

Université de Montréal

**Validation et conditionnement d'un test PAMPA amélioré
pour l'évaluation de la perméabilité membranaire de
médicaments**

par
Marie-Eve Leclaire

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté de Pharmacie
en vue de l'obtention du grade de maître
en sciences pharmaceutiques
option technologie pharmaceutique

juillet, 2014

© Marie-Eve Leclaire, 2014

Résumé

Les tests PAMPA et les tests Caco-2 sont des essais *in vitro* de l'évaluation de la perméabilité intestinale des médicaments. Ils sont réalisés lors de la phase de découverte du médicament. Les tests PAMPA ne sont pas biologiquement représentatifs de la paroi intestinale, mais ils sont rapides et peu coûteux. Les tests Caco-2 nécessitent plus de 21 jours pour la culture cellulaire et des installations spécifiques sont requises. Ils sont constitués d'une monocouche d'entérocytes à confluence et donc plus biologiquement représentatifs. Il y a un besoin pour le développement d'un essai qui est biologiquement représentatif de la membrane intestinale humaine, rapide et peu coûteux. Le premier but de ce projet était de développer une méthode analytique qui permettrait l'évaluation simultanée de huit médicaments témoins utilisés pour la validation de l'essai de perméabilité. Le deuxième but de ce projet était donc d'améliorer la membrane des tests PAMPA pour proposer un nouveau test : le néoPAMPA. Contrairement au test PAMPA traditionnel, cette membrane est constituée de trois composantes : (1) un filtre poreux qui agit à titre de support, (2) un coussin polydopamine chargé négativement qui sert d'ancrage et qui assure la fluidité de la bicouche et (3) une bicouche lipidique formée par fusion de vésicules.

Une méthode analytique HPLC-MS/MS a été validée selon les spécifications de la FDA et de la EMA. Cette méthode a permis de quantifier simultanément les huit médicaments standards utilisés pour le test néoPAMPA. Le test PAMPA traditionnel a été mis en place à titre d'essai control. Les coefficients de perméabilité mesurés pour les huit médicaments au travers de la membrane PAMPA comparaient favorablement aux résultats de la littérature. Les composantes de la membrane néoPAMPA ont été optimisées. Les conditions optimales retenues étaient les filtres de polycarbonate hydrophile ayant des pores de 15 nm, les plaques Costar 12 puits comme dispositif des tests de perméabilité, une bicouche lipidique composée de 70 % DOPC et de 30 % cholestérol cationique ainsi qu'une déposition des liposomes en présence de 150 mM NaCl suivi d'un équilibre d'1 h en présence d'une solution saturée en DOPC. Les stabilités de la cassette de médicaments et des liposomes sont insuffisantes pour le conditionnement commercial des membranes néoPAMPA.

Les différentes optimisations réalisées ont permis d'améliorer la membrane néoPAMPA sans toutefois la rendre fonctionnelle. La membrane néoPAMPA n'est toujours pas en mesure de discriminer des molécules en fonction de leur perméabilité attendue.

Mots-clés : PAMPA, perméabilité, polydopamine, bicouche lipidique, HPLC-MS/MS

Abstract

PAMPA tests and Caco-2 tests are *in vitro* assays used in the evaluation of the intestinal permeability of drugs. They are performed during the discovery phase of a drug. PAMPA tests are not biologically representative of the intestinal membrane, but they can be done quickly and are low cost. On the other hand, Caco-2 tests require a cell culture time of 21 days and specific installations. They are composed of a confluent enterocyte monolayer and, therefore, more biologically representative. There is a need to develop a highthroughput biologically representative assay of the human intestinal membrane at low cost. The first goal of this project is to develop an analytical method for the simultaneous quantification of eight control drugs used in the assay validation. The second goal of this project is to optimize an improved PAMPA membrane, the neoPAMPA. This new membrane is constituted of three components: (1) a porous filter that acts as a support, (2) a negatively charged polydopamine cushion that serves as an anchor and ensures the bilayer fluidity (3) a lipid bilayer formed by the fusion of vesicles.

An HPLC-MS/MS analytical method was validated according to FDA and EMA specifications. This method allowed to simultaneously quantify eight standard drugs used in the neoPAMPA test. A PAMPA test was also performed as a control assay. The permeability coefficients measured through the PAMPA membrane for the eight drugs compared favorably to literature results. The components of the neoPAMPA membrane were optimised. The optimal conditions were polycarbonate hydrophilic filters having pores of 15 nm, Costar 12 wells plates used as the device for the permeability assays, a lipid bilayer composed of 70 % DOPC and of 30 % cationic cholesterol and a deposition of liposomes in presence of 150 mM NaCl followed by an equilibration time of 1 h in presence of a saturated DOPC solution. The stability of the eight drug cassette and the liposomes was insufficient for the conditioning of commercial neoPAMPA membranes.

Different optimisation parameters improved the neoPAMPA membrane, although without making it functional. The neoPAMPA membrane was not sufficiently able to discriminate molecules as a function of their expected permeability.

Keywords: PAMPA, permeability, polydopamine, lipid bilayer, HPLC-MS/MS

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Les différentes voies d'absorption.....	2
1.1.1 La diffusion passive transcellulaire.....	3
1.1.2 La diffusion passive paracellulaire.....	4
1.1.3 Le transport actif.....	5
1.1.4 L'endocytose.....	6
1.1.5 Autres phénomènes de perméabilité membranaire.....	6
1.2 Structure et composition des membranes cellulaires.....	7
1.2.1 Les lipides membranaires.....	7
1.1.3 La fluidité des membranes.....	9
1.3 Modèles non cellulaires d'évaluation de la perméabilité.....	12
1.3.1 <i>Parallel artificial membrane permeability assay</i> - PAMPA.....	13
1.3.2 <i>Phospholipid vesicle-based permeation assay</i> – PVPA.....	17
1.3.3 Modélisation mathématique de la perméabilité.....	18
1.4 Méthode analytique des essais de perméabilité.....	20
1.4.1 Fonctionnement du HPLC-MS/MS.....	21
1.4.2 Validation des méthodes bioanalytiques.....	25
1.5 Vers le développement du modèle néoPAMPA.....	27
1.5.1 Hypothèse et objectifs.....	27
Chapitre 2: Validation of a HPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of eight standard drugs used in permeability assays.....	29
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.....	29
2.1 Résumé en français.....	30
2.2 Résumé en anglais.....	31
2.3 Introduction.....	32
2.4 Materials and method.....	34
2.4.1 Chemicals.....	34
2.4.2 Preparation of test, standard and control solutions.....	34
2.4.3 Preparation of injection solutions.....	35

2.4.4 HPLC-ESI-MS/MS system.....	35
YMC-Pack ODS AQ.....	36
2.4.5 Method validation	37
2.4.6 Application of the method to permeability assay samples.....	38
2.5 Results and Discussion	39
2.5.1 Selection of standard drugs	39
2.5.2 Development of chromatographic conditions.....	40
2.5.3 Validation of the method	43
2.5.4 Application of standard drugs to permeability assays	45
2.6 Conclusion	47
2.7 Acknowledgements.....	47
Chapitre 3 : Optimisation de la membrane néoPAMPA.....	48
3.1 Introduction.....	48
3.1.1 Le filtre.....	48
3.1.2 La polydopamine	49
3.1.3 La bicouche lipidique.....	50
3.1.4 Le dispositif	53
3.1.5 Les médicaments standards.....	54
3.2 Objectifs.....	55
3.3 Matériel	56
3.4 Méthodes.....	56
3.4.1 Préparation des membranes	56
3.4.2 Tests de perméabilité	58
3.4.3 Adhérence des médicaments.....	59
3.4.4 Quantification des résultats.....	59
3.5 Résultats	60
3.5.1 Le filtre.....	60
3.5.2 La bicouche lipidique.....	65
3.5.3 Conditions du test de perméabilité.....	74
3.5.4 Coefficients de perméabilité avec conditions optimisées	78
3.6 Conclusion	80

