et la quantité accumulée est mesurée du côté receveur en fonction du temps. La perméabilité à travers le tissu est alors calculée. Cette méthode est particulièrement intéressante dans le sens où elle peut mettre en jeu différents types de tissus et évaluer la perméabilité des médicaments à travers différentes régions de l'intestin. Le plus souvent, le tissu d'intestin de rat est utilisé pour avoir une idée sur la perméabilité avant de passer aux essais chez l'humain. Des tissus humains ainsi que des monocouches cellulaires ont été utilisées avec ce système [15, 24].

1.5.3.2 Anneau intestinal éversé

Les anneaux intestinaux éversés utilisent des segments complets d'intestin au lieu de tissus. La musculature est alors intacte. Le segment est excisé à partir d'intestins de rats, noué d'un bord, et soigneusement éversé de l'autre en le plaçant sur une tige en verre. Ce segment est coupé en anneaux et ces derniers sont incubés dans un tampon oxygéné contenant le médicament, sous agitation et à 37°C. Après un temps défini, il est possible de calculer la quantité de médicament absorbée par gramme de tissu mouillé ($\text{mol g}^{-1} \text{ temps}^{-1}$) après avoir rincé l'anneau

avec du tampon glacé et séché minutieusement. L'avantage de ce test est qu'il est relativement simple et rapide à mettre en place. Un grand nombre d'anneaux peut être généré à partir d'un segment d'intestin, ce qui permet à chaque animal d'être son propre contrôle. L'inconvénient de ce test est qu'il s'agit d'un test biologique. Il faut alors s'assurer de la viabilité du tissu au cours de l'expérience. De plus, suite à l'absorption du médicament, le tissu doit être digéré et le médicament extrait, ce qui complique l'expérimentation [15].

1.5.4 Tests *in situ* : La perfusion *in situ*

Cette méthode a été introduite à la fin des années 1960. Elle met en place des segments d'intestins d'animaux anesthésiés, perfusés par une solution contenant le médicament grâce à une canule dans le but de déterminer la quantité de médicament qui passe à travers les intestins. Parmi les modèles précliniques, il s'agit de la méthode *in situ* la plus proche de la situation *in vivo* puisque les barrières que le composé doit traverser pour atteindre la circulation systémique sont les mêmes que dans le système *in vivo*.

La procédure expérimentale pour un passage unique *in situ* a été décrite par Fagerholm [25]. Les rats sont laissés à jeun pendant au moins 12 h, puis un segment intestinal d'environ 10 à 20 cm est isolé à l'aide d'une canule (Figure 1.8). Ce segment est rincé avec une solution isotonique avant d'être perfusé en continu avec une solution contenant le médicament d'intérêt. Le perfusât est prélevé à des intervalles donnés. Afin de vérifier la viabilité du tissu au cours de l'expérience, une récupération totale du PEG-4000 (composé non absorbé) ainsi qu'un flux d'eau stable doivent être observés.

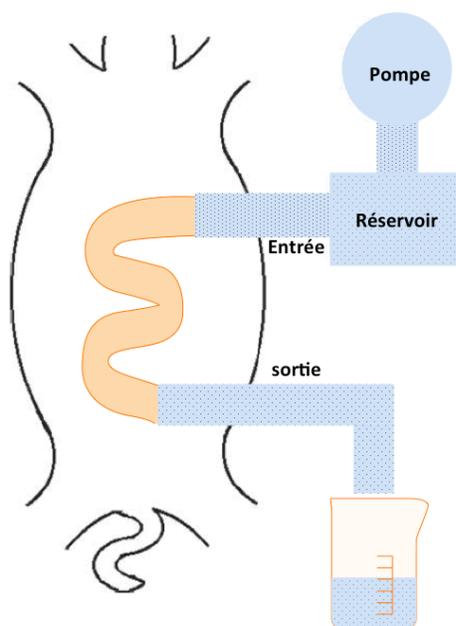


Figure 1. 8: Étude *in situ* de l'absorption d'un médicament avec la méthode de perfusion *in situ*.

Adapté avec permission [26]

La corrélation entre les données d'absorption humaine et des données de perfusion chez le rat a été démontrée pour une série de composés de biodisponibilités différentes chez les humains (5 à 100%). La facilité de réalisation de ce test ainsi que la fiabilité de ses résultats fait qu'il est très utilisé pour la sélection de nouveaux candidats médicamenteux, mais aussi pour la confirmation des données de perméabilité générée à partir d'expériences *in vitro*. Il est également considéré comme un outil utile pour classer les composés selon le système SCB [26].

1.5.5 Tests *in vivo* : Anse intestinale (perfusion intestinale chez l'homme)

La technique de perfusion intestinale a été utilisée chez l'homme au départ dans le but d'étudier les mécanismes d'absorption et de sécrétion ou encore le rôle de la vidange gastrique dans l'absorption des médicaments. Le principe de base de cette technique est de faire infuser une solution du composé d'intérêt et un marqueur non absorbé tel que le PEG-4000 dans un

segment intestinal et de prélever les échantillons de perfusât suite à leur passage à travers le segment. La quantité absorbée est déduite à travers la différence entre les concentrations initiales et finales.

Plusieurs approches de perfusion ont été adoptées dans les intestins grêles: perfusion à système ouvert, perfusion à système semi-ouvert et perfusion à système fermé. Lennernäs et coll. ont développé un instrument de perfusion qui consiste en un tube à canaux multiples avec deux ballons gonflables, créant un segment de 10 cm et qui permet la perfusion intestinale segmentaire. Ce système à six canaux comprend quatre larges canaux situés au centre dont deux sont pour l'infusion et deux pour l'aspiration du perfusât. Les deux restants sont périphériques et utilisés pour l'administration du marqueur ou pour le drainage (Figure 1.9).

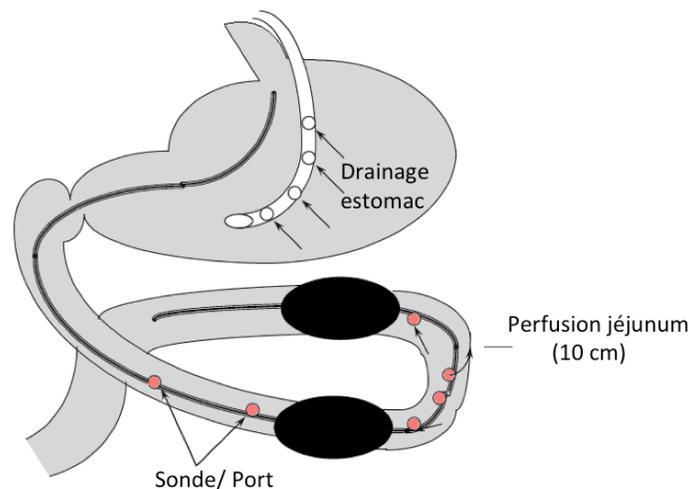


Figure 1. 9: Segment perfusé chez l'homme créé avec le tube multi-canaux et les deux ballons gonflables.

Adaptée avec permission [26]

Le tube est introduit oralement après anesthésie. Une fois le tube en place, les ballons sont gonflés et le segment intestinal est créé. Le segment est rincé et ensuite perfusé. Le débit d'absorption est calculé à partir du taux de disparition du composé du segment perfusé.

1.5.6 Tests cellulaires

1.5.6.1 *Caco-2*

Dans les années 1990, Hidalgo et coll. [27] ont introduit une technique biologique permettant de mesurer l'absorption intestinale des molécules actives. Cette technique utilise des cellules appelées Caco-2, et qui sont une lignée de cellules provenant d'un adénocarcinome du colon humain [15, 28]. Les cellules en culture se différencient pour former une monocouche d'entérocytes polarisés. Ces entérocytes ressemblent à ceux présents dans le petit intestin puisqu'elles présentent des microvillosités ainsi que plusieurs protéines de transport, à savoir les systèmes de transport de sucres, d'acides aminés, de peptides ainsi que les transporteurs d'efflux des glycoprotéines P.

Il existe plusieurs variations lors de la culture des cellules Caco-2 en monocouche et de la réalisation du test. En général, les cellules sont cultivées sur un support poreux, habituellement pendant une période de 15 à 21 jours dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco additionné de 20% de sérum de veau fœtal, 1% d'acides aminés non essentiels et 2 mM de L-glutamine. Les cellules sont cultivées dans une étuve à 37°C en présence de 10% de dioxyde de carbone et d'une humidité relative de 95%. Le milieu de culture est changé au deux jours. L'étude de transport est réalisée lorsque les cellules sont à confluence en modifiant le milieu de culture par une solution saline balancée de Hanks ajustée à un pH de 6,5 du côté apical et de 7,4 du côté basolatéral. (Figure 1.10 ci-dessous [29])

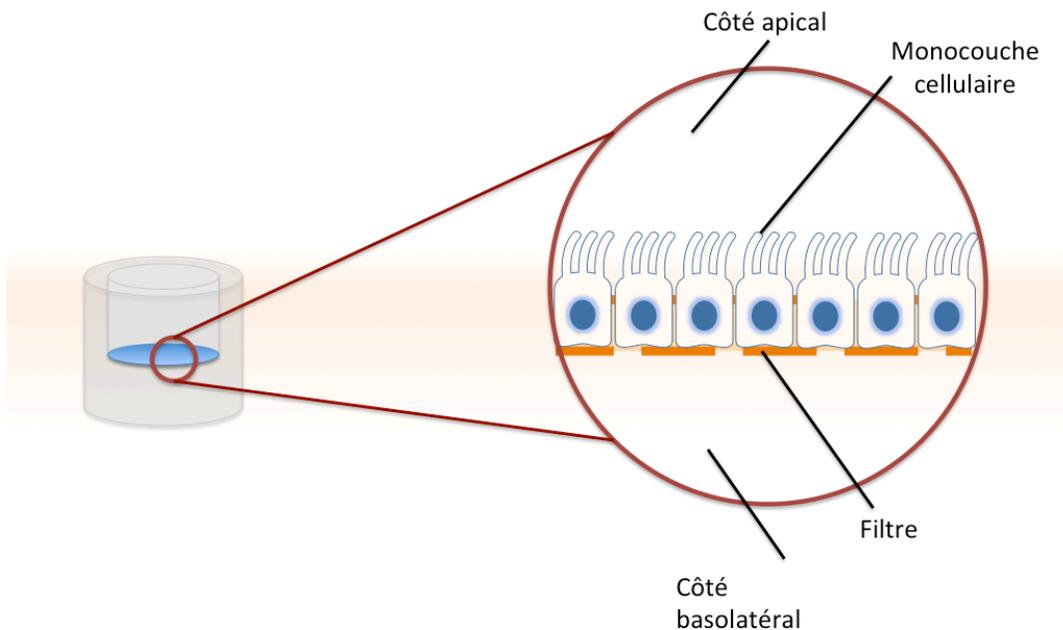


Figure 1. 10: Diagramme d'une monocouche de cellules Caco-2 cultivées sur un filtre perméable.

Après une courte incubation de 30 min où les cellules sont maintenues sous agitation, les tampons sont remplacés avec de nouvelles solutions et les solutions diluées contenant les composés d'intérêt sont introduites du côté apical (ou basolatéral). À des intervalles donnés, des échantillons sont prélevés du côté basolatéral (ou apical) afin de déterminer la quantité de médicaments ayant diffusé. Ces échantillons sont généralement analysés à l'aide d'un processus automatisé approprié au type d'échantillons à analyser :

- Un compteur à scintillation pour les composés radioactifs;
- Une analyse chromatographique HPLC avec une détection UV ou à fluorescence, couplée ou non à un spectromètre de masse;
- Une analyse par spectrophotométrie UV ou à fluorescence [29].

Le coefficient de perméabilité apparente (P_{app}) peut alors être calculé comme suit :

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \left(\frac{1}{C_0 * A} \right) \quad (1.5)$$

où :

- P_{app} est le coefficient de perméabilité apparente (en cm/s);
- $\frac{dQ}{dt}$ est le débit de transport des médicaments (en $\mu\text{g/s}$);
- C_0 est la concentration initiale dans le compartiment donneur (mg/mL);
- A est l'aire de la monocouche (en cm^2).

Il existe différents moyens de vérifier si la monocouche a maintenu son intégrité tout au long du processus de transport. Par exemple, un marqueur d'absorption paracellulaire comme le mannitol peut être utilisé. Il est souvent radiomarqué pour faciliter l'essai, et est rajouté du côté apical. Si moins de 2% traverse la barrière, alors l'intégrité de la membrane est maintenue. Un autre moyen de vérifier l'intégrité est la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) avant et après le test.

Afin d'utiliser le test cellulaire Caco-2 comme un modèle d'absorption, des courbes de calibration de molécules dont l'absorption chez les humains est connue doivent être générées. Ce test est basé sur la diffusion de médicament à travers un système biologique. Des changements au niveau de la méthode de culture, du passage dont elles sont issues ou de leur phénotype peuvent affecter considérablement le coefficient de perméabilité apparente. C'est pour cette raison qu'il est primordial de standardiser la procédure de ce test au sein du laboratoire pour garantir sa reproductibilité et sa fiabilité [15, 29].

Le test Caco-2 peut également être utilisé pour élucider le mécanisme de perméabilité. Si le coefficient de perméabilité apparente augmente linéairement en augmentant la concentration du composé, et ceci indépendamment du sens de la diffusion (du côté apical vers le côté basolatéral ou inversement), il est possible de conclure que le transport est passif et non actif. Si le transport du côté basolatéral vers le côté apical est supérieur au transport du côté apical vers le côté basolatéral, le composé est sujet à des transporteurs d'efflux comme les

glycoprotéines P (P-gp). Le test cellulaire Caco-2 a significativement contribué à la compréhension des mécanismes d'absorption d'une large gamme de médicaments.

Quelques autres avantages que présente ce test est qu'il s'agit d'un modèle non animal, ne nécessite pas de grandes quantités de composés lors du transport et peut évaluer la toxicité de certaines nouvelles entités chimiques. Il présente toutefois des inconvénients. Pour les composés qui diffusent par voie passive, ce test constitue une méthode valide pour l'évaluation de la perméabilité chez les humains. Pour les composés qui diffusent par voie paracellulaire ou par voie active via des transporteurs ou encore pour les composés très insolubles, ce test a tendance à sous-estimer la perméabilité pour les trois raisons suivantes :

- Une surexpression des glycoprotéines P (Pgp);
- Une réduction du transport par voie paracellulaire à cause de l'absence de pores liquides;
- Les liaisons non spécifiques des composés insolubles sur le support en plastique ou sur le filtre, ce qui réduit la perméabilité apparente (P_{app}) et induit de faux positifs.

Il s'agit également d'un test laborieux, nécessitant une certaine expertise en culture cellulaire, et les monocouches de Caco-2 formées sont apparentées à la perméabilité paracellulaire du colon plutôt qu'à celle des intestins grêles [14, 15].

1.5.6.2 HT-29

Il s'agit d'une autre lignée cellulaire originaire des cellules cancéreuses du colon humain. L'évolution de cette lignée en monocouche est très dépendante des conditions expérimentales avec lesquelles elles sont cultivées. Dans des conditions expérimentales standards et en présence de glucose, elles peuvent former des multicouches de cellules non différenciées, n'ayant pas de jonctions serrées ni polarisation. Lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu de culture exempt de glucose ou contenant un inducteur de différenciation, elles croissent en monocouche de cellules absorptives sécrétant du mucus - cellules présentes dans l'épithélium intestinal et mieux représentées dans ce test que dans le test Caco-2. La perméabilité des composés qui sont transportés par voie paracellulaire est plus grande via la monocouche de HT29-18-C1 de résistance de $100 \Omega \text{ cm}^2$ qu'à travers une monocouche de Caco-2 de résistance de $300 \Omega \text{ cm}^2$ (comme pour l'aténolol) [30].