Chapitre 4 : Stabilité et conditionnement.....	81
4.1 Introduction.....	81
4.2 Objectifs.....	82
4.3 Matériel.....	82
4.4 Méthodes.....	83
4.4.1 Stabilité de la cassette de médicaments.....	83
4.4.2 Stabilité des liposomes.....	83
4.5 Résultats.....	83
4.5.1 Stabilité de la cassette de médicaments.....	83
4.5.2 Stabilité de la suspension liposomale.....	85
4.6 Conclusion.....	87
Chapitre 5 : Conclusion.....	89

Liste des tableaux

Tableau 1.2 Méthodes analytiques employées pour la quantification des tests PAMPA.....	21
Table 2.1 Chromatographic parameters used for the separation of the eight standard drugs ..	36
Table 2.2 Mass transitions and ionization parameters of the eight standard drugs and internal standard.....	36
Table 2.3 Detection mode periods used for the identification of the eight standard drugs and internal standard.....	37
Table 2.4 Molecules structure and classification of the eight standard drugs.....	40
Table 2.5 Validation of the HPLC-ESI-MS/MS method.....	43
Table 2.6 PAMPA results for the eight standard drugs and comparison with literature.....	46
Tableau 3.1 Comparaison des coefficients de perméabilité des bicouches lipidiques formées de DMPC et de DOPC	52
Tableau 3.2 Composition des solutions lipidiques utilisées pour la préparation des liposomes	57
Tableau 3.5 Étude de l'effet d'un filtre de polycarbonate hydrophile (pores de 15 nm) sur la perméabilité de la cassette de médicaments.....	64
Tableau 3.8 Taille des liposomes de différentes compositions en fonction de la présence de 150 mM NaCl et du temps	70
Tableau 3.10 Pourcentage de recouvrement de la cassette de médicaments suite à un test de perméabilité avec la membrane néoPAMPA complète	76
Tableau 4.1 Stabilité de la cassette de médicaments à 14 jours	84
Tableau 4.2 Taille moyenne des liposomes (70% DOPC/30% DC-Cholestérol) en fonction du temps et des conditions d'entreposage.....	86
Tableau 5.1 Propriétés physicochimiques des molécules de la cassette de médicaments	91
Tableau 5.2 Perméabilité paracellulaire des 9 molécules standards déterminées.....	93

Liste des figures

Figure 1.1 Les mécanismes d'absorption des molécules par la paroi intestinale	3
Figure 1.2 Les jonctions serrées entre les cellules de la paroi intestinales	4
Figure 1.3 Les lipides majoritaires des membranes plasmiques	9
Figure 1.4 Organisation des lipides d'une bicouche lipidique en phase gel et en phase fluide et l'effet des stérols sur l'organisation des lipides	10
Figure 1.5 Effet du cholestérol sur la T_m des bicouches lipidiques	11
Figure 1.6 Schématisation du test PAMPA	13
Figure 1.7 Schéma hypothétique du modèle PVPA	17
Figure 1.8 Courbe typique du transport d'une molécule au travers d'une membrane	20
Figure 1.9 Composantes d'un spectromètre de masse	22
Figure 1.10 Schématisation de l'ionisation par électronébulisation	23
Figure 1.11 Schématisation de l'analyseur quadripôle	24
Figure 1.12 Modèle membranaire néoPAMPA	28
Figure 2.1 Chromatograms of the eight molecules	42
Figure 2.2 Comparison of chromatograms from two different lots of column	45
Figure 3.1 Filtre de polycarbonate	49
Figure 3.2 Épaisseur du film de pDA en fonction du temps d'immersion du support	50
Figure 3.3 Processus de formation des bicouches lipidiques par fusion des liposomes	50
Figure 3.4 Dispositifs des tests de perméabilité	54
Figure 3.5 Images de microscopie optique des filtres de polycarbonate (15 nm) collés aux inserts	63
Figure 3.6 Effet du NaCl sur la déposition des liposomes sur une surface de silice	73
Figure 3.7 Recouvrement de la cassette de médicaments	75
Figure 3.8 Cinétique de diffusion de la cassette de médicaments sur une période de 2 h	78
Figure 4.1 Taille moyenne des liposomes (70% DOPC/30% DC-Cholestérol) entreposés à 4 °C en fonction du temps	86
Figure 4.2 Taille moyenne des liposomes (70% DOPC/30% DC-Cholestérol) entreposés dans le N ₂ liquide en fonction du temps	87
Figure 5.1 Comparaison de la perméabilité des composés et de leur indice paracellulaire	92

Liste des abréviations

ADME-tox	: Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité
AFM	: Microscopie à force atomique – <i>Atomic force microscopy</i>
ATP	: Adénosine triphosphate
AUC	: Aire sous la courbe – <i>Area under the curve</i>
AUC _R	: Aire sous la courbe de l'échantillon du compartiment receveur
AUC ₀	: Aire sous la courbe de l'échantillon du compartiment donneur à temps 0
BCS	: Système de classification biopharmaceutique – <i>Biopharmaceutical classification system</i>
BHA	: Hydroxyanisole butylé – <i>Butylated hydroxyanisole</i>
C _{apical}	: Concentration du côté apical de la membrane
C _{basal}	: Concentration du côté basal de la membrane
C _{D0}	: Concentration dans le compartiment donneur au temps 0
CE	: Énergie de collision – <i>Collision energy</i>
C _R	: Concentration dans le compartiment receveur à la fin de l'essai
DC-Chol	: DC-Cholestérol-HCl
DMPC	: 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DOPC	: 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DP	: <i>Declustering potential</i>
EGTA	: Acide tétraacétique de l'éthylène glycol
EMA	: Agence européenne du médicament – <i>European medicine agency</i>
ESI	: Ionisation par électronébulisation – <i>Electrospray ionisation</i>
ET	: Écart-type
F	: Flux
FA	: Acide formique – <i>Formic acid</i>
FDA	: <i>Food and drug administration</i>
HCT	: Hydrochlorothiazide
HPLC	: Chromatographie liquide à haute performance – <i>High performance liquid chromatography</i>
ICH	: Conférence internationale sur l'harmonisation – <i>International conference on harmonisation</i>
ILC	: Chromatographie de lipides immobilisés – <i>Immobilized lipids chromatography</i>
IP	: Indice paracellulaire
ISTD	: Standard interne – <i>Internal standard</i>
LLOQ	: Limite inférieure de quantification – <i>Lower limit of quantification</i>
LOD	: Limite de détection – <i>Limit of detection</i>
MOL	: Concentration au centre de la linéarité – <i>Middle concentration of linearity</i>
MM	: Masse molaire
MRM	: <i>Multiple reactions monitoring</i>
MS	: Spectromètre de masse – <i>Mass spectrometer</i>
MS/MS	: Spectromètre de masse en tandem
m/z	: Ratio masse sur charge
NCE	: Nouvelle entité chimique – <i>New chemical entity</i>

néoPAMPA	: membrane PAMPA élaborée dans les travaux présentés
PAMPA	: <i>Parallel artificial membrane permeability assay</i>
P_{app}	: Perméabilité apparente
PBS	: Tampon phosphate salin – <i>Phosphate buffer saline</i>
PC	: Phosphatidylcholine
pDA	: Polydopamine
PE	: Phosphatidyléthanolamine
P_{eff}	: Perméabilité effective
PI	: Phosphatidylinositol
PS	: Phosphatidylsérine
PSA	: Surface polaire (<i>polar surface area</i>)
PVDF	: Polyfluorure de vinylidène – <i>Polyvinylidene fluoride</i>
PVPA	: <i>Phospholipid vesicle-based permeation assay</i>
Q	: Quantité de médicaments
Q1	: 1 ^{er} quadripôle
Q2	: Cellule de collision
Q3	: 3 ^e quadripôle
RT	: Temps de rétention – <i>Retention time</i>
S	: Surface
SNR	: Ratio signal/bruit – <i>Signal-to-noise ratio</i>
ST	: <i>Start time</i>
t	: Temps
T_m	: Température de transition – <i>Melting temperature</i>
ULOQ	: Limite supérieure de quantification – <i>Upper limit of quantification</i>
V_R	: Volume de solution dans le compartiment receveur
WLSLR	: <i>Weight least squares linear regression</i>
XIC	: <i>Extracted-ion chromatogram</i>
ΔC	: Différence de concentration de part et d'autre de la membrane

À deux femmes fortes et fières

Lilianne et Noëlla

... parce que je vous porte dans mon coeur

Remerciements

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe néoPAMPA pour leur conseil et leur appui. Les discussions lors des réunions néoPAMPA ont été grandement profitables au projet et les expertises de chacun ont permis de mieux comprendre chaque aspect de cette nouvelle membrane.