1.5.6.3 MDCK

La lignée cellulaire MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*), originaire du rein de chien, a gagné en popularité et est devenue fréquemment utilisée par les compagnies pharmaceutiques pour l'évaluation du transport des médicaments. Son avantage majeur est que la monocouche cellulaire est différenciée au bout de 3-7 jours contrairement à celle des Caco-2. Il existe deux sous-clones avec des valeurs de résistance transépithéliale (TER) distinctes : la première souche avec des hautes résistances ($\approx 4000 \Omega \text{ cm}^2$) et une deuxième caractérisée par une faible résistance ($\approx 200\text{-}300 \Omega \text{ cm}^2$).

Le test MDCK est considéré comme un outil suffisant pour prédire la diffusion passive. Irvine et coll. [31] ont pu rapporter des corrélations entre les fractions orales absorbées déterminées avec ce test et le test Caco-2 et ceci en se basant sur 55 composés. Toutefois, cet essai présente les mêmes inconvénients que le test Caco-2 dans la mesure où il génère autant de faux-positifs lorsqu'il s'agit de composés à faible perméabilité. L'expression des transporteurs comme le P-gp dans le rein de chien est très différente de celle existante dans les intestins humains, alors ce test ne peut donc pas être utilisé pour le criblage de composés qui sont sujets à des transporteurs. Ce test reste tout de même accepté par l'agence Américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration, FDA*) pour le système de classification biopharmaceutique [14, 30].

1.5.7 Tests *In vitro*

Plus récemment, vers les années 2000, le test PAMPA (acronyme de *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) a fait ses débuts comme test de criblage primaire de perméabilité. Le test original, introduit par Kansy et coll. [32] de la compagnie Roche consiste à créer une membrane artificielle à partir de composés présents dans la membrane biologique et ceci en imbibant un filtre hautement poreux avec une solution lipidique de 10% lécithine de jaune d'œuf dans du n-dodécane. Cette membrane sépare la solution contenant les composés à tester de la solution tampon exempte de ces derniers, et permet l'étude cinétique de la diffusion passive des molécules à tester (Figure 1.11). Le transport actif n'est donc pas tenu en compte avec ce modèle.

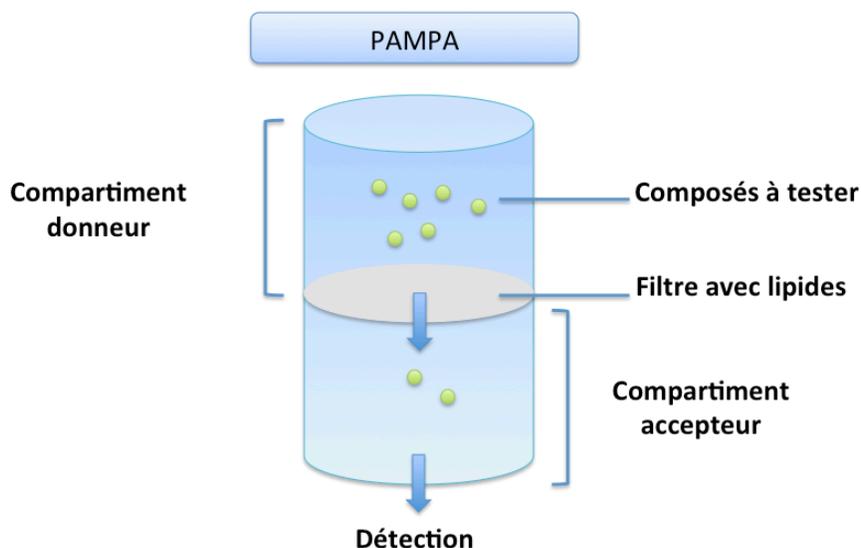


Figure 1. 11: Schéma de principe du test PAMPA.

Deux ans après la publication de Kansy et coll. plusieurs compagnies ont développé leurs propres versions du test. Ces tests se différenciaient par la nature du filtre utilisé, la composition de la membrane, le pH dans les compartiments donneur et accepteur, la présence de conditions d'extrême dilution dans le compartiment accepteur et le temps d'incubation. Ils ont fait l'objet de plusieurs études et discussions démontrant le potentiel prometteur de cette nouvelle technologies [17, 28, 33-36]. Une centaine de publications est également apparue depuis le modèle Roche [17]. Également, un instrument commercial de la compagnie « pION » a été lancé durant cette période.

Plusieurs versions du test ont été développées [28, 36]. Parmi eux, on peut citer :

1.5.7.1 PAMPA lécithine d'œuf (Modèle Roche)

Il s'agit de la première version du test. Elle a été inspirée par les travaux de Kansy et coll. [32] et représente la version la plus simple du test. Elle consiste en effet à imbiber le filtre poreux dans une solution de lécithine d'œuf dissout dans du n-dodecane. Le choix de la lécithine d'œuf est inspiré du fait que les phosphatidylcholines sont prédominantes dans les membranes

cellulaires des mammifères. Très souvent, du cholestérol est additionné à la lécithine d'œuf afin de mimer la membrane cellulaire des mammifères.

La version commerciale de ce test est en « sandwich » et est constituée d'un ensemble de deux plaques 96 puits spécialement conçues de façon à ce que chacun contienne deux chambres : un compartiment donneur en bas et un compartiment accepteur en haut, séparées par un filtre d'une épaisseur de 125 μm et de 0,3 cm^2 de surface (0,45 diamètre de pores, 70% porosité) imbibé de solution lipidique dissoute dans du n-dodecane. Ce test a permis d'établir une corrélation hyperbolique entre les flux mesurés et les valeurs d'absorption humaine tout comme celle existante pour le test Caco-2 [32, 36]. Ce modèle a été sujet à une modification au niveau du type de filtre. En effet, Zhu et coll. ont remplacé le filtre de polyfluorure de vinylidène (PVDF) hydrophobe utilisé par Kansy par un filtre de PVDF hydrophile ayant de faibles interactions avec les protéines. Ils ont permis grâce à ce test de réduire la durée de l'expérience de 15 heures à 2 heures [17, 36].

1.5.7.2 Le modèle pION ou le PAMPA-DOPC

C'est une extension du modèle de Roche qui a été rapportée par Avdeef et al. [37] et qui présente plusieurs caractéristiques supplémentaires comme la détermination de la rétention de la membrane ou l'évaluation de l'effet du pH ou d'un gradient de pH. Ce test utilise un phospholipide synthétique, la dioléoylphosphatidylcholine (DOPC) qui est un phospholipide complètement zwitterionique et présentant une faible rétention pour une grande gamme de composés à l'exception de certains comme la chlorpromazine, la primaquine et la progestérone. Il a une transition de phase gel-fluide bien caractérisée étant donné qu'il constitue un modèle standard de bicouche de lipides insaturés. Parmi les autres avantages que présente ce phospholipide est que sa température de transition est très basse ($T_m = -16,5^\circ\text{C}$), ce qui permet une manipulation aisée à température ambiante [36, 38].

Ce test utilise les plaques pION avec un mélange de 2% (w/v) DOPC dissoute dans du n-dodecane [37]. Plusieurs tests qui ont été développés par la suite utilisent ce dispositif pION mais avec différents mélanges lipidiques.

1.5.7.3 Le modèle n-hexadecane : HDM-PAMPA (Modèle Novartis)

Faller et Wohnsland [39] ont développé un test exempt de phospholipides utilisant seulement un filtre en polycarbonate de 10 µm d'épaisseur (20% porosité) imbibé dans l'hexadecane. Ils ont démontré que l'utilisation d'un solvant inerte tel que le n-hexadecane pouvait améliorer les résultats des tests de perméabilité des composés simples. Ce test a également permis la prédiction du coefficient de partage alcane/eau, souvent très difficile à mesurer de façon directe à cause de la faible solubilité des molécules dans l'alcane. [33, 36, 39]

1.5.7.4 PAMPA biomimétique: BM-PAMPA

Sugano et coll. [40] ont essayé de reproduire les conditions que présente la bordure en brosse, caractéristique des intestins humains, en dissolvant dans du 1,7-octadiène un mélange de phospholipides qui ressemble fortement à celui présent dans les membranes biologiques. Ce mélange est généralement constitué de cholestérol (33% w/w), 27% PC, 27% PE, 7% PS, 7% PI. Une telle composition permet une plus grande rétention au niveau de la membrane lorsque des composés lipophiles sont évalués. Le pH dans le compartiment donneur et dans le compartiment accepteur est ajusté dans l'intervalle 5 et 7,4. Ce test a contribué à une amélioration significative de la prédiction de l'absorption intestinale [36].

1.5.7.5 Double-Sink : DS-PAMPA

Cette méthode a été mise au point par Avdeef [41] dans le but de mimer les conditions présentes dans le tractus gastrointestinal. Ce modèle utilise, tout comme le PAMPA décrit par Kansy, un mélange lipidique à base de lécithine. Par contre il a substitué les conditions traditionnelles par un système de deux gradients « double-sink ». En effet, le PAMPA traditionnel utilisait un même pH dans les deux compartiments, alors que ce dernier utilise deux pH différents. Au niveau du tractus gastrointestinal, le médicament est exposé à différentes valeurs de pH alors que le sang est maintenu à un pH de 7,4. De ce fait, le PAMPA-DS utilise un pH entre 5,0 et 7,4 dans le compartiment donneur, dépendamment du composé à tester, et maintient un pH 7,4 dans le compartiment accepteur. Ce gradient de pH

permet la perméabilité des acides faibles en permettant aux molécules à faible pK_a de passer à travers la membrane grâce au faible pH dans le compartiment donneur, et de rester piégées dans le compartiment accepteur sous leurs formes chargées, créant ainsi des conditions d'extrême dilution virtuelle (sink). Ce gradient de pH constitue la première condition « sink » dans cette méthode « double sink » [36]. La deuxième condition « sink » profite de la présence de surfactants présents dans le compartiment accepteur afin de rendre unidirectionnelle la perméabilité des composés lipophiles à travers la membrane [36].

1.5.8 Comparaisons des différents tests prédictifs de la biodisponibilité

Plusieurs types de tests prédictifs décrits ci haut ont été mis en place pour évaluer la perméabilité intestinale des médicaments. Cependant, des tests comme la perfusion *in situ* ou l'anse intestinale qui ont recours à l'utilisation et au sacrifice d'animaux vivants s'avèrent assez laborieux et dispendieux, mais surtout non adaptés à un criblage à haut débit, qui représente l'un des objectifs principaux de la majorité des compagnies pharmaceutiques lors de la phase préclinique du développement du médicament.

De ce fait, des tests cellulaires comme le test Caco-2 - le test le plus représentatif de la perméabilité intestinale humaine - et le test *in vitro* PAMPA - essai artificiel évaluant la diffusion passive des médicaments et pouvant répondre au besoin du criblage à haut débit - se sont démarqués et ont gagné de l'intérêt au sein des industries pharmaceutiques.

Le test PAMPA et le test cellulaire Caco-2 ont longtemps été sujets à des comparaisons en termes de fiabilité et de représentativité des données générées. La majorité des compagnies pharmaceutiques qui utilisaient les tests cellulaires étaient sceptiques et s'attendaient à ce que le test PAMPA génère des résultats comparables aux tests cellulaires. Mais une telle comparaison s'avère au départ illusoire pour les trois différences critiques suivantes :

- Le pH du test;
- La couche d'eau stationnaire;
- Le bilan massique incomplet traduit par la fraction molaire manquante dans la phase aqueuse lors de l'addition des fractions molaires dans le compartiment donneur et accepteur à la fin du test [28, 42].

Ces trois différences peuvent être traitées dans les laboratoires de façons différentes. Une des manières de comparer ces deux tests serait de se baser sur leurs caractéristiques relatives, ce qui révélerait leurs avantages et inconvénients présentés dans le Tableau 1.2 [5]

Tableau 1. 2: Tableau comparatif entre le test artificiel PAMPA et le test cellulaire Caco-2.

<i>Comparaison</i>	<i>PAMPA</i>	<i>Caco-2</i>
Barrière	Phospholipides dans un solvant	Monocouche cellulaire
pH	4-8	5,5-7,4
Mécanismes	Passif	Passif, actif, métabolisme
Débit	500/semaine	30/semaine
Coût	<\$1/ échantillon	≈\$30/échantillon
Main d'œuvre	0,35 ETC ¹	2 ETC ¹

ETC¹ : Équivalent temps complet.

Ce que l'on remarque à travers cette brève comparaison est que chacune de ces techniques se différencie de l'autre par un avantage concurrentiel. En effet, le PAMPA peut explorer une plus grande gamme de pH que le test Caco-2, mais ne peut être exploité que si l'on s'intéresse à la diffusion passive d'une molécule donnée. Cette diffusion peut également être évaluée avec le test cellulaire qui offre en supplément plus d'informations lorsqu'on réalise plusieurs expérimentations (de A vers B et de B vers A) (Cf section 1.5.6.1). L'avantage incontournable du test PAMPA est sans aucun doute son coût ainsi que le débit avec lequel il peut être réalisé. En effet, au moins 500 composés peuvent être évalués pendant une semaine avec le test PAMPA contrairement au test Caco-2 qui nécessitera un à deux techniciens pour analyser 30 composés pour une même durée. Si l'on compare les données générées avec les deux méthodes, le modèle suivant présenté dans la Figure 1.12 sera obtenu.

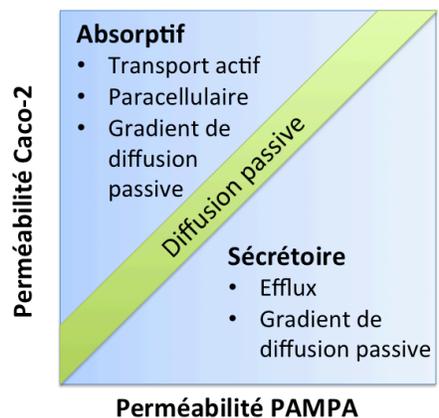


Figure 1. 12: Schéma comparatif des données générées avec les tests Caco-2 et PAMPA pouvant indiquer le type de mécanisme de perméabilité mis en jeu.

Adaptée avec permission [43]

Ce genre de comparaison peut élucider comment il est possible de combiner les deux tests ensemble lors des phases de découvertes. En effet, lors des premières phases, lorsque plusieurs molécules candidates doivent être testées, le PAMPA peut constituer un test rapide et de faible coût pour sélectionner les molécules prometteuses. Au cours de la phase de découverte, les deux tests peuvent être utilisés synergiquement afin de se procurer plus de détails sur les mécanismes de perméabilité. Enfin, le test Caco-2 peut être exploré pour réaliser des études plus poussées de mécanisme de transport et de perméabilité [5, 43]

1.6 Objectifs

1.6.1 Objectif général

Les travaux décrits dans cette revue de littérature ont pu démontrer l'importance d'avoir des tests de criblage pour l'évaluation de la perméabilité qui sont rapides, faciles d'utilisation mais surtout fiables au cours de la première phase de découverte de médicaments. Ils ont également pu énumérer et souligner la contribution de chacun des différents tests existants lors de cette phase critique ainsi que leurs limitations. Parallèlement, cette revue a présenté une brève description de l'apport des membranes supportées pour l'étude et la compréhension de phénomènes biologiques et cellulaires, mais aussi comme une éventuelle alternative pour les tests de perméabilité - un axe encore très peu exploré.

L'objectif général du projet s'est donc bâti autour de cette thématique qui est de développer un test qui regrouperait les différents avantages des tests de perméabilité cités en exploitant le système de membrane supportée proposé par Nirasay et coll. [13]. Ce système consisterait à développer une nouvelle membrane constituée d'une bicouche lipidique déposée sur un support solide poreux (filtre) recouvert d'un polymère.

La membrane de ce test amélioré, appelé « Néo-PAMPA », sera plus représentative de la paroi intestinale par sa bicouche lipidique. Elle présenterait une certaine fluidité tout comme celle des membranes biologiques grâce au coussin de polymère déposé sur le support solide, et générerait des résultats pertinents pouvant être corrélés aux valeurs de perméabilité humaine et au test cellulaire Caco-2 considéré comme le test de référence. Dans un stade final du projet, ce test pourra être miniaturisé et exploité à haut débit par les industries pharmaceutiques comme test fiable et rapide au cours des premières phases de développement du médicament.

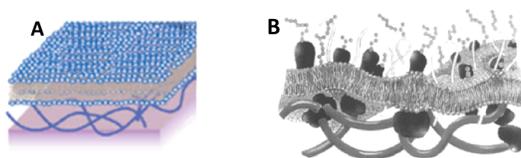


Figure 1. 13: Schéma comparatif entre la membrane modèle et le membrane biologique.

A) membrane lipidique supportée [12] et **B)** membrane biologique visée [44]

1.6.2 Objectifs spécifiques

Afin d'atteindre cet objectif général qui est de développer une nouvelle membrane biologiquement plus représentative pour le test PAMPA, plusieurs étapes d'optimisation et d'évaluation sont nécessaires. L'objectif de mon projet était de valider les membranes de PAMPA, c'est-à-dire:

- Identifier le filtre poreux optimal à utiliser comme support solide pour la membrane
- Optimiser la composition lipidique de la membrane
- Vérifier l'effet du temps de déposition du coussin de polymère sur sa topographie
- Optimiser la préparation de liposomes
- Développer une bicouche lipidique fluide et stable au cours du temps
- Effectuer des tests de perméabilité avec 8 médicaments dont les données de perméabilité sont déjà décrites dans la littérature
- Mettre en place le test Caco-2 et le valider.
- Réaliser le test de perméabilité Caco-2 avec les 8 médicaments pour éviter les variations inter-laboratoires.
- Comparer les résultats obtenus avec le Néo-PAMPA avec ceux obtenus avec le test de référence réalisé au laboratoire (test Caco-2).

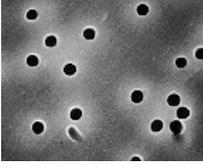
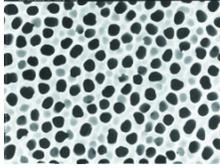
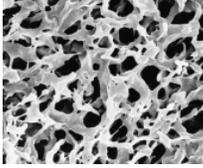
Chapitre 2. Optimisation des composantes de la membrane PAMPA

2.1 Introduction

Le test PAMPA s'est fait reconnaître au sein des laboratoires pharmaceutiques comme étant un test de criblage à haut débit pouvant générer les données utiles lors des premières phases de découverte de médicaments de manière rapide. Cependant, contrairement au test Caco-2, cet essai manque de représentativité des résultats qu'il génère, comparativement à la perméabilité intestinale observée chez l'humain. Le développement et l'optimisation des composantes d'une nouvelle membrane, dont la structure organisée se rapproche plus de la membrane biologique et qui peut être utilisée à haut débit, constitue l'objectif principal de ce premier chapitre. En effet, une approche systématique est adoptée afin de déterminer les meilleurs paramètres pouvant à la fois améliorer la structure de la membrane et permettre son utilisation à haut débit. Cette membrane comporte trois composantes : (1) un support solide (filtre poreux), (2) un coussin de polydopamine et (3) une bicouche lipidique.

Afin de déterminer le meilleur choix de support solide pour le test PAMPA, plusieurs filtres sont évalués. Le meilleur choix de filtre est déterminé selon les coefficients de diffusion générés par le test de perméabilité réalisé avec la nouvelle membrane, la facilité d'utilisation et le prix du produit. Les filtres utilisés sont : en polycarbonate hydrophile, en alumine hydrophile (Anodisc®) et en polyfluorure de vinylidène hydrophobe (PVDF). Ces filtres possèdent différentes caractéristiques regroupées dans le Tableau 2.1.

Tableau 2. 1 : Caractéristiques des filtres utilisés

	Polycarbonate ^[45]	Anodisc ^[46]	PVDF ^[47]
Structure			
Densité de porosité	10^8 pores/cm ²	25-50%	70%
Diamètre de pore (nm)	200 /400	200	200
Diamètre du filtre (mm)	25/12	25	25
Caractéristiques	Hydrophile	Hydrophile	Hydrophobe
Utilisation	Facile à manipuler	Cassant	Facile à manipuler
Prix	Peu dispendieux	Dispendieux	Peu dispendieux

Concernant la deuxième composante, il est connu que pour les modèles de membranes supportées, un coussin de polymère déposé sur un support solide devrait idéalement agir comme une couche lubrifiante entre la bicouche et le substrat [8]. Pour assurer la formation d'une bicouche plane, le coussin de polymère doit être le plus lisse possible. Pour cela, une comparaison entre deux temps de déposition (4 heures et 24 heures) décrits dans la littérature [13, 48] a été faite afin de vérifier la topographie du coussin. Également, un surfactant hydrophile non ionique, le polysorbate 80 (Tween-80) (Figure 2.1), est testé pour voir son influence sur la déposition de la polydopamine. Ce surfactant est couramment utilisé en industrie pharmaceutique à cause de sa toxicité relativement faible et se caractérise par une concentration micellaire critique (CMC) de 0.01 mg/mL [49]. L'évaluation des filtres hydrophobes comme le PVDF a incité l'ajout de cet émulsifiant à une concentration de 5 mg/mL dans la solution de polydopamine. Cette concentration utilisée est déterminée à partir d'une étude d'intégrité des membranes réalisée au sein du laboratoire après test de différentes concentrations de Tween-80.

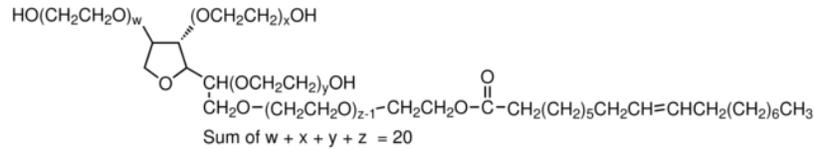


Figure 2. 1: Structure moléculaire du polysorbate 80 [50].

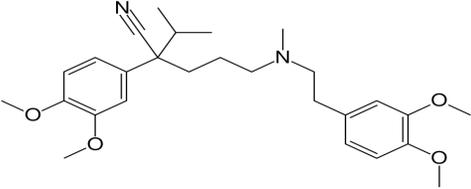
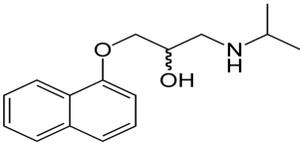
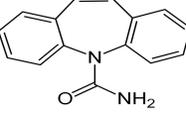
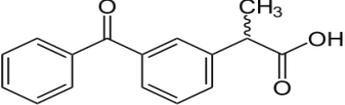
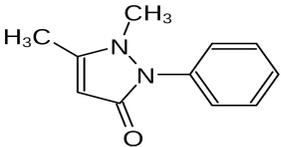
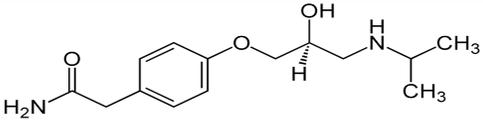
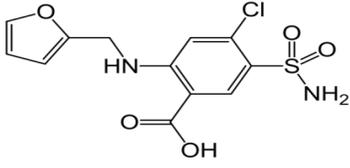
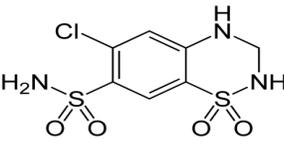
Enfin, en ce qui concerne la bicouche lipidique, plusieurs travaux d'optimisation sont réalisés. Dans un premier temps, deux phospholipides synthétiques sont testés, soit la 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) et la 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC). La DMPC possède deux chaînes hydrophobes en C14 saturées et est caractérisée par une température de transition gel-liquide cristalline (T_m) de 23°C. Pour sa part, la DOPC possède deux chaînes hydrophobes en C18 contenant chacune une insaturation en position 9 et se distingue par une T_m de -16,5°C [38]. Il est connu dans la littérature que les lipides les plus abondants dans la membrane biologique sont les phosphatidylcholines [51]. Étant donné que la DMPC et la DOPC appartiennent à cette famille, le choix du phospholipide à utiliser se fera donc en fonction des différences au niveau des résultats générés ainsi que de la facilité et de la reproductibilité de la préparation des liposomes.

Les deux phospholipides sont utilisés pour la préparation d'une membrane complète. D'autres étapes d'optimisation de la composition sont réalisées et ajustées à la préparation de liposomes. En effet, des recherches bibliographiques ultérieures ont montré que l'ajout du cholestérol ainsi qu'un antioxydant (le BHA) pourrait mieux stabiliser le phospholipide insaturé utilisé (DOPC), vu que ce dernier est très sensible à l'oxydation par l'oxygène de l'air. Un pourcentage de 5% cholestérol (p/p) et de 0,01% de la quantité totale en lipides de BHA sont alors utilisés. Ce mélange lipidique est utilisé pour la préparation de liposomes qui vont servir lors de la préparation de membranes PAMPA.

Toutes ces étapes d'optimisation des composantes de la membrane sont évaluées grâce à des tests de perméabilité. Les dispositifs utilisés sont soit des cellules de Franz horizontales soit des plaques en sandwich (Figure 2.2). Huit médicaments appartenant aux quatre classes SCB ont été sélectionnés pour les tests de perméabilité: vérapamil, propranolol, carbamazépine, kétoprofène, antipyrine, aténolol, furosémide et hydrochlorothiazide. Leurs structures et propriétés pharmacocinétiques sont décrites dans le tableau 2.2.

Ce chapitre présentera donc un protocole général de la préparation des membranes PAMPA dans lequel nous avons fait varier à chaque fois un paramètre dans un objectif d'optimisation.

Tableau 2. 2: Structures, classes et perméabilité apparente des molécules testées.

Molécules	Structure	Classe BCS	P _{app} littérature	Références
Vérapamil		I	8,63 - 39,4	[43, 52-54]
Propranolol		I	3 - 39,8	[43, 52-55]
Carbamazépine		II	6,4 - 7,8	[52-54]
Kétoprofène		II	0,05 - 2,84	[43, 52, 54]
Antipyrine		III	0.7 - 2.87	[43, 52, 54, 56]
Aténolol		III	0,06 - 2,75	[43, 52, 56, 57]
Furosémide		IV	0,01 - 1,45	[43, 52, 54, 56]
Hydrochlorothiazide		IV	0,01 - 1,82	[43, 52, 54, 56]

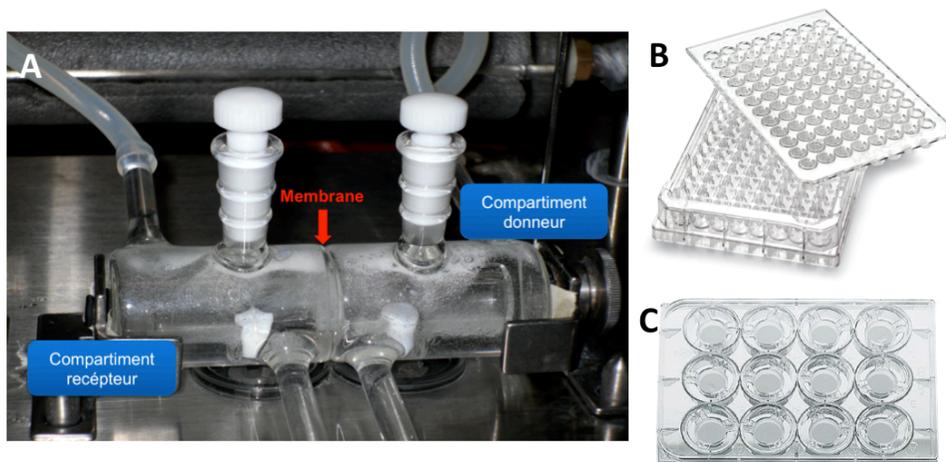


Figure 2. 2: Les dispositifs utilisés pour les tests de perméabilité. **A)** Cellules de Franz horizontales, **B)** plaque 96 puits avec des filtres en PVDF [58] et **C)** Plaque 12 puits avec filtres en polycarbonate.

Modifiée à partir de [59].

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Matériel

Tous les tampons phosphate sont USP (pH 8,5, pH 7,4 et pH 6,4) et ont été préparés avec de l'eau MilliQ. Les phospholipides 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) et le DC-cholestérol·HCl ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Alabama, USA). La dopamine (hydrochlorure de 2-(3,4-dihydroxyphényl)éthylamine), le polysorbate-80 et l'hydroxyanisole butylé (*butylated hydroxyanisole*, BHA) de pureté $\geq 98,5\%$ ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Tous les filtres utilisés comme support solide sont commercialisés chez Whatman (Ottawa, Canada) sous le nom de Nuclepore pour les filtres en polycarbonate, et Anodisc pour les filtres en alumine. Ces filtres ont été testés grâce un dispositif de cellules de Franz horizontal composé de huit paires de cellules. Plus tard, des plaques de 12 puits Costar

couramment utilisées pour les tests Caco-2 ainsi que des plaques de 96 puits avec des filtres en polyfluorure de vinylidène hydrophobe (PVDF) ont été exploitées. Une sonde à soniquer de Fisher Scientific, Modèle 505 Sonic dismembrator, (Pittsburgh, USA) ainsi qu'une extrudeuse Lipofast de Avestin (Ottawa, Canada) et des filtres en polycarbonate (diamètre 200 nm) ont été utilisés pour l'obtention de liposomes. Le Malvern Zetasizer Nano-ZS (Worcester, UK) a été utilisé pour la mesure de tailles des liposomes. L'étude de la déposition de la polydopamine a été réalisée avec un microscope électronique à balayage à effet de champ, de marque Hitachi, modèle S-4700 (Dallas, USA). Le vérapamil, la carbamazépine, l'antipyrine, l'aténolol ont été achetés chez Sigma Aldrich (Oakville, Canada), le furosémide, le kétoprofène, le propranolol chez AK Scientific Inc. (Union City, USA) et l'hydrochlorothiazide chez Alfa Aesar (Ward Hill, USA). La cassette de médicaments utilisée pour les tests de perméabilité a été préparée à partir de solution stock dans du DMSO à 10 mM chacun, puis diluée à une concentration de 10 μ M.

2.2.2 Méthodes

2.2.2.1 Protocole général de la préparation de la membrane

La préparation d'une membrane complète est constituée par deux étapes majeures : (1) la déposition du coussin de polymère et (2) la préparation de la bicouche lipidique. Tel que décrit par Nirasay et coll. [13], la déposition de la polydopamine se fait en incubant le filtre à tester dans une solution de polydopamine à 2 mg/mL dans un tampon phosphate à pH 8,5. La réaction de polymérisation se fait à l'air (en présence d' O_2) et à température ambiante (Figure 2.3).

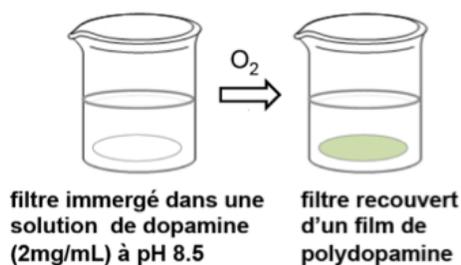


Figure 2. 3: Déposition de la polydopamine sur le support solide [13].

Le filtre est par la suite rincé à l'eau milliQ afin d'arrêter la réaction de polymérisation. Une suspension liposomale est utilisée pour la déposition de la bicouche. Elle a été obtenue selon les deux méthodes décrites ci-dessous.