Je veux également remercier S. Nirasay et S. Zaraa pour tous les efforts qu'elles ont déployés pour le projet, mais surtout pour leur grande amitié et leur complicité.

Un remerciement particulier est nécessaire pour le Pr. Leclair puisqu'il a écouté, durant ces deux dernières années, toutes mes inquiétudes et mes joies concernant le projet – son bureau a le malheur d'être situé entre le mien et le laboratoire de recherche! Également, un remerciement particulier au Pr. Marcotte pour toutes ses bonnes idées et ses rires contagieux.

Finalement, je souhaite remercier tous les étudiants, professeurs et agents de recherche de l'axe formulation et analyse du médicament pour leur précieux conseils lors des réunions de laboratoire ainsi que pour leur soutien moral.

Chapitre 1 : Introduction

Ce sujet de maîtrise s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre les laboratoires des Professeurs Marcotte et Claverie de l'Université du Québec à Montréal, du professeur Badia de l'Université de Montréal, du Dr. Mouget de Corealis Pharma Inc. et du laboratoire du Professeur Leclair de l'Université de Montréal. Deux autres étudiantes, S. Nirasay ainsi que S. Zaraa, ont activement contribué à ce projet. Le but de l'équipe consistait à développer un nouvel essai de perméabilité *in vitro* biologiquement plus représentatif de la membrane intestinale, la membrane néoPAMPA. Cette nouvelle membrane est constituée de trois éléments : (1) un filtre poreux qui agit à titre de support; (2) un coussin de polydopamine (pDA) qui procure de la fluidité à la membrane et qui sert d'ancrage; ainsi (3) qu'une bicouche lipidique qui agit comme barrière représentative des membranes cellulaires intestinales.

Les résultats présentés dans ce mémoire s'appuient sur les travaux antérieurs de S. Nirasay (1, 2) et de S. Zaraa (3). S. Nirasay a travaillé sur l'optimisation et la caractérisation des composantes de la membrane néoPAMPA. Elle a, entre autre, participé au choix des filtres utilisés par la caractérisation des filtres de polycarbonate et d'alumine, déterminé le temps de déposition optimale de la polydopamine et établi un premier protocole de préparation et de déposition des liposomes. Ces travaux ont également touché la caractérisation de la fluidité et de l'uniformité de la membrane néoPAMPA. S. Zaraa a également participé à l'optimisation de la préparation des membranes néoPAMPA en développant un nouveau protocole de préparation des liposomes, en validant l'essai de perméabilité des membranes dans des cellules de Franz horizontales ainsi qu'en élaborant une première cassette de médicaments témoins. Elle a également mis en place, réalisé et validé le test de perméabilité contrôle à l'aide de cellules Caco-2. Les travaux présentés dans ce mémoire portent premièrement sur le développement d'une méthode de quantification d'une nouvelle cassette de médicaments utilisés lors des essais de perméabilité. Cette méthode de quantification permet de diminuer le temps d'analyse et le temps des essais de perméabilité par l'évaluation simultanée de la perméabilité de huit médicaments témoins. Deuxièmement, des travaux d'optimisation ont été réalisés sur la taille des pores des filtres, la composition et la taille des liposomes ainsi que le

dispositif des essais de perméabilité. Finalement, des travaux préliminaires sur les possibilités de conditionnement de la membrane néoPAMPA en tant qu'essai de perméabilité sont présentés.

Dans l'introduction, les concepts de l'absorption et de l'évaluation de la perméabilité seront abordés. En effet, les membranes sont essentielles à la survie cellulaire. Elles contrôlent l'entrée et la sortie des molécules par différents mécanismes d'absorption. Leur composition et leur structure affecteront ces mécanismes. Il est donc important d'en connaître les principales caractéristiques. Des modèles *in vitro* de l'évaluation de la perméabilité existent afin de prédire le comportement des molécules en milieu biologique. Plusieurs modèles sont utilisés, mais les modèles *in vitro* non cellulaires seront principalement discutés. Finalement, l'évaluation de la perméabilité des molécules au travers d'une membrane nécessite leur quantification. Différentes méthodes sont utilisées comme la spectrophotométrie et la fluorométrie. Une méthode plus sensible consiste à combiner la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse. Un chapitre sera consacré à la description de cet appareil. Ces concepts seront utiles à la compréhension du nouvel essai de perméabilité développé dans le cadre de ce projet, la membrane néoPAMPA.

1.1 Les différentes voies d'absorption

Lors de l'administration par voie orale, les molécules doivent traverser la paroi intestinale afin d'atteindre la circulation systémique. Ce phénomène, appelé absorption, module la biodisponibilité d'une molécule.

Les médicaments peuvent être absorbés selon plusieurs mécanismes incluant la diffusion passive transcellulaire, la diffusion passive paracellulaire, le transport actif et l'endocytose. Plus d'un mécanisme peuvent être impliqués lors de l'absorption d'une molécule ce qui complexifie l'évaluation de sa perméabilité. Un résumé de ces mécanismes est présenté à la **Figure 1.1**.

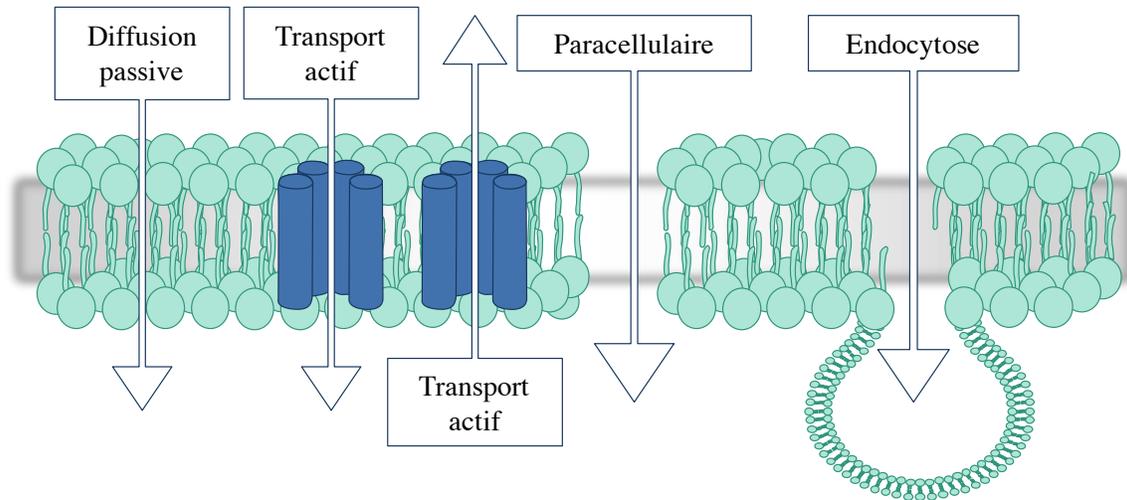


Figure 1.1 Les mécanismes d'absorption des molécules par la paroi intestinale

1.1.1 La diffusion passive transcellulaire

La voie passive est le mécanisme d'absorption principal des médicaments. Ce mécanisme ne nécessite aucun apport supplémentaire d'énergie et il est favorisé par la grande surface que représente l'épithélium intestinal (4). Lors de la diffusion passive transcellulaire, les molécules se déplacent au travers de la paroi cellulaire en fonction d'un gradient de concentrations. La vitesse de diffusion est alors fonction de la différence de concentrations de part et d'autre de la membrane (5).