2.2.2.1.1 Méthode de gel/dégel^[13]

Cette méthode a été décrite par Nirasay et coll. [13] et consiste à préparer une suspension de lipides (DMPC) à une concentration de 1 mg/mL dans un tampon phosphate à pH 7,4. Le volume de la suspension varie selon le nombre de tests à réaliser. Généralement, 4 mL sont nécessaires pour chaque membrane de diamètre 21 mm. Brièvement, la solution lipidique subit cinq cycles constitué chacun d'une phase de gel dans de la glace sèche, suivie d'une phase de dégel dans l'eau à 50°C et d'une minute d'agitation au vortex. Une étape de sonication est par la suite effectuée selon le programme suivant: 30 secondes d'impulsion, suivies de 30 secondes de repos, ces deux étapes étant répétées pendant 10 minutes, puis centrifugation à 5000 rpm pendant 30 minutes. Une dernière étape d'extrusion à travers un filtre en polycarbonate de diamètre de pores de 200 nm est recommandée pour forcer les liposomes à traverser les pores du filtre 27 fois afin d'uniformiser la taille de la population présente dans la solution.

2.2.2.1.2 Méthode de film lipidique^[60]

Cette méthode se distingue par son avantage à travailler sur un plus petit volume. Les lipides sont dissous dans un solvant organique pour s'assurer de la bonne homogénéité de la solution. Généralement, la dissolution se fait dans du chloroforme et la concentration de la solution est de 60 mM. 1 mL de la suspension est transféré dans un ballon de 15 mL et placé dans l'évaporateur rotatif afin de faire évaporer le solvant organique et obtenir un film lipidique. Pour une meilleure uniformité du film, la vitesse la plus faible de l'évaporateur est utilisée. Une fois le film formé, une étape d'hydratation est réalisée en rajoutant 1 mL du tampon phosphate USP pH 7,4. Un liquide « laiteux » est obtenu au bout d'une heure. Il est important de bien sceller le ballon pour éviter l'évaporation et remettre dans l'évaporateur rotatif, à une vitesse plus grande, et de s'assurer que le ballon est immergé dans le bain-marie et que l'on travaille à une température supérieure à la T_m du lipide. Une fois l'étape d'hydratation terminée, la suspension est transférée dans un tube Eppendorf® et une sonication dans un bain

à soniquer est effectuée pendant 30-45 minutes. Enfin, la suspension est extrudée au minimum 27 fois à une température supérieure à T_m à travers un filtre de 200 nm. La taille des liposomes obtenus est déterminée grâce à la diffusion dynamique de la lumière (DLS) (voir ci-dessous). La suspension est finalement diluée à une concentration de 1mg/mL avec le tampon phosphate pH 7,4.

Une fois la suspension liposomale prête, elle est déposée sur le filtre recouvert de polydopamine pendant 16h à 37°C. La bicouche est alors formée suite à la fusion de vésicules (Figure 2.4).

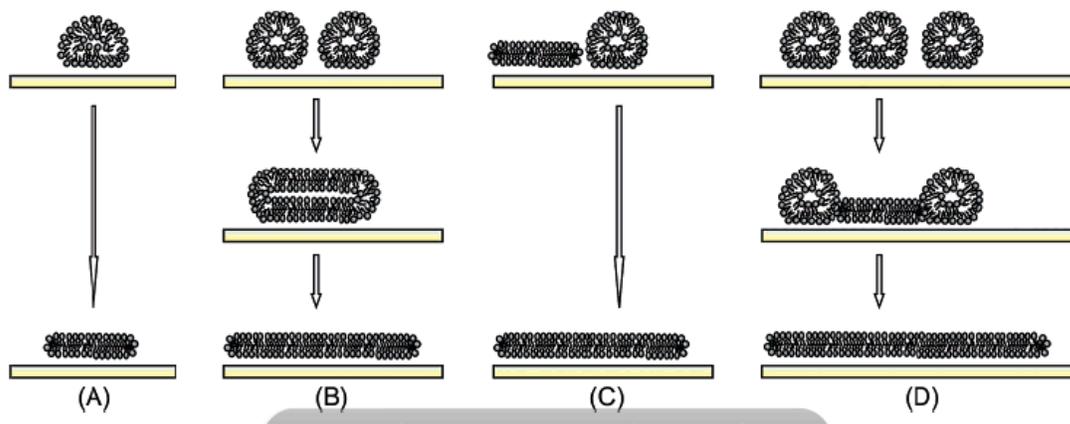


Figure 2. 4: Mécanismes de la fusion des vésicules.(A) La vésicule adsorbée se rompt spontanément suite à sa déformation sur le support; (B) les vésicules voisines adsorbées fusionnent puis forment une bicouche; (C) et (D) la rupture d’une vésicule adsorbée induit celle des vésicules voisines.

Modifiée à partir de [61].

Enfin, la membrane (comprenant la bicouche déposée sur le filtre recouvert du coussin de polydopamine) est rincée avec de l’eau milliQ et prête à être utilisée pour les tests de perméabilité.

2.2.2.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images en MEB ont été prises sous vide et avec une vitesse d’accélération de 15,0 kV.

2.2.2.3 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS pour la caractérisation de la taille des liposomes a été réalisé avec l'instrument Malvern Zetasizer Nano-ZS. La DLS détermine le coefficient de diffusion des liposomes dans le milieu liquide en mesurant les fluctuations de l'intensité de la diffusion dynamique de la lumière causée par le mouvement brownien d'une particule. Cette méthode rapporte le diamètre hydrodynamique qui peut être calculé à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein [62]. La technique utilise un laser qui passe à travers l'échantillon placé dans la cuvette. Les échantillons sont préparés en diluant 50 µL de la suspension lipidique dans 950 µL de tampon phosphate USP à pH 7,4. Des corrections automatiques sont faites par l'instrument pour ajuster l'indice de réfraction de la lumière à l'interface cuvette-liquide. Les mesures sont effectuées en triplicata et permettent de déterminer la distribution de taille des liposomes ainsi que l'indice de polydispersité (PDI).

2.2.2.4 Test de perméabilité PAMPA

La perméabilité apparente (P_{app}) a été calculée à partir d'un modèle mathématique basé sur une résolution analytique de la première loi de Fick qui relie la vitesse de diffusion (dQ/dt) avec la différence de concentration entre les compartiments (ΔC) et la surface de la membrane (S). La résolution tenait compte du fait que dQ/dt et ΔC varient en fonction du temps à cause de la diffusion et aussi du prélèvement d'échantillons.

Première loi de Fick :

$$\frac{dQ}{dt} = P_{app} \times \Delta C \times S \quad (2.1)$$

2.3 Résultats

2.3.1 Nature des filtres

Les résultats des tests PAMPA pour évaluer la perméabilité des huit médicaments de la cassette, réalisés avec des membranes ayant comme support solide les différents filtres à tester, sont regroupés dans le Tableau 2.3 ci-dessous :

Tableau 2. 3: Coefficients de perméabilité (P_{app}) des 8 composés obtenus avec les différents types de filtres utilisés pour le test PAMPA.

<i>Composés</i>	Coefficients de perméabilité (cm/s)		
	<i>Polycarbonate</i> ¹	<i>Alumine</i> ²	<i>PVDF</i> ³
	($\times 10^{-5}$)	($\times 10^{-4}$)	($\times 10^{-6}$)
<i>Antipyrine</i>	3,98	3,76	10,70
<i>Atenolol</i>	3,73	-	8,37
<i>Carbamazépine</i>	4,39	4,05	9,78
<i>Ketoprofène</i>	4,11	3,99	8,96
<i>Propranolol</i>	3,85	4,66	8,24
<i>Vérapamil</i>	3,43	2,96	8,50
<i>Furosémide</i>	1,07	-	7,83
<i>Hydrochlorothiazide</i>	3,30	-	8,03

¹ Plaque de 12 puits avec des inserts en polycarbonate. ² Filtres testés avec les cellules de Franz horizontales.

³ Plaque de 96 puits avec des filtres en PVDF.

Les valeurs des coefficients de perméabilité observés varient d'un filtre à un autre (ou d'un dispositif à un autre), mais que la nature des filtres en elle-même n'influence pas sur la diffusion des différentes molécules des différentes classes SCB. En effet, l'aténolol ainsi que le furosémide et l'hydrochlorothiazide (Classe IV) devraient diffuser nettement moins que les autres molécules. Or ici, nous remarquons que toutes les molécules diffusent à la même vitesse.

Les coefficients obtenus avec les filtres en PVDF sont ceux ayant les plus faibles valeurs. Ceci est dû à leur caractère hydrophobe qui ralentit la diffusion des molécules présentes dans le tampon phosphate (hydrophile). De plus, la déposition du polymère ainsi que de la bicouche sont plus difficiles lors de l'utilisation de ce filtre, ce qui nuit à la bonne préparation de la membrane.

Les coefficients obtenus avec les filtres en polycarbonate ainsi qu'avec les filtres en alumine sont de l'ordre de 10^{-5} et 10^{-4} cm/s respectivement. Ces valeurs sont largement supérieures à celles décrites dans la littérature. On peut donc conclure que les filtres en polycarbonate et en alumine n'agissent pas en tant que barrière à la diffusion. De plus, l'utilisation des filtres en

polycarbonate, moins dispendieux, est beaucoup plus facile que celle des filtres en alumine qui sont cassants et assez chers. Étant donné que l'objectif final du test est de l'exploiter en tant que test de criblage à haut débit lors des premières phases de découverte de médicaments, le prix ainsi que la facilité d'utilisation ont une importance majeure. Les filtres en polycarbonate sont donc retenus comme étant le meilleur choix de support solide pour nos membranes Néo-PAMPA.

2.3.2 Temps de la déposition de la polydopamine sur les différents filtres

Le dépôt de la polydopamine pendant 4h pour la préparation d'un coussin de polymère dans un modèle de membrane supportée a déjà été décrit dans la littérature [13]. Toutefois, afin de s'assurer que cette déposition ne modifie pas la topographie du filtre, cette expérience a été réalisée sur les filtres de polycarbonate et PVDF ayant subi des temps d'incubation différents (4h et 24h), puis la topographie des filtres évaluée par microscopie électronique à balayage (MEB). Une différence nette entre les deux temps d'incubation a été observée. En effet, comme on peut le remarquer sur la Figure 2.5, une déposition pendant 24h cause l'obstruction des enchevêtrements du filtre en PVDF contrairement à celle de 4h. Le même résultat est observé également pour le cas des filtres en polycarbonate (résultats non présentés). On peut conclure donc qu'une déposition de 4h est suffisante pour obtenir le coussin de polymère désiré. Ce résultat est appuyé par les résultats présentés par Nirasay et al. [13] qui suggéraient une incubation de 4 h.

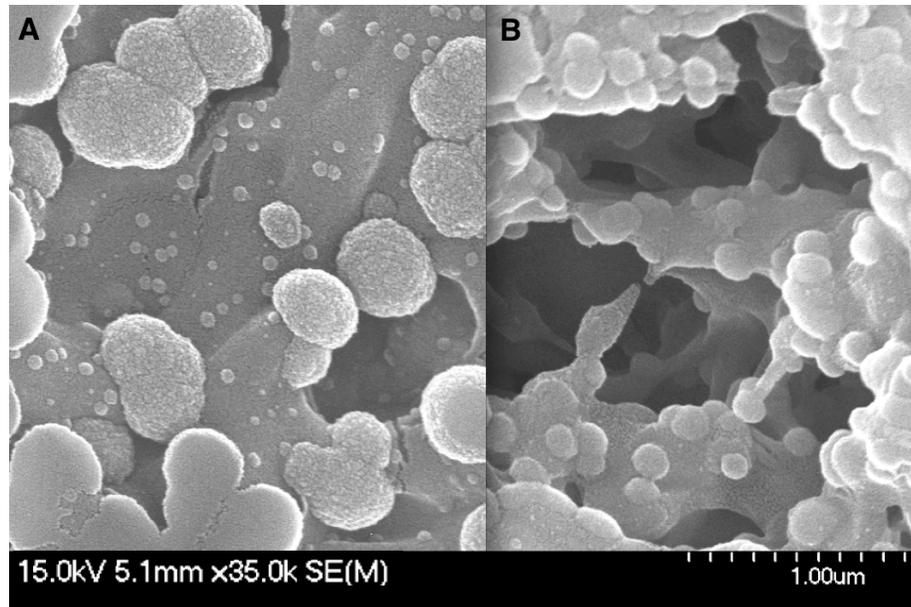


Figure 2. 5: Observation en microscopie électronique à balayage (MEB) de la déposition de la polydopamine sur un filtre en PVDF incubé pendant A) 24 heures et B) 4 heures.

2.3.3 Effet du Tween-80 sur la déposition de la polydopamine

La déposition de la polydopamine sur des filtres en polycarbonate et en PVDF pendant 4h en présence de 5 mg/mL de Tween-80 a été évaluée par MEB. Les images (Figure 2.6) montrent que dans le cas des filtres en polycarbonate, le détergent favorise la formation d'agrégats de polydopamine sur la surface, ce qui augmente la rugosité du filtre, alors qu'en son absence, la déposition de pDA se fait de la manière souhaitée.

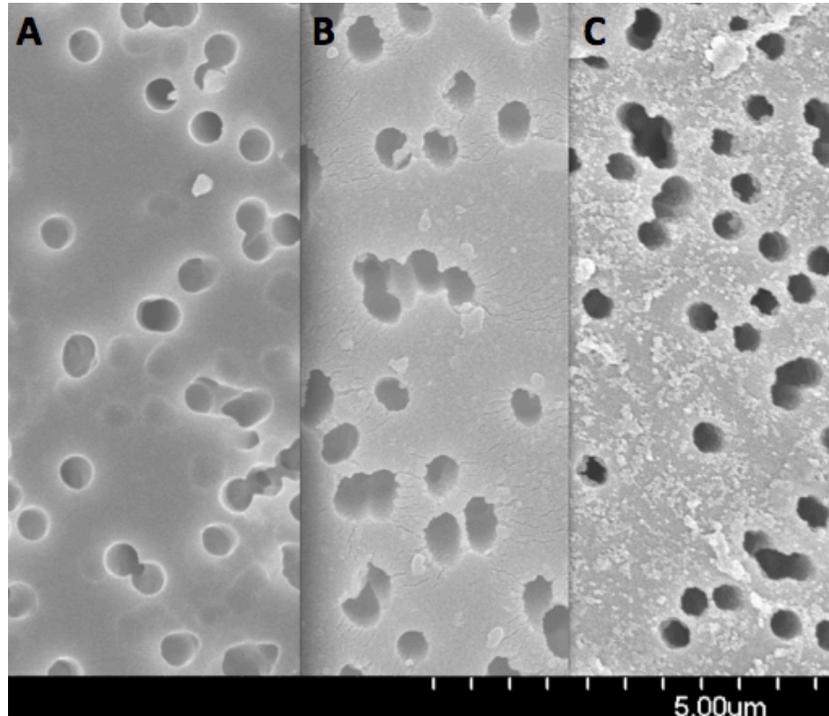


Figure 2. 6: Images de MEB de filtre de polycarbonate A) non modifié (diamètre des pores de 400 nm), B) recouvert de pDA et C) de pDA avec utilisation de Tween-80.

Dans le cas des filtres en PVDF, les images en MEB nous montrent le cas inverse : en absence de Tween-80, la déposition de la polydopamine bouche les pores des filtres, ce qui pourrait réduire le flux passant au travers ce dernier, alors que la présence de 5 mg/mL de ce surfactant améliore cette déposition et stabilise la pDA qui vient se déposer sur les enchevêtrements de ce filtre et maintient sa structure initiale (Figure 2.7).