L'affinité de la molécule pour la bicouche lipidique dictera sa capacité à être absorbée par diffusion passive transcellulaire. Cette affinité sera fonction de la lipophilicité de la molécule, de sa polarité et de son potentiel à former des ponts hydrogènes. Les règles de Lipinski permettent la prédiction de ce mécanisme d'absorption (6). Les règles des cinq prédisent une faible absorption pour les molécules ayant : -1- plus de cinq groupes donneurs d'hydrogènes pouvant former des ponts-H, -2- plus de dix groupes accepteurs d'hydrogènes pouvant former des ponts-H, -3- une masse moléculaire supérieure à $500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et -4- un logP supérieur à cinq. Individuellement, la mesure du logP, soit le coefficient de partage de la molécule entre un milieu hydrophobe (l'octanol) et hydrophile (l'eau), peut servir de référence afin de déterminer le potentiel d'une molécule à diffuser de manière transcellulaire (7). Une molécule doit posséder un logP élevé, mais une limite a été établie par Lipinski (6) sachant que les molécules ayant un logP très élevé seront aussi peu solubles dans l'eau. Pour traverser

les membranes, la molécule doit être hydrophobe, mais elle doit également être soluble. C'est un compromis entre la solubilité et la perméabilité.

La voie passive transcellulaire est généralement empruntée par les petites molécules (<500 g/mol) solubles non chargées et hydrophobes car elles ont un bon coefficient de partage dans la bicouche lipidique qui présente des domaines hydrophiles et hydrophobes (8). Les molécules chargées ne peuvent être absorbées selon ce mécanisme puisque leur solubilité dans le milieu hydrophobe de la bicouche lipidique est insuffisante (9).

1.1.2 La diffusion passive paracellulaire

La paroi intestinale est formée de jonctions serrées qui sont des espaces situés entre les cellules épithéliales (**Figure 1.2**). Les jonctions serrées sont majoritairement situées du côté apical (10). De façon générale, peu de médicaments sont absorbés par cette voie. En effet, les jonctions serrées ne représentent que 0,1 % de la surface totale de l'épithélium intestinal (7). Ce mécanisme d'absorption, tout comme la diffusion passive transcellulaire, est guidé par le gradient de concentration qui existe de part et d'autre de la membrane. Par contre, la diffusion passive paracellulaire est une voie favorisant les molécules hydrophiles puisque l'espace existant entre les entérocytes est un milieu aqueux exempt de membrane lipidique (11).

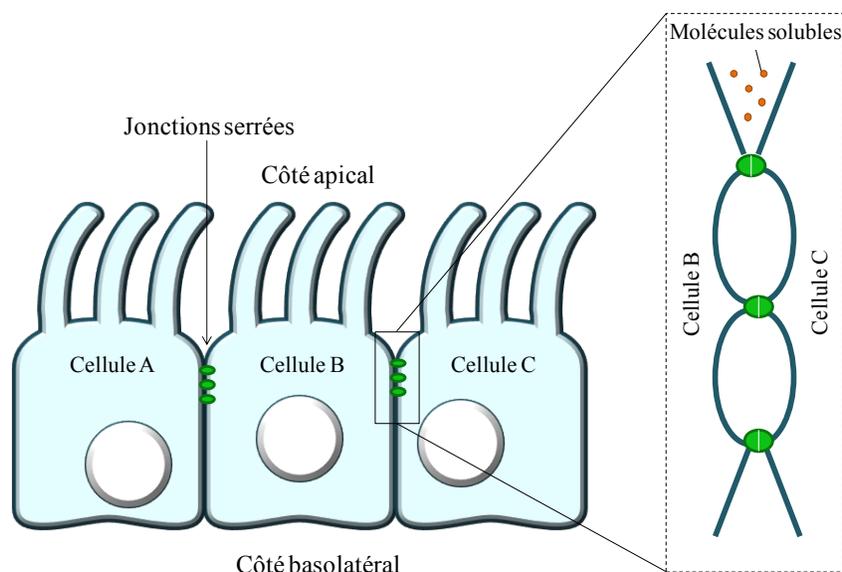


Figure 1.2 Les jonctions serrées entre les cellules de la paroi intestinales

Les molécules polaires et chargées peuvent donc emprunter la voie passive paracellulaire (12). La masse moléculaire et le volume des molécules gouverneront aussi leur propension à diffuser par les jonctions serrées étant donné la faible taille, environ 1 nm, de ces dernières. La limite de masse moléculaire est généralement établie à moins de $250 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (7).

L'absorption paracellulaire peut considérablement varier en fonction de la proportion des protéines formant les jonctions serrées (11). De plus, ces jonctions sont dynamiques et peuvent donc se resserrer ou s'agrandir en fonction de divers stimuli. Ce mouvement des cellules affecte principalement les molécules qui possèdent une taille aux limites de la voie paracellulaire, c'est-à-dire aux environs de $240 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $260 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

1.1.3 Le transport actif

Lorsque l'absorption est à prédominance transcellulaire, le logP est généralement un bon indicateur de la biodisponibilité. Toutefois, des transporteurs sont souvent impliqués dans l'absorption des molécules, ce qui peut modifier les prédictions. Ces cargos sont des protéines transmembranaires. Ils se subdivisent en deux familles : les transporteurs et les canaux ioniques. Seuls les transporteurs jouent un rôle dans l'absorption intestinale des médicaments. À leur tour, les transporteurs se subdivisent en deux classes : les transporteurs actifs et les transporteurs de soluté qui ne nécessitent aucune source d'énergie (13).

Le transport actif est un mécanisme qui nécessite une source d'énergie, comme l'adénosine triphosphate (ATP), pour permettre aux molécules de traverser la membrane. C'est également un phénomène sélectif puisqu'il implique la liaison de la molécule d'intérêt à la protéine membranaire. Les protéines peuvent contenir un ou plusieurs sites de liaisons, ce qui engendre de la compétition. Cette compétition peut survenir entre deux molécules différentes qui se lient au même site ou survenir par saturation du site de liaison par une même molécule présente en trop grande concentration (8). Le transport actif peut permettre le transfert des molécules du côté apical au côté basal (influx - absorption) ou du côté basal au côté apical (efflux - excrétion) (13). Les molécules hydrophiles et hydrophobes peuvent emprunter cette voie puisqu'elles n'ont pas à traverser la bicouche lipidique. De plus,

l'absorption des molécules via cette voie peut être altérée et variée selon l'expression de ces protéines membranaires; l'expression étant notamment dépendante du génotype.

1.1.4 L'endocytose

L'endocytose se produit lorsqu'une invagination de la paroi cellulaire survient et qu'elle englobe avec elle une molécule en solution (pinocytose) ou des particules (phagocytose). Le contenu des vésicules ainsi créées sera transporté à l'intérieur de la cellule pour ensuite être transféré du côté basolatéral des cellules. Le phénomène par lequel les vésicules se fusionnent à la paroi cellulaire basolatérale pour excréter la molécule est nommé l'exocytose. La transcytose est le phénomène par lequel une molécule traverse la cellule du côté apical au côté basolatéral au moyen des vésicules (14, 15). Dû à leur taille, les macromolécules ne peuvent diffuser passivement, ni emprunter le transport actif. Par conséquent, l'endocytose est leur voie de prédilection.