Ces images prises en MEB démontrent alors qu'il est souhaitable d'utiliser un surfactant lors de l'utilisation d'un filtre hydrophobe afin d'améliorer la déposition du polymère. Cette étape est inutile lors de l'utilisation de filtre hydrophile comme le polycarbonate.

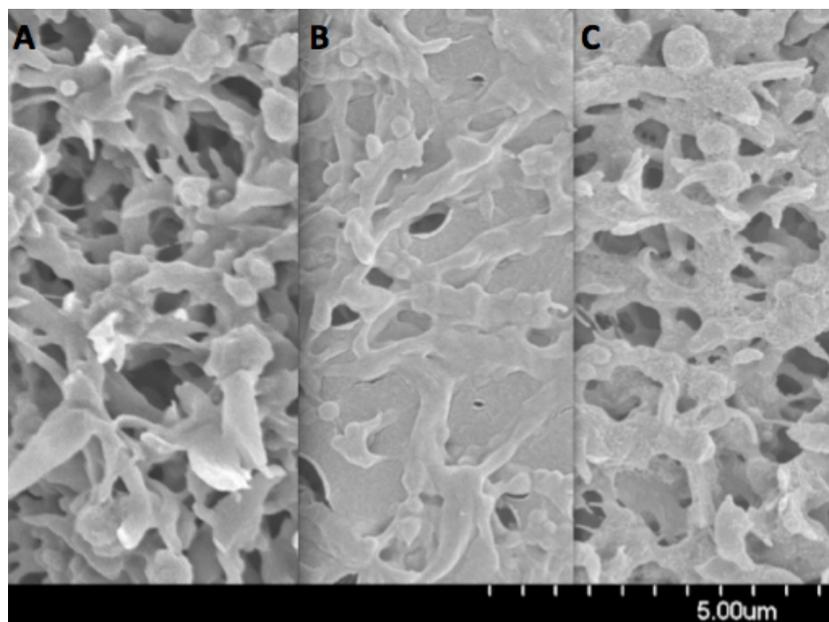


Figure 2. 7: Images de MEB de filtre de PVDF hydrophobe

A) non modifié (diamètre des pores de 400 nm), B) recouvert de pDA et C) de pDA avec utilisation de Tween-80.

2.3.4 Optimisation de la composition de la bicouche lipidique

2.3.4.1 *Composition en phospholipides*

Afin de déterminer le meilleur choix de phospholipides à utiliser entre la DMPC et la DOPC, des tests de perméabilité ont été réalisés. Le calcul des coefficients de perméabilité présentés dans le Tableau 2.4 montre dans un premier temps que le test PAMPA n'est pas encore optimal étant donné que tous les composés présentent des coefficients de perméabilité similaires, indépendamment de leur classe biopharmaceutique. Il démontre aussi que les phospholipides utilisés n'ont pas d'influence sur les perméabilités observées.

Tableau 2. 4: Comparaison des coefficients de perméabilité obtenus avec des membranes de composition en phospholipides différentes (DMPC et DOPC)

Médicaments	Coefficients de perméabilité (cm/s)	
	DMPC	DOPC
	$P_{app} (\times 10^{-5}) (n=3)$	$P_{app} (\times 10^{-5}) (n=3)$
Antipyrine	3,40±0,5	4,09±0,2
Atenolol	3,08±0,7	3,48±0,1
Carbamazépine	3,84±0,9	3,11±0,4
Ketoprofène	3,42±0,1	3,18±0,1
Propranolol	3,21±0,2	3,11±0,5
Verapamil	2,47±0,4	2,72±0,4
Furosémide	0,81±0,2	3,59±0,1
Hydrochlorothiazide	2,95±0,8	3,72 ±0,2

Lors de la préparation des liposomes avec la méthode gel/dégel (section 2.6 de ce chapitre), la température de la solution lipidique doit être maintenue tout au long de l'expérience au-dessus de la température de transition gel-liquide cristalline du lipide. Dans le cas de la DMPC, dont la T_m est de 23°C, il est primordial de chauffer la solution lipidique afin de garder les phospholipides dans un état « fluide », ce qui complique la réalisation de la manipulation et compromet la reproductibilité de la bicouche d'un test à l'autre. En utilisant la DOPC comme phospholipide, dont la T_m est de -16,5°C, il est possible de travailler à température ambiante tout assurant l'état fluide des phospholipides. Toutes ces raisons ont fait que notre choix pour les phospholipides s'est arrêté sur la DOPC.

2.3.4.2 Ajout de cholestérol

L'ajout de 5% (p/p) de cholestérol ainsi que 0,01% de la quantité totale en lipides de BHA ont été testés pour la préparation de liposomes avec la méthode « film lipidique ». Ce paramètre qui est l'ajout de cholestérol et du BHA dans la composition lipidique contribue certainement à l'obtention d'une bicouche lipidique à la fois fluide et stable, mais ne peut être évalué qu'une fois tous les paramètres optimisés. Aucune différence n'a été observée avec les tests de diffusions réalisés avec des membranes de cette composition (Résultats non présentés).

2.3.4.3 Méthode de préparation des liposomes

Les méthodes de gel/dégel et de film lipidique ont été utilisées pour la préparation des liposomes. Ces liposomes ont été fusionnés sur des filtres recouverts de polydopamine et les membranes résultantes ont été utilisées pour des tests de perméabilité. La méthode retenue pour le test optimisé a été celle du film lipidique pour les raisons suivantes:

- La méthode gel/dégel utilise de larges volumes de la suspension lipidique qui est à une concentration de 1 mg/mL, ce qui rend l'expérience laborieuse et dispendieuse lorsque plusieurs tests sont conduits en même temps. Or l'objectif final du projet est de développer un test facile d'utilisation et de haut débit. Cette méthode ne remplit pas ces deux critères.
- Lors de la phase de centrifugation, un dépôt blanc est observé. Ceci nous amène à croire que les lipides précipitent lors de cette étape, ce qui réduit la quantité de lipides déposés sur les filtres.
- La méthode film lipidique est une méthode qui utilise un faible volume de suspension de lipides (1 mL au lieu de plusieurs), renferme moins d'étapes de réalisation et est plus reproductible que celle de gel/dégel. Les liposomes obtenus avec cette méthode ont une répartition de tailles plus uniforme et mieux contrôlée qu'avec l'autre méthode; résultat vérifié par DLS (cf. figure 2.8).

2.3.4.4 Taille des liposomes

Étant donné qu'il s'agit d'une phase d'optimisation de différents paramètres, plusieurs tailles de liposomes ont été testées. Des liposomes de diamètre de 100 nm, 200 nm, 400 nm et 600 nm ont été obtenus lors de ce projet par extrusion à travers des filtres en polycarbonate dont les pores sont de ces tailles respectives. Les résultats de DLS ont montré que cette méthode permet le contrôle et l'obtention des diamètres désirés (cf. figure 2.8). Les liposomes de diamètre de 200 nm et 400 nm ont été déposés sur des filtres de 200 nm, ceux de diamètre 600 nm ont été déposés sur des filtres de porosité de 400 nm. La taille des liposomes désirée dépend essentiellement du type de filtre utilisé. En effet, pour une déposition optimale sur les filtres, les liposomes doivent avoir un diamètre supérieur à celui des pores des filtres. Étant donné que les plaques de 12 puits dont les inserts renferment des filtres en polycarbonate

d'une porosité de 400 nm ont été retenues comme dispositif, des liposomes de diamètre 600 nm sont visés.

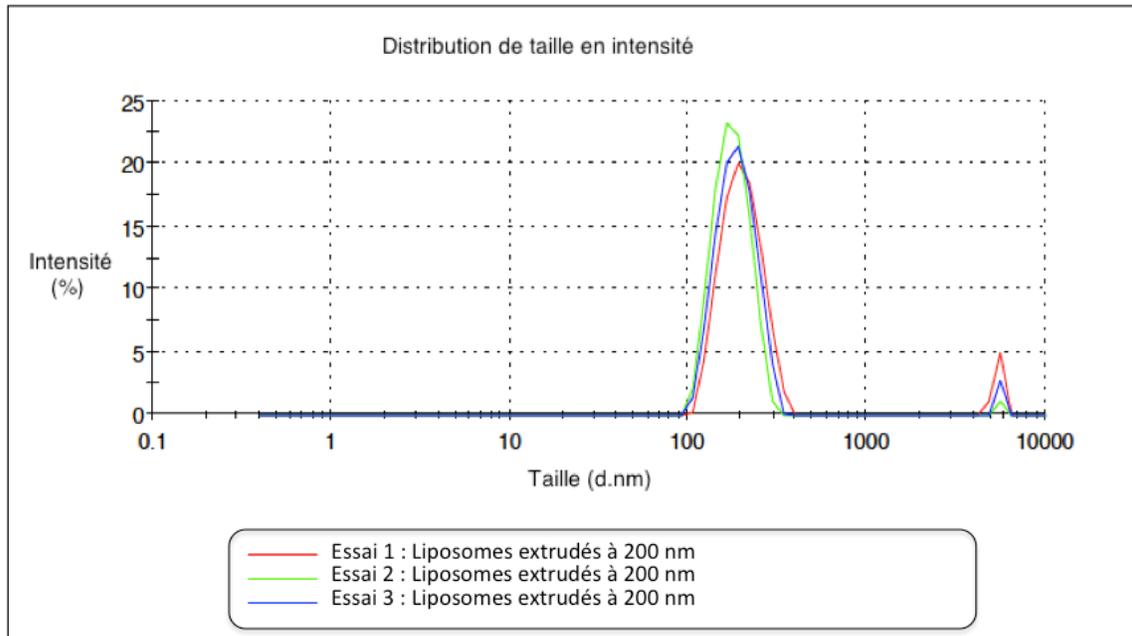


Figure 2. 8: Mesure DLS de la taille des liposomes.

2.4 Conclusion

Afin de mettre en place une nouvelle version du test PAMPA, plusieurs travaux d'optimisation au niveau de la membrane ont été réalisés :

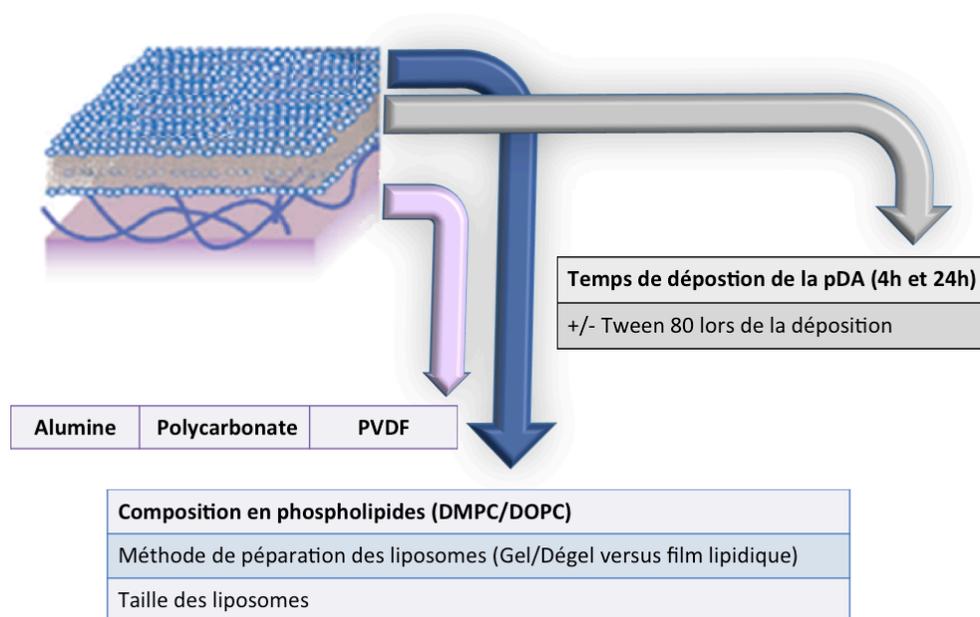


Figure 2. 9: Schéma récapitulatif des travaux d'optimisation réalisés.

Les paramètres retenus pour le test Néo-PAMPA sont donc :

- Les filtres en polycarbonates comme support solide. Des filtres de porosité de 400 nm seront utilisés dans une plaque 12 puits.
- Une déposition de la polydopamine pendant 4h sans Tween-80.
- Une composition en phospholipides renfermant : DOPC/cholestérol/BHA pour former des liposomes d'une taille de 400 nm et plus.

Chapitre 3. Le néo-PAMPA optimisé

3.1 Introduction

Le Néo-PAMPA vise à être une version améliorée du PAMPA décrit dans la littérature. Il se démarque des autres tests par une structure organisée constituée d'une bicouche déposée sur un filtre poreux recouvert d'un coussin de polymère -, la polydopamine. Une fois que tous paramètres ont été optimisés et qu'une première version du Néo-PAMPA a été mise en place, il était important de le valider en évaluant la perméabilité de la cassette de médicaments.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Matériel

Les plaques Costar® 12 puits avec des filtres en polycarbonate (400 nm diamètre de pores) utilisées pour le test de perméabilité ont été achetées chez Fisher Scientific (Pittsburgh, USA). La solution de DOPC dans du chloroforme (30 mM) ainsi que le DC- cholestérol·HCl (cholestérol cationique mélangé avec du diméthylaminoéthane)-carbamoyle (220 mM) ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Alabama, USA). La polydopamine ainsi que l'hydroxyanisole butylé (*Butylated hydroxyanisole*, BHA) de pureté $\geq 98.5\%$ ont été achetés chez Sigma Aldrich (détails).

Une sonde à soniquer de Fisher Scientific, Modèle 505 Sonic dismembrator, (Pittsburgh, USA) ainsi qu'une extrudeuse Lipofast de Avestin (Ottawa, Canada) et des filtres en polycarbonate (diamètre 200 nm) ont été utilisés pour l'obtention de liposomes. Tous les tampons utilisés au cours des expériences sont préparés selon les normes USP avec de l'eau MilliQ. Le Malvern Zetasizer Nano-ZS (Worcester, UK) a été utilisé pour la mesure de tailles des liposomes.

Le vérapamil, la carbamazépine, l'antipyrine, l'aténolol ont été achetés chez Sigma Aldrich (Oakville, Canada), le furosémide, le kétoprofène, le propranolol chez AK Scientific Inc. (Union City, USA) et l'hydrochlorothiazide chez Alfa Aesar (Ward Hill, USA). La cassette

de médicaments utilisée pour les tests de perméabilité a été préparée à partir de solutions stock dans du DMSO à 10 mM chaque médicament, puis diluée à une concentration de 10 μ M.

3.2.2 Méthodes

3.2.2.1 Tests de perméabilité du Néo-PAMPA optimisé

Les mêmes étapes décrites dans le chapitre I pour l'essai de perméabilité ont été réalisées mais avec les conditions identifiées comme étant optimales. Brièvement, une solution de polydopamine à 2 mg/mL dans du tampon phosphate de pH 8,5 est déposée sur les membranes fixées dans les inserts des plaques Costar. La déposition se fait pendant 4h à température ambiante et en présence de O₂. Parallèlement, la solution de liposomes est préparée comme suit : une solution lipidique de 1 mL est préparée à partir des solutions stock de DOPC, de cholestérol et de BHA afin d'atteindre les concentrations respectives de 2 mM, 5% de cholestérol (p/p) et 0,01% BHA (p/p). Le volume final est ajusté à 1 mL avec du méthanol. La solution est soumise à une évaporation du solvant organique à l'aide d'un évaporateur rotatif à une vitesse 235 rpm pendant 1h. Un film lipidique se forme au niveau de la paroi du ballon. Alors 1 mL de tampon phosphate est rajouté pour hydrater le film et former des liposomes multilamellaires. Cette solution est soniquée dans un bain à sonication pendant 30-45 min puis extrudée 27 fois à travers un filtre en polycarbonate de porosité définie (400, 600 ou 800 nm). Une fois la taille des liposomes vérifiée par mesure de DLS, la solution lipidique est diluée à une concentration de 2 mM. Une fois les 4h écoulées, les membranes sont rincées avec de l'eau ultra pure MilliQ, et la solution de liposomes préparée est déposée pendant 16h sur la plaque à agitation rotative à 50 rpm. Une étape de rinçage par la suite est nécessaire afin d'enlever l'excès de lipides déposés sur le polymère. La membrane est ainsi prête à l'utilisation pour le test Néo-PAMPA.

3.2.2.2 Test Néo-PAMPA

La plaque utilisée pour le test renferme 12 puits. Le schéma suivant illustre le déroulement de l'expérience :

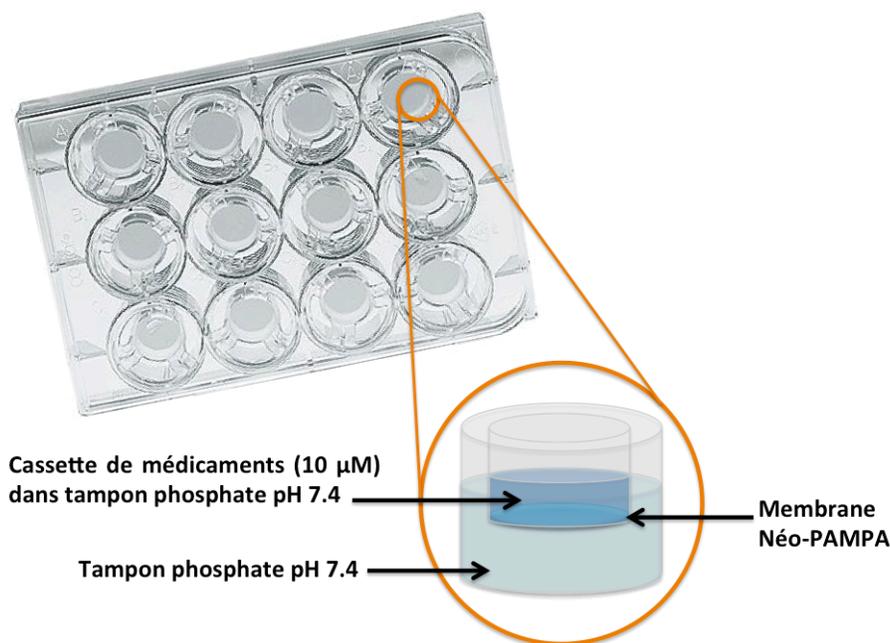


Figure 3. 1: Schéma explicatif du dispositif du Néo-PAMPA.

Un volume de 0,5 mL de la cassette de médicaments est déposé du côté apical (compartiment donneur). Le côté basolatéral (compartiment accepteur) est rempli avec un tampon phosphate exempt des molécules à tester. Les expériences sont réalisées sous agitation grâce à une plaque à agitation rotative (50 rpm).

Un seul prélèvement de 200 μL du côté accepteur est réalisé à la fin de l'essai, c'est-à-dire au bout de 2h. Une quantification de cet échantillon (C_{final}) ainsi que de la concentration initiale de la cassette de médicaments (C_{initiale}) et du tampon présent dans le compartiment accepteur (C_0) est réalisée par LC-MS/MS (méthode développée au sein du laboratoire, résultats non publiés). Le calcul du coefficient de perméabilité P_{app} est réalisé grâce à un modèle mathématique basé sur une résolution analytique de la première loi de Fick (cf. section 2.2.2.4, équation 2.1).

3.2.2.3 Quantification de la DOPC présente dans la bicouche

La méthode utilisée pour vérifier la déposition de la bicouche est réalisée en quatre étapes : (1) exposer un filtre en polycarbonate non poreux à la suspension liposomale (cf section 2.1); (2) retirer le filtre de la suspension; (3) rincer deux fois à l'eau MilliQ afin d'enlever l'excès de

liposomes non déposés et enfin (4) rincer à l'acétonitrile afin de mettre en solution la bicouche lipidique déposée sur le filtre et déterminer la quantité de lipides recouvrant le filtre. Des prélèvements de ces rinçages sont analysés par LC-MS/MS (Figure 3.2).

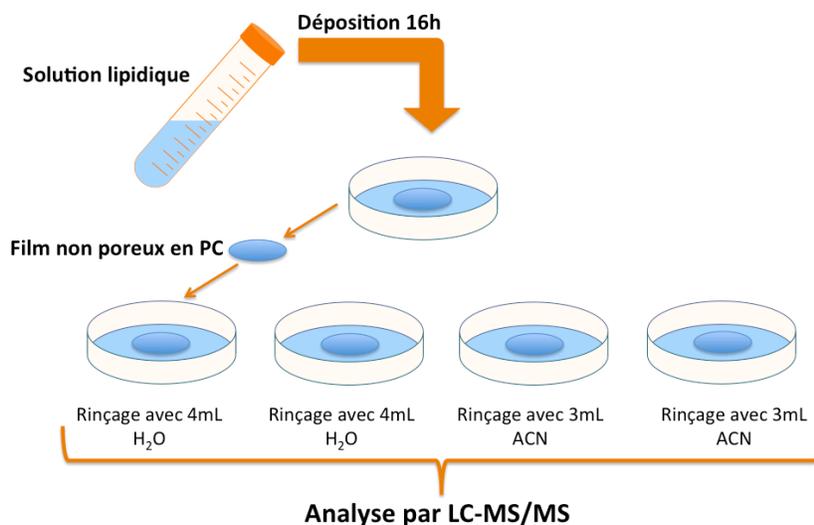


Figure 3. 2: Schéma explicatif des étapes de quantification de la DOPC.

3.3 Résultats

3.3.1 Tests de perméabilité Néo-PAMPA optimisé

Plusieurs tests de perméabilité Néo-PAMPA ont été effectués avec la cassette de médicaments. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.1.

Tableau 3. 1: Coefficients de perméabilité (P_{app}) obtenus avec le test Néo-PAMPA et de la littérature.

Composés	P_{app} expérimentale (10^{-5} cm/s)	P_{app} littérature (10^{-6} cm/s)	Références
Aténolol	27,72	0,06 - 2,75	[43, 52, 56, 57]
Furosemide	-	0,01 - 1,45	[43, 52, 54, 56]
Hydrochlorothiazide	-	0,01 - 1,82	[43, 52, 54, 56]
Verapamil	27,73	8,63 - 39,4	[43, 52-54]
Propranolol	25,69	3 - 39,8	[43, 52-55]
Antipyrine	32,03	0.7 - 2.87	[43, 52, 54, 56]
Carbamazepine	32,83	6,4 - 7,8	[52-54]
Ketoprofène	42,73	0,05 - 2,84	[43, 52, 54]

Les valeurs de P_{app} obtenues pour les différents médicaments testés sont quasiment similaires, et aucune corrélation avec les valeurs décrites dans la littérature n'est observée. Ces valeurs démontrent que la diffusion à travers notre membrane Néo-PAMPA est semblable à celle observée avec un filtre seul (sans polymère ni bicouche lipidique), ce qui suggère que notre bicouche lipidique n'est pas déposée correctement. Cette observation a été émise lors de la phase d'optimisation des composantes, ce qui nous amené à mettre en place une méthode de quantification de la DOPC afin de mettre en évidence la déposition de la bicouche sur nos filtres.

3.3.2 Quantification de la DOPC présente dans la bicouche

La quantification de la DOPC présente dans la bicouche déposée sur le film en polycarbonate a donné les valeurs présentées dans le Tableau 3.2. Les mesures ont été faites en triplicata (n=3).

Tableau 3. 2: Quantification de la DOPC sur la membrane néo-PAMPA par LC-MS

	Concentration diluée (μM)	Concentration (μM)	Quantité (nmole)
Solution liposomes	24,10 \pm 0,0	160,3 \pm 0,5	32
1 ^{er} rinçage H ₂ O	1,40 \pm 0,0	9,3 \pm 0,3	38
2 ^{ème} rinçage H ₂ O	0,100 \pm 0,0	0,90 \pm 0,0	3
1 ^{er} rinçage ACN	0,200 \pm 0,0	0,200 \pm 0,0	1
2 ^{ème} rinçage ACN	0	0	0

La suspension liposomale représente la suspension initiale qui a été utilisée pour la déposition de la bicouche. Elle renferme donc la quantité initiale de lipides qui a été utilisée (C_0). Une bicouche lipidique stable déposée sur le filtre devrait résister au lavage à l'eau, mais serait extraite par l'acétonitrile. Les quantités de lipides présentes dans l'eau correspondent à celles qui sont en excès alors que celles extraites avec l'acétonitrile correspondent à la quantité déposée sur le filtre.

Pour vérifier ces résultats, on calcule de façon théorique le nombre de moles de phospholipides qui devraient se déposer sur le film:

- Diamètre du film utilisé : 25 mm, soit une aire de $4,90 \text{ cm}^2 \approx 5 \text{ cm}^2 = 5 \times 10^{-4} \text{ m}^2$.
- Aire occupée par une tête polaire d'une phosphatidylcholine [63] : 57,6 à 70,9 Å². (Aire moyenne de $65 \text{ Å}^2 = 65 \times 10^{-20} \text{ m}^2$).

Pour recouvrir la surface totale du film, un nombre N de phospholipides est nécessaire pour

obtenir une monocouche, tel que $N = \frac{\text{Aire du film}}{\text{aire d'un phospholipide}}$;

D'où :

$$N = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{65 \cdot 10^{-20}}$$

Donc pour l'obtention d'une bicouche lipidique, un nombre de phospholipides équivalent à 2N est nécessaire. Si l'on désire connaître le nombre de moles de phospholipides déposés sur le film, on aura :

$$\text{Nombre de moles} = \frac{2N}{N_A}$$

avec N_A : Nombre d'Avogadro ($6,0221412 \times 10^{23}$ molécules \cdot mol⁻¹)

Le nombre de moles de phospholipides calculé est donc de 2,55 nmoles.

La concentration mesurée dans l'échantillon du premier rinçage à l'acétonitrile (0,235 μ M) correspond à une quantité déposée sur le filtre de 1 nmole. Cette quantité est du même ordre de grandeur que ce qui est déterminé théoriquement. Cependant, cette méthode, même si elle est caractérisée par une très basse limite de quantification (L_Q : 75 nM), ne constitue pas la meilleure alternative pour la quantification des lipides compte tenu de la faible quantité déposée sur le filtre comparée à la quantité totale utilisée.

3.4 Conclusion

Des tests pour l'évaluation de la perméabilité de la cassette de médicaments ont été réalisés en utilisant les paramètres optimisés lors du chapitre deux. Les résultats démontrent que la membrane ne permet pas encore une diffusion discriminatoire entre les composés appartenant aux quatre classes biopharmaceutiques. Ceci suggère que la bicouche n'est toujours pas bien déposée. D'autres travaux d'optimisation sont nécessaires.

Chapitre 4. Le test cellulaire Caco-2

4.1 Introduction

Le test Caco-2 considéré comme l'essai standard a été décrit dans la littérature depuis des décennies. Les molécules utilisées comme standard tout au long de notre projet ont déjà été testées et leurs perméabilités évaluées avec ce test. Toutefois, afin d'éviter les variations inter-laboratoires et mieux comprendre le fonctionnement de ce test, il était nécessaire de l'implémenter dans notre laboratoire et de générer nos propres valeurs de P_{app} , comparables à celles rapportées dans la littérature. En effet, une variation au niveau d'un paramètre tel que le volume des puits, le pH utilisé du côté apical ou basolatéral, la présence ou l'absence de BSA dans le milieu d'expérience, le nombre de prises d'échantillons ou toute autre modification affectant les conditions opératoires peut engendrer des différences significatives au niveau des résultats générés avec ce test.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Matériel

Les cellules Caco-2 ont été achetées chez ATCC (Manassas, USA). Elles ont été cultivées pendant plus de 4 semaines dans le milieu complet constitué de milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) additionné de 10% sérum fœtal bovin, 1% d'acides aminés non essentiels et de 1% de solution d'antibiotiques pénicilline-streptomycine (10 000 U/mL), tous acquis chez Invitrogen® (Burlington, Canada). Le test est réalisé dans des plaques de 12 puits stériles Costar avec des inserts composés de filtres en polycarbonate de porosité 400 nm, achetées chez Fisher Scientific (Pittsburgh, USA).

Le tampon utilisé pour le test est une solution saline équilibrée de Hanks (*Hanks balanced saline solution* HBSS) additionnée soit d'acide 2-morpholino-éthanesulfonique (MES) à 25 mM soit d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) à 25 mM achetés d'Invitrogen (Burlington, Canada) et Sigma Aldrich (Oakville, Canada) respectivement.

Les composés à tester sont préparés à partir de solutions stock à 20 mM dans du DMSO et dilués dans les milieux d'essai (HBSS) correspondant.

4.2.2 Méthodes

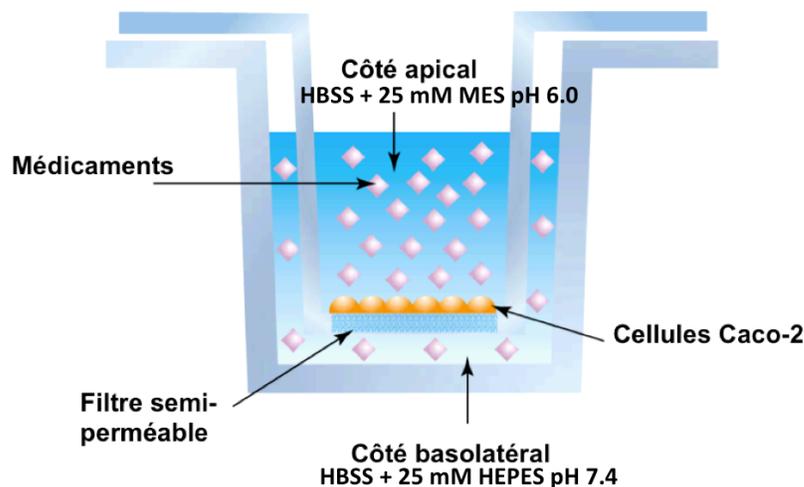


Figure 4. 1: Schéma du test de perméabilité cellulaire Caco-2.

Adapté avec permission [64]

4.2.2.1 Préparation des solutions stock des composés à tester

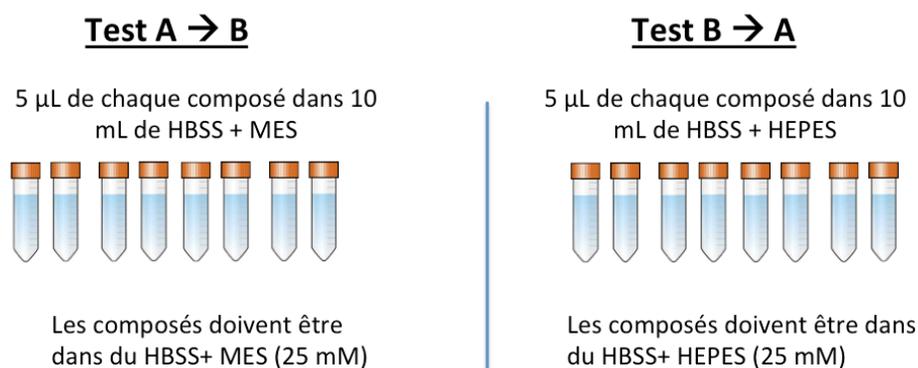
Les huit composés à tester sont les mêmes que ceux employés pour le Néo-PAMPA, à savoir : l'antipyrine, le kétoprofène, le verapamil, le carbamazépine, le propranolol, l'aténolol, le furosémide et l'hydrochlorothiazide (cf tableau 2.2 de la section 2.1).