Les invaginations se produisent de manière constitutive, mais elles peuvent également survenir suite à un stimulus. Par exemple, une molécule peut se lier à une protéine membranaire déclenchant l'endocytose (16). Les vacuoles se produisent à des endroits déterminés de la paroi cellulaire appelés radeaux lipidiques. Elles sont riches en cholestérol, en sphingolipides et présentent une protéine membranaire, la cavéoline, ou une protéine plasmique, la clathrine (11).

1.1.5 Autres phénomènes de perméabilité membranaire

Parmi les autres phénomènes d'absorption membranaire, il y a l'osmose et la dialyse. L'osmose est le mouvement de l'eau à travers une membrane semi-perméable en fonction du gradient de concentration d'une molécule de chaque côté de la membrane. Cette absorption est similaire à la diffusion paracellulaire mais, dans le cas de l'osmose, c'est l'eau qui se déplace par les jonctions serrées afin d'obtenir un équilibre des concentrations, et non la molécule d'intérêt (5, 17). Puisque l'eau suit le gradient, l'osmose peut être un phénomène d'influx (déshydratation) ou d'efflux (diarrhée osmotique).

La dialyse est un phénomène qui englobe plusieurs mécanismes de mouvement des molécules au travers d'une membrane semi-perméable. Elle fait intervenir la diffusion, l'osmose, la filtration et la convection. Le rein en est un bon exemple. L'épithélium rénal agit comme une membrane semi-perméable qui filtre le sang pour le départir des petites molécules. Le mouvement de la solution peut survenir dans les deux directions (18). C'est la taille et la charge des molécules qui dictent leur perméabilité au travers de la membrane (19). Les molécules comme l'eau, l'urée et le glucose passent aisément la paroi par les jonctions serrées de l'épithélium rénal. La limite de taille a été établie à 7,5-10 nm sachant que les petites protéines comme l'albumine et l'hémoglobine ont la capacité de traverser la membrane en faible quantité. Par contre, les érythrocytes et les macromolécules comme les protéines plasmatiques ne peuvent diffuser librement (20). Les molécules chargées positivement sont davantage filtrées que les molécules neutres tandis que les molécules chargées négativement sont moins bien filtrées que les molécules neutres. Cette sélectivité de la charge est causée par la présence de glycoprotéines chargées négativement à la surface des glomérules rénaux (19). Ce phénomène s'applique également à la paroi intestinale puisque la charge globale nette est négative dû à la présence de phospholipides anioniques.

1.2 Structure et composition des membranes cellulaires

L'étude de la structure et de la fluidité des membranes permettra de mieux comprendre les différents mécanismes d'absorption présentés à la section 1.1. Les membranes cellulaires sont composées d'une bicouche lipidique organisée et de protéines transmembranaires. Ses constituants assurent son intégrité et sa fluidité, ce qui est essentiel au contrôle de la perméabilité membranaire (16).

1.2.1 Les lipides membranaires

Les lipides membranaires sont assemblés sous forme de bicouche par des liens non covalents. Tous les lipides qui constituent la membrane sont amphiphiles. Ils possèdent une tête polaire hydrophile et de longues chaînes carbonées lipophiles. Trois familles de lipides composent majoritairement les membranes : les phosphoglycérides, les sphingolipides et le cholestérol. Les structures des familles de lipides sont illustrées à la **Figure 1.3**. Parmi les phosphoglycérides, il y a les phosphatidylcholines (PC), les phosphatidyléthanolamines (PE),

les phosphatidylsérines (PS) et les phosphatidylinositols (PI) (21). Chacune de ces familles de lipides possède des propriétés physicochimiques qui lui sont propres, ce qui engendre la diversification des membranes en fonction de leur proportion.

Les lipides majoritaires de la famille des sphingolipides sont les sphingomyélines et les glycolipides (**Figure 1.3**). Cette famille se caractérise par des longues chaînes hydrophobes comparativement à une petite région hydrophile. Malgré tout, les sphingolipides possèdent des propriétés amphiphiles et une structure similaire aux PC. Le cholestérol, la troisième famille de lipide, n'est pas un phospholipide. Il se distingue des familles précédentes par sa structure puisque sa région hydrophile n'est constituée que d'un seul groupement hydroxyle et que son domaine hydrophobe comprend quatre cycles aromatiques (9).

Les feuillettes extérieur et intérieur de la bicouche cellulaire sont de composition lipidique différente, ce qui leur permet d'assurer des fonctions distinctes. Par exemple, les glycolipides se trouvant sur la face extérieure de la bicouche peuvent agir comme récepteurs pour les ligands extracellulaires, tandis que les PE se trouvant majoritairement sur la face intérieure de la bicouche entraînent sa courbure et favorisent sa fusion (22). Les proportions et les types de lipides qui composent les membranes influencent donc grandement leur comportement et leur fluidité.

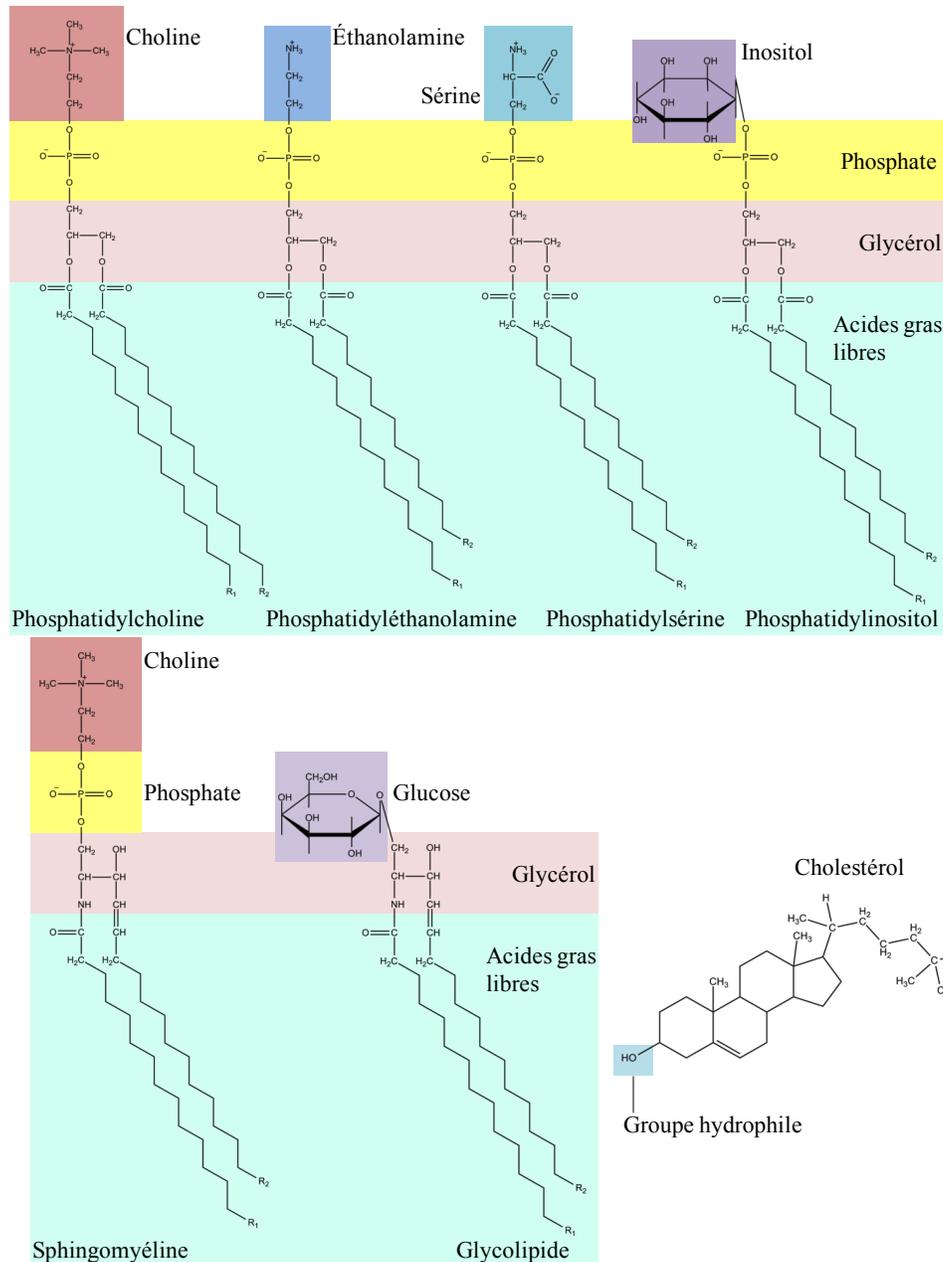


Figure 1.3 Les lipides majoritaires des membranes plasmiques
[Retracée et traduite de (22)]