4.2.2.1.1 Pour la perméabilité de A vers B

À partir d'une solution stock de 20 mM dans du DMSO, le composé est dilué dans du HBSS additionné de 25 mM de MES à pH 6.0 pour atteindre une concentration maximale de 10 μ M sans dépasser les 0,2% DMSO dans le volume total. Les composés sont soniqués pendant 15 min dans un bain à soniquer puis filtrés à travers un filtre en PVDF d'une porosité de 0,2 μ m. Les vials sont enfin placés dans un incubateur à 37°C pour être équilibrés.

4.2.2.1.2 Pour la perméabilité de B vers A

À partir d'une solution stock de 20 mM dans du DMSO, le composé est dilué dans du HBSS additionné de 25 mM de HEPES à pH 7,4 pour atteindre une concentration maximale de 10 μ M et ne pas dépasser les 0,2% de DMSO dans le volume total. Les composés sont soniqués pendant 15 min puis filtrés à travers un filtre en PVDF d'une porosité de 0,2 μ m. Les vials sont enfin placés dans un incubateur à 37°C pour être équilibrés.



- Concentration de chaque composé (10 μ M) à partir de solutions stock de 20 mM dans du DMSO.
- Chaque composé doit être filtré à travers un filtre en PVDF stérile (0.2 μ m) (Whatman)

Figure 4. 2: Schéma récapitulatif de la préparation des échantillons à tester.

4.2.2.2 Préparation des plaques

Le milieu de culture présents dans les deux compartiments est aspiré (le côté basolatéral ensuite le côté apical), puis remplacé avec du milieu HBSS préchauffé (1,5 mL du côté basolatéral et 0,5 mL du côté apical) afin de rincer les cellules et enlever toute trace du rouge phénol issu du milieu DMEM. Les plaques ensuite sont placées dans un incubateur à 37°C pendant 5 min. Entre temps, les puits d'une nouvelle plaque de 12 puits sont remplis avec 1,5 mL de HBSS et 25 mM HEPES pH 7,4. Après 5 min, les plaques sont retirées de l'incubateur, le HBSS est aspiré des deux compartiments et les inserts sont transférés dans les nouvelles plaques. Enfin, un volume de 0,5 mL de HBSS et 25 mM de MES à pH 6,0 sont ajoutés du côté apical. Les plaques sont remises dans l'incubateur à 37°C pour équilibrer.

4.2.2.2.1 Préparation du blanc

Un échantillon de 0,2 mL est retiré du côté accepteur, placé dans la plaque de LC-MS/MS et remplacé par 0,2 mL du milieu approprié (selon le type de transport étudié).

4.2.2.2.2 Début de l'expérience

Au début de l'expérience, le milieu du compartiment donneur est aspiré et remplacé avec 0,5 mL (si côté apical) ou 1,5 mL (si côté basolatéral) avec les solutions appropriées de HBSS préchauffé contenant les composés à tester. Le test se fait sur une durée de 3h à 37°C sous une faible agitation à 50 rpm. 200 µL de chacun de ces échantillons contenant les composés à tester sont placés dans la plaque de LC-MS/MS comme étant les concentrations initiales (C_0).

4.2.2.3 Prélèvement des échantillons

La collecte des échantillons se fait à temps 1h, 2h et 3h pour chaque composé. À ces temps donnés, un volume de 0,5 mL est prélevé (du côté basolatéral si le transport se A vers B) et ensuite remplacé par un 0,5 mL du milieu HBSS + 25 mM HEPES. Si le transport se fait de B vers A, un volume de 0,2 mL est retiré du côté apical puis remplacé par un 0,2 mL du milieu HBSS + 25 mM MES. Les échantillons sont placés dans la plaque de 96 puits avec le reste des échantillons à analyser. Il est important de bien homogénéiser les prélèvements pour s'assurer de l'exactitude des données. Une fois l'expérience terminée, un dernier prélèvement est effectué dans chacun des compartiments donneurs afin de s'assurer, lors des calculs, que toute la quantité initiale de médicaments est retrouvée. Tous les prélèvements depuis la plaque de 96 puits sont additionnés de 15% de standard interne (le labetalol) dilué dans une phase organique, soit un mélange d'acétonitrile contenant 0,2% d'acide formique (méthode d'analyse développée par une étudiante au même laboratoire).

4.2.2.4 Calcul de la perméabilité

La perméabilité est calculée comme suit :

$$P_{app} = \frac{\text{Débit apparent dans le compartiment receveur}}{\text{Surface} \times 60 \times \text{aire de la solution stock}} \quad (4.1)$$

Où :

- Surface : 1,12 cm²
- 60 : facteur de conversion de minutes à secondes
- Aire de la solution stock (aire/mL)

4.3 Résultats

Chaque composé a été testé en triplicata ($n=3$) et tous les échantillons ont été analysés par LC-MS/MS avec une méthode développée au laboratoire. Les coefficients de perméabilité apparente ont pu être calculés grâce à l'équation 4.X. Le Tableau 4.1 regroupe les valeurs expérimentales obtenues de la perméabilité apparente (P_{app}) et ceci pour le transport absorptif (de A vers B) et le transport sécrétoire (de B vers A).

Tableau 4. 1: Valeurs expérimentales de perméabilité apparente obtenues pour le test Caco-2.

Composés	A vers B (10⁻⁶ cm/s)	B vers A (10⁻⁶ cm/s)	Rapport des P_{app} (A vers B / B vers A)
Atenolol	0,52	0,52	1,00
	0,47	0,55	0,85
	0,26	0,58	0,45
Antipyrine	27,18	27,17	1,00
	28,82	22,97	1,25
	24,79	26,58	0,93
Carbamazépine	21,76	30,52	0,71
	23,20	29,71	0,78
	24,24	31,33	0,77
Furosémide	0,77	9,43	0,08
	0,88	10,19	0,09
	0,92	10,01	0,09
Hydrochlorothiazide	0,93	1,02	0,91
	0,60	1,08	0,56
	0,97	1,14	0,85
Ketoprofène	21,16	3,12	6,78
	29,03	3,55	8,18
	25,45	3,44	7,40
Propranolol	4,28	62,24	0,07
	3,64	63,04	0,06
	5,77	62,73	0,09
Vérapamil	3,06	51,70	0,06
	2,54	54,45	0,05
	3,69	55,11	0,07

Le ratio entre les valeurs des perméabilités a également été calculé pour des fins de comparaison. Ces valeurs expérimentales ont été par la suite comparées aux valeurs retrouvées dans la littérature. Le tableau 4.2 ci-dessous illustre cette comparaison.

Tableau 4. 2: Comparaison des coefficients de perméabilité apparente (P_{app}) expérimentaux et théoriques obtenus avec le test Caco-2.

Composés	P_{app} expérimentale A vers B (10^{-6} cm/s)	P_{app} expérimentale B vers A (10^{-6} cm/s)	Intervalle P_{app} théorique A vers B (10^{-6} cm/s)	Références
Atenolol	$0,42 \pm 0,1$	$0,55 \pm 0,0$	0-0,42	[19, 43, 65, 66]
Antipyrine	$26,93 \pm 2,0$	$25,57 \pm 2,3$	12-33,1	[19, 43, 65]
Carbamazépine	$23,07 \pm 1,2$	$30,52 \pm 0,8$	15	[43]
Furosemide	$0,86 \pm 0,1$	$9,88 \pm 0,4$	0,08-0,11	[19, 43, 65]
Hydrochlorothiazide	$0,83 \pm 0,2$	$1,08 \pm 0,1$	0,42-0,75	[19, 43, 65, 66]
Ketoprofène	$25,21 \pm 3,9$	$3,37 \pm 0,2$	20	[43]
Propranolol	$4,56 \pm 1,1$	$62,67 \pm 0,4$	3,30-41,90	[19, 43, 66]
Vérapamil	$3,10 \pm 0,6$	$53,75 \pm 1,8$	2,40	[43]

Les valeurs expérimentales de la perméabilité apparente obtenues avec le test Caco-2 se retrouvent dans les intervalles théoriques rapportés dans la littérature. Les composés ayant une faible perméabilité apparente se retrouvent en effet avec des valeurs inférieures à 10^{-6} cm/s comme pour le furosémide et l'hydrochlorothiazide, alors que les composés à haute perméabilité comme l'antipyrine possèdent des P_{app} largement supérieurs. Ce test a également comme avantage de mettre en évidence le transport absorptif de certains composés (du côté basolatéral vers le côté apical). Des médicaments qui sont sujets à des transporteurs comme le vérapamil se distinguent par un coefficient P_{app} de B vers A très élevé ($53,8 \cdot 10^{-6}$ cm/s). La comparaison des résultats obtenus avec ceux de la littérature confirme la bonne implémentation du test au sein de notre laboratoire. Ces valeurs peuvent être utilisées par la suite comme référence pour les valeurs de perméabilité obtenues avec le Néo-PAMPA afin d'éviter les variations inter-laboratoires.

Chapitre 5. Discussion et conclusion

5.1 Optimisation des composantes de la membrane PAMPA

Les différents tests réalisés et qui sont décrits dans le premier chapitre ont permis de sélectionner des paramètres favorables à la préparation de la nouvelle membrane PAMPA. Le choix de ces paramètres a été appuyé par une revue exhaustive de la littérature scientifique pour justifier les différentes orientations prises. Dans un premier temps, un filtre en polycarbonate a été choisi car non seulement il ne constituait pas une barrière à la diffusion des médicaments, mais également se démarquait des autres filtres par sa facilité d'utilisation et son prix abordable. Ensuite, une déposition de 4 heures du coussin de polydopamine sans emploi d'un surfactant (Tween-80) a été considérée optimale étant donné l'objectif de ce coussin d'apporter un caractère fluide à la membrane sans obstruer les pores des filtres ni modifier la topographie de ces derniers. La bicouche lipidique est composée d'un mélange de DOPC et cholestérol additionné d'un antioxydant (BHA). Étant donné que la DOPC est caractérisée par une température de transition gel-liquide cristalline de -16.5°C , l'expérience peut se dérouler à température ambiante tout en s'assurant que la DOPC est en phase fluide. Le cholestérol, quant à lui, est une composante essentielle des membranes biologiques participant à leur fluidité. Sa présence en grande quantité dans la préparation de la bicouche augmenterait la rigidité de la membrane modèle. La bicouche lipidique est obtenue par fusion de liposomes pendant 16h sur le support solide recouvert de polydopamine. Ces liposomes sont préparés avec la méthode « film lipidique » qui permet non seulement de travailler à faible volume, mais aussi de mieux contrôler la taille des liposomes formés. Le test PAMPA se fait sur 2 heures avec une agitation de 50 rpm et à une température de 37°C afin de se rapprocher des conditions réelles des intestins humains. Tout ceci nous amène à une première version du test néo-PAMPA.

5.2 Première version du test Néo-PAMPA

Les résultats obtenus avec le test Néo-PAMPA montrent qu'il n'est pas encore discriminatif. En effet, la nouvelle membrane laisse diffuser les composés avec des coefficients de perméabilité quasi-similaires (277×10^{-6} à 427×10^{-6} cm/s), indépendamment de leurs classes SCB et, donc, de leurs perméabilités décrites dans la littérature. Ces résultats, combinés avec ceux des différents tests d'optimisation, nous laissent croire que la bicouche lipidique présente une défaillance au niveau de deux aspects, à savoir :

- Le recouvrement du coussin de polydopamine par la bicouche n'est pas complet;
- La bicouche n'est pas assez stable dans le temps.

Le premier aspect n'a pas pu être convenablement évalué étant donné que la quantification de la DOPC s'est avérée inappropriée comme méthode compte tenu de la faible quantité déposée sur le filtre en comparaison avec la quantité totale utilisée. D'autres méthodes de vérification de la déposition de la bicouche sont donc nécessaires. Parmi ces méthodes, l'utilisation d'un lipide fluorescent dans la composition lipidique pourrait être une alternative intéressante dans la mesure où il serait possible de visualiser rapidement la déposition par microscopie à fluorescence (vérification qualitative). Des tests préliminaires avec le phospholipide fluorophore *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadécanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine (NBD-PE) ont été réalisés et semblent prometteurs, mais ont besoin davantage d'optimisation au niveau de la composition. Une autre méthode pour la quantification de la bicouche serait d'employer la simulation moléculaire dynamique pour la détermination de l'aire recouverte par le mélange phospholipidique utilisé [67] ou encore tout simplement des mesures de la résistance électrique.

Le deuxième aspect, soit la stabilité de la bicouche en fonction du temps, peut être la résultante de plusieurs paramètres :

- *La composition lipidique :*

Rappelons brièvement que la suspension lipidique utilisée pour le test néo-PAMPA est composée de 2 mM de DOPC avec 5% de cholestérol (p/p) et 0,01% de BHA. Ce pourcentage de cholestérol a déjà été rapporté dans la littérature mais semble être faible dans le cas de notre membrane. En effet, les membranes biologiques sont connues pour avoir des ratios lipidiques

qui peuvent varier selon la portion dans laquelle ils se trouvent dans les intestins. Si on prend le cas de la lumière intestinale, ce rapport est de 1 :1 :1 pour les sphingolipides, phosphoglycérides et cholestérol respectivement, alors que dans les régions où la membrane est soumise à de très faibles perturbations, ce ratio est de 0,5 :1.5 :1 pour ces trois composantes [7]. On peut alors penser que le pourcentage utilisé du cholestérol peut être augmenté afin d'améliorer la fluidité de la bicouche. En effet, des études ont montré que la présence de cholestérol dans la composition de la suspension liposomale aide à améliorer la continuité de la bicouche formée et qu'un ratio de 50% mol/mol de cholestérol dans la formulation liposomale est optimal, améliore la stabilité et réduit la perméabilité à travers la bicouche lipidique [68]. Toutefois, la présence du cholestérol dans les mélanges lipidiques pour la préparation de membranes artificielles crée un état « intermédiaire » chez les phospholipides avec lesquels il interagit. Il condense la bicouche, diminuant ainsi la perméabilité de la membrane et en augmentant l'épaisseur de la bicouche [69] [70]. Un autre effet de la présence du cholestérol dans la composition lipidique est qu'il augmente la condensation de la bicouche formée [67].

Une deuxième alternative serait de rajouter des sphingolipides à la composition lipidique. En effet, il s'agit d'un des trois lipides les plus importants dans la composition des membranes biologiques. Son abondance confère à cette dernière une grande stabilité qui est la résultante des liaisons hydrogènes des groupements -OH qu'il présente en plus des liaisons van der Waals et les forces hydrophobiques existantes entre le cholestérol et les sphingolipides [70].

Si notre choix de la composition lipidique renferme le mélange DOPC/ cholestérol/ sphingolipides, le cholestérol aura tendance à mieux interagir avec les sphingolipides (sphingomyéline) qu'avec les phosphatidylcholines étant donné que le taux de sa désorption d'une bicouche contenant des sphingolipides est nettement plus faible que celui d'une bicouche contenant des phosphatidylcholines (PC) [70]. L'organisation au niveau de la bicouche se fera de sorte que les sphingolipides s'organiseront dans la monocouche supérieure alors que les PC s'organiseront dans la monocouche inférieure [71].