1.1.3 La fluidité des membranes

La fluidité membranaire est le terme employé pour décrire le mouvement possible d'un lipide dans la bicouche, dans son environnement immédiat. C'est en réalité une mesure de la microviscosité de la membrane. Cette fluidité change en fonction des composantes de la bicouche ainsi que de leur emplacement dans la bicouche. Une membrane fluide se déforme

d'avantage au passage passif transcellulaire des molécules affectant ainsi l'absorption (9). En d'autres termes, plus la membrane est fluide, plus la perméabilité des molécules est grande.

La fluidité est caractérisée par la température de transition (T_m , *melting temperature*) des lipides qui est le changement d'organisation d'une phase gel à une phase fluide (**Figure 1.4**). La température de transition est fonction de l'entassement des lipides dans la bicouche. Le mouvement des lipides dans la phase gel est limité puisqu'il constitue un réseau très organisé des composantes lipidiques de la membrane (23). Selon cette logique, les lipides ayant un haut niveau d'insaturations ont une T_m plus faible puisque leurs chaînes d'acide gras étant non linéaires, leur entassement n'est pas optimal (16). Les bicouches ayant une grande proportion de lipides insaturés seront donc plus fluides à une température donnée que les bicouches composées majoritairement de lipides saturés. La fluidité des membranes peut, par conséquent, être modifiée par le contenu en insaturations des chaînes d'acide gras des phosphoglycérides et des sphingomyélines. La longueur des chaînes des acides gras affectera aussi le niveau d'entassement et, par conséquent, la fluidité membranaire. En effet, les longues chaînes procurent une meilleure organisation des bicouches, ce qui entraîne une augmentation de la T_m (22). La fluidité peut également être modifiée par une augmentation de la température, pouvant même engendrer un changement de phase des lipides membranaires. À 37 °C, les lipides des membranes plasmiques humaines existent sous une phase fluide. Le dernier paramètre pouvant modifier la fluidité est la proportion de cholestérol dans les bicouches (22).

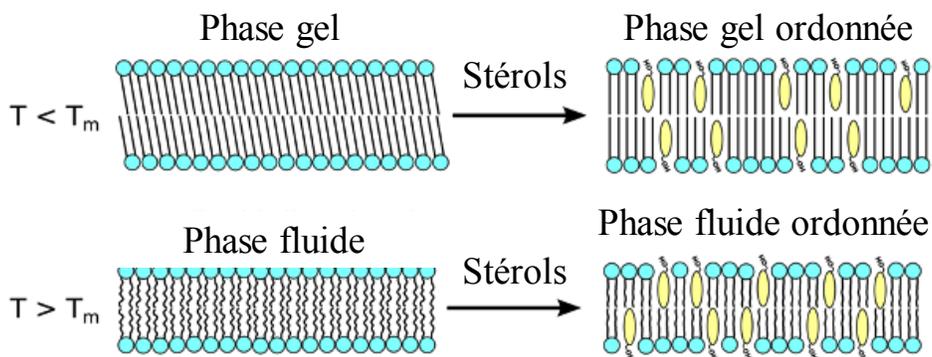


Figure 1.4 Organisation des lipides d'une bicouche lipidique en phase gel et en phase fluide et l'effet des stérols sur l'organisation des lipides
[Traduite et modifiée de (24)]

Le cholestérol est un élément essentiel des membranes cellulaires. Seul, il ne peut former de bicouche lipidique mais inséré dans celle-ci, il accomplit un rôle de régulateur de la fluidité membranaire. Le cholestérol exerce un double rôle qui a pour but de diminuer l'effet drastique du changement de phase à une T_m donnée (21). En phase gel, le cholestérol s'intercale entre les phospholipides, ce qui apporte une légère désorganisation et donc une augmentation de la fluidité de la bicouche. Au contraire, en phase fluide, le cholestérol a un effet d'entassement des lipides (25). Il condense les chaînes d'acides gras libres, ce qui rigidifie la bicouche. Donc, la plage de transition de la phase gel à la phase fluide est plus étendue, ce qui diminue la différence existante entre les phases (9, 16).

À titre d'exemple (**Figure 1.5**), une bicouche uniquement composée de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) a une température de transition de 23 °C (26). L'incorporation de cholestérol dans la bicouche va élargir cette phase de transition qui se déroule entre 20 °C à 28 °C sur l'exemple de la **Figure 1.5**. La bicouche sera donc dans un état transitoire semi-gel / semi-fluide sur une large gamme de températures. Les membranes cellulaires humaines contiennent de 30 % à 40 % de cholestérol (23). À 50 % de cholestérol, la phase de transition est complètement éliminée, laissant ainsi la bicouche lipidique dans un état fluide organisé (23).

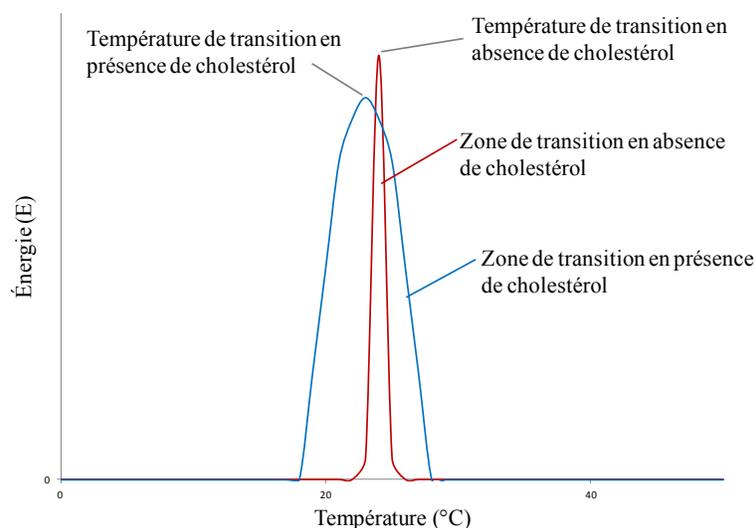


Figure 1.5 Effet du cholestérol sur la T_m des bicouches lipidiques
[Retracée et modifiée de (16)]

1.3 Modèles non cellulaires d'évaluation de la perméabilité

L'évaluation de la perméabilité est primordiale dans le domaine de la découverte du médicament. En effet, la solubilité et la perméabilité font partie des propriétés biopharmaceutiques qui aident à prédire la biodisponibilité d'une molécule. Il existe plusieurs catégories de tests d'évaluation de la perméabilité: les tests *in vitro* non cellulaires, les tests *in vitro* cellulaires, les modèles *ex vivo* et les modèles *in vivo*. Ce chapitre parlera principalement des tests *in vitro* non cellulaires pertinents pour ce projet puisque les autres catégories nécessitent plus de ressources et sont généralement réalisées à des étapes plus avancées du développement du médicament.