– *La méthode de déposition de la bicouche :*

La méthode de fusion de vésicules a été utilisée tout au long du projet, avec ou sans agitation. Aucune différence n'a été observée. Si on considère les différents résultats mentionnés ci-haut

et qu'aucune amélioration au niveau de la perméabilité n'est noté, il faudrait changer la méthode de déposition et opter pour le recrutement des liposomes grâce à la fonctionnalisation du support solide recouvert de polydopamine avec des groupements thiols. Ceci permettra la mise en place de liaisons stables au cours du temps qui peuvent être évaluées avec la mesure d'impédance. Il existe également d'autres méthodes de déposition de la bicouche telles que la déposition d'une monocouche d'acide 3-mercaptopropionique (MPA) chargée négativement. Les liposomes chargés positivement viendront se déposer et fusionner spontanément pour former une bicouche stable. Si les liposomes sont chargés positivement, leur déposition est facilitée par la présence d'ions calcium [72]. Des tests de perméabilité seront nécessaires tout au long des étapes d'optimisation pour s'assurer de la bonne implémentation et reproductibilité du test.

5.3 Le test cellulaire Caco-2

Pendant plus d'une décennie, le test Caco-2 a été considéré comme outil de prédiction fiable lors des premières phases d'optimisation et développement du médicament. Toutefois, étant donné qu'il s'agit d'un test basé sur la diffusion à travers une monocouche de cellules cancéreuses de colon, les résultats générés peuvent être sujets à des variations inter-laboratoires dépendamment des propriétés biologiques (nombre de passage, concentration en cellules). Également, la méthode de calcul de la perméabilité ainsi que les paramètres à considérer lors de ce calcul peuvent affecter les résultats. À titre d'exemple, l'utilisation d'un pH de 6,0 de part et d'autre des côtés apical et basolatéral réduit de 50% les coefficients de perméabilité du propranolol lorsque l'essai est réalisé du côté basolatéral vers le côté apical, mais double leur valeur lorsque l'essai est du côté apical vers le côté basolatéral, comparativement à l'utilisation d'un gradient de pH de 6,0-7,4.

Le test Caco-2 a été mis en place avec succès et est maintenant utilisé de façon routinière par la plateforme de biopharmacie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal. Afin d'assurer la robustesse de ce test, différents contrôles ont été mis en place. Leurs valeurs de perméabilité, comparables à celles décrites dans la littérature, confirment le succès de l'implémentation.

5.4 Conclusion

Au cours de ce projet de recherche, l'obtention d'une membrane structurée pour un nouveau test appelé néo-PAMPA a été au cœur des objectifs de plusieurs travaux d'optimisation et d'évaluation de la perméabilité effectués. Les objectifs qui ont été atteints sont :

- L'identification du filtre poreux optimal comme support solide pour la membrane
- La déposition du coussin de polymère
- La préparation des liposomes
- La réalisation du test cellulaire Caco-2

Pour ce qui est des autres objectifs, un progrès important a été réalisé, mais des travaux supplémentaires seraient nécessaires afin d'aboutir au résultat désiré, à savoir une membrane PAMPA capable de représenter la diffusion passive des composés testés et de fournir une corrélation avec les données *in vivo*. Les travaux restants concernent l'optimisation de la bicouche lipidique. Une fois la bicouche bien structurée et stable, il sera possible de réaliser les tests de perméabilité et de comparer les valeurs obtenues avec celles générées pour le test Caco-2 et PAMPA traditionnel afin d'avoir une corrélation pertinente entre les différentes données.

À plus long terme, il s'agit d'un test qui sera utilisé pour le criblage à haut débit au cours des phases précliniques du développement du médicament. La dernière phase de ce projet constituait la miniaturisation du dispositif afin d'en créer une d'utilisation facile dans différents laboratoires. Dans le cas échéant, tous nos travaux ont été réalisés selon cette optique : le dispositif utilisé est déjà miniaturisé et les tests d'optimisation tendent à développer un test à la fois rapide, simple et pertinent en termes de résultats. Un autre aspect qui peut émerger du Néo-PAMPA serait la fabrication et la commercialisation de la nouvelle membrane à plus grande échelle, ce qui la rendra accessible et disponible pour les laboratoires de recherche ou les compagnies pharmaceutiques désirant exploiter cette nouvelle version du test PAMPA.

Une fois que la version du test Néo-PAMPA sera mise au point, d'autres versions pourraient voir le jour et pourront cibler d'évaluation de la perméabilité d'autres organes tels que la

perméabilité nasale, ou la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (nouvelle version du PAMPA-BBB). Ce test, décrit initialement par Di et coll. [73], utilise comme lipides des extraits de tissus de cerveau de porc dissous dans du n-dodécane 2% (p/v) comme modèle lipidique afin de différencier entre les composantes qui peuvent accéder au système nerveux central de celles qui sont incapables, comme c'est le cas dans le modèle biologique.

Bibliographie

1. Kneller, R., *The importance of new companies for drug discovery: origins of a decade of new drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(11): p. 867- 882.
2. Science kids. *Human body images*. 2013; Available from: <http://www.sciencekids.co.nz/pictures/humanbody/gastrointestinaltract.html>.
3. Windelspecht, M., *The digestive system*. 2004: Greenwood Press.
4. Heath, J.K., *Chapter Four - Transcriptional networks and signaling pathways that govern vertebrate intestinal development*, in *current topics in developmental biology*, K. Peter, Editor 2010, Academic Press. p. 159-192.
5. Kerns, E.H. and L. Di, *Chapter 9: Transporters*, in *Drug-like properties: Concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization* 2008, Elsevier Inc.
6. Nelson, W.J., *Cell biology: A cellular choreographer*. Nature, 2004. **428**(6978): p. 28-29.
7. Lodish, H., et al., *Biologie moléculaire de la cellule* 2005: De Boeck Supérieur.
8. Sackmann, E., *Supported membranes: Scientific and practical applications*. Science, 1996. **271**(5245): p. 43-48.
9. Anderson, T.H., et al., *Formation of supported bilayers on silica substrates*. Langmuir, 2009. **25**(12): p. 6997-7005.
10. Murray, D.H., L.K. Tamm, and V. Kiessling, *Supported double membranes*. Journal of Structural Biology, 2009. **168**(1): p. 183-189.
11. Cooper, M.A., *Optical biosensors in drug discovery*. Nature Review Drug Discovery, 2002. **1**(7): p. 515-528.
12. Motomu, T. and S. Erich, *Polymer-supported membranes as models of the cell surface*. Nature, 2005. **437**(7059): p. 656-663.
13. Nirasay, S., et al., *Supported bilayer on a nanopatterned membrane as model PAMPA membranes*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **421**(1): p. 170-175.
14. Ku, M.S., *Use of the biopharmaceutical classification system in early drug development*. The AAPS Journal, 2008. **10**(1): p. 208-212.
15. Ashford, M., *Assessment of biopharmaceutical properties*, in *Aulton's Pharmaceutics: The design and manufacture of medicines*, M.E. Aulton, Editor 2007. p. 308-313.
16. Lindenberg, M., S. Kopp, and J.B. Dressman, *Classification of orally administered drugs on the world health organization omdel list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **58**(2): p. 265-278.
17. Faller, B., *Artificial Membrane Assays to Assess Permeability*. Current Drug Metabolism, 2008. **9**(9): p. 886-892.
18. Fortuna, A., et al., *Optimization of a parallel artificial membrane permeability assay for the fast and simultaneous prediction of human intestinal absorption and plasma protein binding of drug candidates: Application to dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide derivatives*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. **101**(2): p. 530-540.

19. Zhu, C., et al., *A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2002. **37**(5): p. 399-407.
20. Ong, S., H. Liu, and C. Pidgeon, *Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability*. Journal of Chromatography A, 1996. **728**(1-2): p. 113-128.
21. Valko, K., et al., *Rapid-gradient HPLC method for measuring drug interactions with immobilized artificial membrane: Comparison with other lipophilicity measures*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000. **89**(8): p. 1085-1096.
22. Kaliszan, R., *Chromatography and capillary electrophoresis in modelling the basic processes of drug action*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1999. **18**(6): p. 400-410.
23. Mannhold, R., et al., *Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **98**(3): p. 861-893.
24. Clarke, L.L., *A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine*. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 2009. **296**(6): p. G1151-G1166.
25. Fagerholm, U., M. Johansson, and H. Lennernäs, *Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum*. Pharmaceutical Research, 1996. **13**(9): p. 1336-1342.
26. Yang, Y. and L.X. Yu, *Chapter 12 - Oral drug absorption, evaluation, and prediction, in developing solid oral dosage forms*, Q. Yihong, et al., Editors. 2009, Academic Press: San Diego. p. 289-308.
27. Hidalgo, I.J. and R.T. Borchardt, *Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1990. **1028**(1): p. 25-30.
28. Avdeef, A., *The rise of PAMPA*. Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology, 2005. **1**(2): p. 325-342.
29. Hubatsch, I., E.G.E. Ragnarsson, and P. Artursson, *Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers*. Nature protocols, 2009. **2**(9): p. 2111-2119.
30. Anna-Lena Ungell, J.K., *Cell cultures in drug discovery: An industrial perspective, in Drug bioavailability: Estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability*, H.L. Han van de Waterbeemd, Per Artursson, Editor 2003. p. 90-131.
31. Irvine, J.D., et al., *MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999. **88**(1): p. 28-33.
32. Kansy, M., F. Senner, and K. Gubernator, *Physicochemical high throughput screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the description of passive absorption processes*. Journal of Medicinal Chemistry, 1998. **41**(7): p. 1007-1010.
33. Faller, B. and F. Wohnsland, *Physicochemical parameters as tools in drug discovery and lead optimization, in Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*, H.v.d.W. Bernard Testa, Gerd Folkers, Richard Guy, Editor 2001, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich and Wiley. p. 257-274.

34. Avdeef, A., *High-throughput measurements of solubility profiles*, in *Pharmacokinetic optimization in drug research*, H.v.d.W. Bernard Testa, Gerd Folkers, Richard Guy, Editor 2001, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich and Wiley. p. 305-326.
35. Avdeef, A., et al., *Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes: 2. Studies of the permeability properties of lactones in Piper methysticum Forst.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **14**(4): p. 271-280.
36. Avdeef, A., *Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state.* 2003: John Wiley & Sons, Inc.
37. Ruell, J.A., K.L. Tsinman, and A. Avdeef, *PAMPA—a drug absorption in vitro model: 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and pKaflux—optimized design (pOD-PAMPA).* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **20**(4–5): p. 393-402.
38. Lenhart, S., et al., *Massively parallel dip-pen nanolithography of heterogeneous supported phospholipid multilayer patterns.* Small, 2007. **3**(1): p. 71-75.
39. Wohnsland, F. and B. Faller, *High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes.* Journal of Medicinal Chemistry, 2001. **44**(6): p. 923-930.
40. Sugano, K., et al., *Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay.* International Journal of Pharmaceutics, 2001. **228**(1–2): p. 181-188.
41. Avdeef, A. and O. Tsinman, *PAMPA—A drug absorption in vitro model: 13. Chemical selectivity due to membrane hydrogen bonding: In combo comparisons of HDM-, DOPC-, and DS-PAMPA models.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. **28**(1–2): p. 43-50.
42. Avdeef, A., et al., *Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA method.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **24**(4): p. 333-349.
43. Kerns, E.H., et al., *Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004. **93**(6): p. 1440-1453.
44. Mouritsen, O.G., *Life - As a matter of fat: The emerging science of lipidomics* 2005: Springer.
45. Whatman, *Nuclepore Track-Etched Membranes*, in <http://www.whatman.com/NucleporeTrackEtchedMembranes.aspx>, Whatman, Editor 2007.
46. Whatman, *Anopore Inorganic Membranes (Anodisc)*, in <http://www.whatman.com/PRODAnoporeInorganicMembranes.aspx>, Whatman, Editor 2007.
47. EMD Millipore Corporation, *Durapore Membrane Filter* in <http://www.millipore.com/catalogue/item/GVWP2932A>, Millipore, Editor.
48. Lee, H., et al., *Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings.* Science, 2007. **318**(5849): p. 426-430.
49. Flaten, G.E., et al., *Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier: 4. The effect of tensides, co-solvents and pH changes on barrier integrity and on drug permeability.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **34**(2–3): p. 173-180.
50. Sigma-Aldrich, *Polysorbate 80*, Sigma-Aldrich, Editor 2013.

51. Nardone, G., et al., *Phospholipid composition of human gastric mucosa: a study of endoscopic biopsy specimens*. Gut, 1993. **34**(4): p. 456-460.
52. CHEN, X., et al., *A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model*. Vol. 25. 2008, New York, NY, ETATS-UNIS: Springer. 10.
53. Liu, H., et al., *In vitro permeability of poorly aqueous soluble compounds using different solubilizers in the PAMPA assay with liquid chromatography mass spectrometry detection*. Pharmaceutical Research, 2003. **20**(11): p. 1820-1826.
54. Fujikawa, M., et al., *Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: Application to prediction of Caco-2 cell permeability*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005. **13**(15): p. 4721-4732.
55. Wohnsland, F. and B. Faller, *High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes*. J Med Chem, 2001. **44**(6): p. 923-930.
56. Avdeef, A., et al., *PAMPA—critical factors for better predictions of absorption*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(11): p. 2893-2909.
57. Flaten, G.E., et al., *Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. **27**(1): p. 80-90.
58. EMD Millipore Corporation, *Non-cell-based Assays for Drug Transport*, Millipore, Editor 2013: <http://www.millipore.com/catalogue/module/C7702>.
59. Corning Incorporated, *12 mm Transwell with 0.4µm Pore Polycarbonate Membrane Insert*, Corning, Editor 2013: [http://catalog2.corning.com/Lifesciences/en-US/Shopping/ProductDetails.aspx?productid=3401\(Lifesciences\)&categoryname=](http://catalog2.corning.com/Lifesciences/en-US/Shopping/ProductDetails.aspx?productid=3401(Lifesciences)&categoryname=).
60. Bucak, S., et al., *Dynamics of supported lipid bilayer deposition from vesicle suspensions*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **348**(2): p. 608-614.
61. Richter, R.P., R. Bérat, and A.R. Brisson, *Formation of solid-supported lipid bilayers: An integrated view*. Langmuir, 2006. **22**(8): p. 3497-3505.
62. Zhou, S., et al., *Spherical bilayer vesicles of fullerene-based surfactants in water: A laser light scattering study*. Science, 2001. **291**(5510): p. 1944-1947.
63. Thurmond, R.L., S.W. Dodd, and M.F. Brown, *Molecular areas of phospholipids as determined by 2H NMR spectroscopy. Comparison of phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines*. Biophysical Journal, 1991. **59**(1): p. 108-113.
64. Li, A.P., *Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery*. Drug Discovery Today, 2001. **6**(7): p. 357-366.
65. Yamashita, S., et al., *Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000. **10**(3): p. 195-204.
66. Ren, S. and E.J. Lien, *Caco-2 cell permeability vs human gastro-intestinal absorption: QSPR analysis*. Progress in Drug Research, 2000. **54**: p. 1-23.
67. Alwarawrah, M., J. Dai, and J. Huang, *A molecular view of the cholesterol condensing effect in DOPC lipid bilayers*. The Journal of Physical Chemistry B, 2010. **114**(22): p. 7516-7523.
68. Ali, M.H., et al., *The role of lipid geometry in designing liposomes for the solubilisation of poorly water soluble drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. **453**(1): p. 225-232.

69. Filippov, A., G. Orädd, and G. Lindblom, *The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers*. *Biophysical Journal*, 2003. **84**(5): p. 3079-3086.
70. Ohvo-Rekilä, H., et al., *Cholesterol interactions with phospholipids in membranes*. *Progress in Lipid Research*, 2002. **41**(1): p. 66-97.
71. Szoka, F. and D. Papahadjopoulos, *Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (Liposomes)*. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 1980. **9**(1): p. 467-508.
72. Steinem, C., et al., *Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: a scrutiny of different preparation techniques*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1996. **1279**(2): p. 169-180.
73. Di, L., et al., *High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2003. **38**(3): p. 223-232.