Parmi les tests non cellulaires, il y a la mesure du logP et les *parallel artificial membrane permeability assay* (PAMPA). Le logP est le coefficient de partage d'une molécule entre l'octanol et l'eau. Il permet donc de mesurer l'affinité d'une molécule pour un environnement lipidique. Toutefois, aucun phénomène de diffusion au travers d'une membrane n'est observé avec ce test. En revanche, le PAMPA est un modèle qui permet de quantifier la proportion de médicaments ayant diffusé de manière passive au travers d'une membrane lipidique (27).

Le modèle PAMPA fut le premier modèle membranaire de l'évaluation de la perméabilité. Il a été élaboré afin de contrer les limites de temps et de ressources imposées par le test Caco-2. Brièvement, le test Caco-2 est un test de perméabilité *in vitro* cellulaire dont la culture des cellules nécessite un minimum de 21 jours. Les cellules Caco-2 sont de la lignée cancéreuse colique de l'humain. Le PAMPA a aussi remédié au problème de la mesure du logP, car ce dernier ne permet pas d'évaluer le transport des molécules. De façon générale, le PAMPA est composé d'un compartiment donneur qui contient la molécule d'intérêt en solution et d'un compartiment receveur vers lequel diffusera le médicament. La membrane se trouvant entre les deux compartiments est un filtre imbibé d'une solution de lipides dissous dans un solvant organique. Un schéma de l'essai PAMPA est illustré à la **Figure 1.6**. La perméabilité des molécules au travers de cette membrane est calculée pour une période de temps et pour une surface de diffusion définies (28).

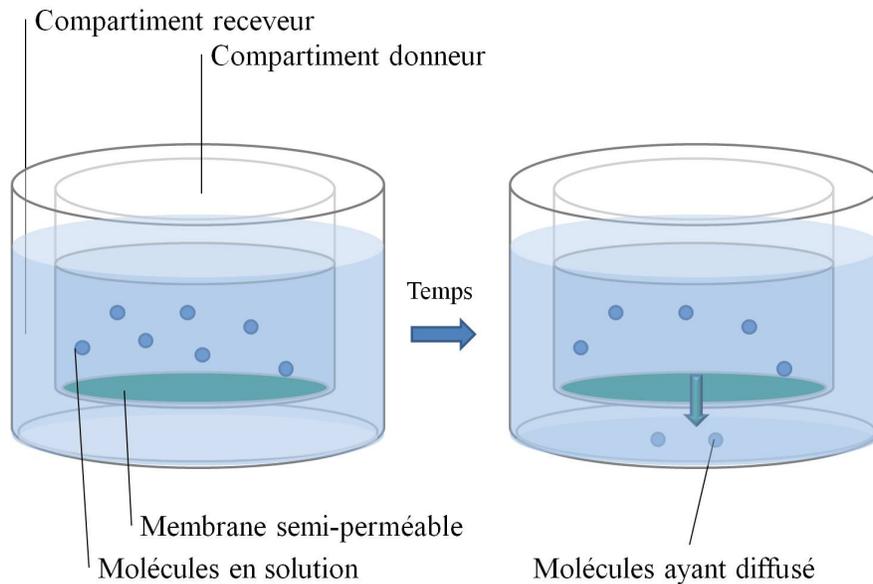


Figure 1.6 Schématisation du test PAMPA

1.3.1 *Parallel artificial membrane permeability assay* - PAMPA

Le premier modèle PAMPA a été développé par Kansy *et al.* à partir des travaux de Artursson *et al.* (29, 30). Il consiste en un filtre hydrophobe de polyfluorure de vinylidène (PVDF) ayant des pores de 450 nm de diamètre. Ce filtre était imprégné dans une solution de dodécane contenant de 1 à 20 % de lécithine d'œuf, une PC. Depuis, plusieurs variantes du PAMPA ont été développées afin de répondre à des interrogations particulières ou d'y apporter des améliorations. Majoritairement, les modifications ont été réalisées sur la composition de la membrane, le type de filtre utilisé ainsi que sur les milieux des compartiments donneurs et accepteurs (31).

Un résumé des différents modèles PAMPA est présenté dans le **Tableau 1.1**. Plusieurs équipes de recherche ont évalué l'effet de la composition de la membrane (32-34). Dans l'article de Wohnsland (32), la solution lipidique a été remplacée par un mélange de solvants hydrophobes : l'hexadécane et l'hexane. L'avantage de cet essai est l'obtention rapide d'une corrélation entre la perméabilité des composés et leurs coefficients de diffusion dans un milieu hydrophobe. Les résultats ont montré qu'il y avait une corrélation entre le pourcentage absorbé chez l'humain et la perméabilité des composés à travers leur modèle de membrane. Dans

l'article de Sugano *et al.* (33), un modèle biomimétique, plus représentatif de la composition réelle des membranes cellulaires des entérocytes, a été développé. Le filtre est imbibé dans une solution lipidique contenant 27 % de PC, 27 % de PE, 7 % de PS, 7 % de PI et 33 % de cholestérol. La charge résultante nette de la membrane est négative puisqu'il y a incorporation de PS et de PI, des lipides chargés négativement à pH biologique. Ils ont démontré que l'utilisation de membranes composées uniquement de PC entraînait une sous-estimation de la perméabilité des molécules basiques comparativement à leur modèle due à l'absence de charges négatives. Avdeef *et al.* (35) ont observés les mêmes résultats. Seo *et al.* (34) ont également évalué l'influence de la composition des lipides de la membrane. Ils ont testé six modèles de membrane contenant chacun un seul type de lipides. Les lipides testés possédaient des chaînes lipidiques de 18 carbones et un niveau d'insaturations de 0 à 2 : PC18:1, le PC18:2, le PE18:1, le PE18:2, le PS18:1 et le PS18:0. Le type de lipides utilisé a influencé trois molécules sur les cinq testées, soient celles qui avaient le coefficient de perméabilité le plus élevé. Par exemple, la perméabilité du métoprolol était de $0,103 \pm 0,008 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ pour une membrane composée de PC18:1 comparativement à $1,20 \pm 0,011 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ avec du PE18:1 et de $1,78 \pm 0,09 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ avec du PS18:1. Ils ont également observé que les coefficients de perméabilité les plus faibles avaient été obtenus avec les membranes composées uniquement de PC et, ce, pour les cinq molécules étudiées.

Tableau 1.1 Caractéristiques des différents modèles PAMPA

Référence	Filtre utilisé	Composition de la membrane	Milieu de diffusion ¹	Temps d'incubation
1998 - (29)	PVDF Hydrophobe Pores : 450 nm	1 % - 20 % Lécithine d'œuf Dodécane	TPS pH 6,5 et 7,4	15 h
2001 - (32)	Polycarbonate Hydrophile Pores : 3 µm	5 % Hexadécane Hexane	TPS pH 6,8 5 % DMSO	5 h
2001 - (33)	PVDF Hydrophobe Pores : 450 nm	3 % PC; PE; PS; PI; CHO 1,7-octadiène	TPS pH 6,5 5 % DMSO	2 h 15 h
2002 - (36)	PVDF Hydrophile Pores : 450 nm	1 % Lécithine d'œuf Dodécane	TPS pH 5,5 ou 7,4	2 h
2004 - (37)	PVDF Hydrophobe Pores : 450 nm	20 mg·mL ⁻¹ PC Dodécane	TPS pH 4; 6,6; 7,4; 8,0	18 h
2005 - (35, 38)	PVDF Hydrophobe Pores : 450 nm	20 % PC; PE; PI; PA Dodécane	TPS Donneur pH 3 à 10 Receveur pH 7,4	15 min 15 h
2006 - (34)	PVDF Hydrophobe Pores : 450 nm	5 % PC; PE; PS Dodécane	TPS pH 6,5 3 % DMSO	6 h
2008 - (39)	PVDF Hydrophobe Pores : 450 nm	Trois-couches Phospholipides et hexadécane Hexane	TPS pH 7,4	5 h

¹ TPS : tampon phosphate salin

Une modification de la nature du filtre a été réalisée par Zhu *et al.*(36). Le PVDF hydrophobe a été remplacé par un PVDF hydrophile afin de déterminer si le temps d'incubation pouvait être réduit de 15 heures à 2 heures. Les résultats ont démontré que l'essai était toujours dans des conditions d'extrême dilution après 2 heures ce qui est primordial pour le calcul de la perméabilité. (Voir section 1.3.3) Ils ont démontré une discrimination de la perméabilité entre les molécules connues comme étant très perméables et peu perméables. De plus, les résultats obtenus par Zhu *et al.* (36) étaient comparables à ceux obtenus par Kansy *et al.* (29) tout en ayant l'avantage d'un temps d'incubation sept fois plus court.

Kerns *et al.* (37) ainsi que Avdeef *et al.* (35, 38) ont procédé à la modification des milieux des compartiments donneur et receveur du test PAMPA. Le tampon phosphate est le solvant le plus utilisé des essais de perméabilité. Le pourcentage maximal de diméthylesulfoxyde (DMSO) accepté dans le compartiment donneur est de 5 % afin de limiter la dissolution des lipides de la membrane tout en facilitant la dissolution des molécules peu solubles. En revanche, le pH des compartiments peut différer d'un essai à l'autre. Kansy *et al.* (29) avaient évalué la perméabilité de plusieurs médicaments à deux pH soient 6,5 et 7,4. Ils sont devenus les milieux standards. Pour leur part, les travaux de Kerns *et al.* (37) sont basés sur le fait que les molécules ayant une charge neutre traversent aisément les membranes cellulaires comparativement aux molécules chargées dont la perméabilité est presque nulle. Les pH testés représentaient les pH rencontrés lors du chemin des molécules dans les intestins soient 4,0; 6,6; 7,4 et 8,0. Les milieux des compartiments donneur et receveur étaient identiques. Le choix du milieu testé est basé sur le pKa de la molécule d'intérêt. Par exemple, il est préférable de mesurer la perméabilité à un pH de 4 pour une molécule acide et à un pH de 8 pour une molécule basique puisque le pourcentage de la forme non ionisée de la molécule sera plus élevé. Par contre, les auteurs stipulent que la perméabilité devrait également être testée en parallèle à un pH de 7,4 à titre d'essai contrôle. Avdeef *et al.* (35, 38) ont modifié le pH du milieu du compartiment donneur tout en maintenant le compartiment receveur à un pH de 7,4. Ce modèle reflète mieux la réalité biologique que le modèle de Kerns *et al.* (37) puisque le pH du côté basolatéral reste constant le long du tractus gastro-intestinal. Des pH allant de 3 à 10 ont été testés. Les pH extrêmes peuvent être utilisés lors des tests non cellulaires. Par contre, ils sont mal tolérés par les cellules des tests *in vitro* cellulaires. De plus, ce modèle utilise des temps d'incubation différents en fonction de la perméabilité des molécules. Les molécules très perméables ne sont incubées que 15 minutes alors que les molécules peu perméables sont incubées 15 heures dans le but d'obtenir une concentration quantifiable dans le compartiment receveur.

Un modèle plus récent développé par Chen *et al.* (39) est constitué d'une membrane à trois couches. La couche centrale est composée d'hexadécane dissous dans de l'hexane. Les couches supérieure et inférieure sont composées d'un mélange de phospholipides dissous dans l'hexane. L'hexane est ensuite évaporé et la membrane triple couche, lipide/huile/lipide, est

formée. Ce modèle a été conçu afin d'obtenir une meilleure prédiction de la perméabilité d'un groupe de molécules très perméables incluant la caféine et l'antipyrine. Le modèle lipide/huile/lipide a correctement estimé la perméabilité des molécules sous-estimée par le test PAMPA en plus d'obtenir une meilleure corrélation avec la fraction absorbée chez l'humain.

1.3.2 *Phospholipid vesicle-based permeation assay* – PVPA

Un nouveau modèle *in vitro* de l'évaluation de la perméabilité des médicaments a été développé par G.E. Flaten (40-45), le *phospholipid vesicle-based permeation assay* (PVPA). Ce modèle est biologiquement plus représentatif et il permet une meilleure estimation de la perméabilité *in vivo*. Le modèle PVPA est constitué d'un filtre cellulosique ayant des pores de 650 nm sur lequel sont déposés, à deux reprises, des liposomes de lécithine d'œuf. Les liposomes ayant une taille de 400 nm sont incorporés dans les pores de la membrane tandis que les liposomes ayant une taille de 800 nm sont déposés par-dessus le filtre (40, 41). Une schématisation de ce modèle est présentée à la **Figure 1.7**. La méthode de préparation des membranes demande plus de temps et de technique que le test PAMPA ce qui fait de ce modèle un essai de criblage à moyen débit. Le modèle a été validé grâce à l'évaluation de la perméabilité de 21 médicaments connus ayant des propriétés physicochimiques variées et possédant des fractions absorbées chez l'humain variant entre 13 % et 100 %. Les auteurs ont démontrés que leur modèle prédisait mieux l'absorption *in vivo* que le test d'aire de surface polaire (PSA), le logD mesuré expérimentalement, la chromatographie de lipides immobilisés (ILC) et le PAMPA pour des conditions similaires. De plus, leurs résultats étaient comparables au test de perméabilité Caco-2 (41).

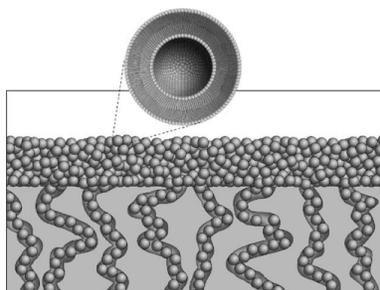


Figure 1.7 Schéma hypothétique du modèle PVPA
[Adaptée avec permission (40)]

La stabilité de la membrane en fonction de diverses conditions d'entreposage ainsi que la stabilité en fonction des changements de pH ont été évaluées. L'intégrité des membranes a été déterminée par la mesure de la perméabilité de la calcéine et de la fluorescéine. Ces deux molécules sont très hydrophiles et elles sont des marqueurs de non-perméabilité lorsque les membranes sont bien formées. Les résultats ont démontré que le PVPA était stable pendant 2 semaines lorsqu'il était entreposé à -80 °C et qu'il peut être utilisé à des pH variant entre 2,0 et 8,0 (40). La membrane pouvant être entreposée, de plus grandes quantités de membranes peuvent être préparées, permettant ainsi d'utiliser l'essai dans un contexte de criblage à haut débit. De plus, le PVPA peut, comme le PAMPA, être utilisé à des pH extrêmes afin d'évaluer différentes conditions du tractus gastro-intestinal. Les plus récents articles du modèle PVPA décrivent un modèle biomimétique amélioré grâce au changement de la nature des lipides qui composent les liposomes (46). La lécithine d'œuf a été remplacée par un mélange de lipides membranaires composé de 26 % PC, 26,5 % PE, 7 % PS, 7 % PI et de 33 % cholestérol. Ainsi, la membrane PVPA possède une charge nette négative comparativement au premier modèle développé. La perméabilité des molécules basiques est donc augmentée et la corrélation entre la perméabilité des molécules peu solubles et la fraction absorbée *in vivo* est améliorée.

1.3.3 Modélisation mathématique de la perméabilité

La description de la modélisation mathématique a été inspirée des travaux de Griffin *et al.* (11), Brouwers *et al.* (31) et de Ungell *et al.* (7). L'information obtenue par l'entremise des tests de perméabilité est le coefficient de perméabilité de la molécule d'intérêt. Il est important de comprendre ce que représente ce coefficient de perméabilité et comment il est calculé afin de réaliser adéquatement les expériences. Le calcul de la perméabilité effective (P_{eff}) est basé sur une application spécifique de la loi de Fick qui peut décrire le flux (F) d'un composé au travers d'une membrane semi-perméable et de la concentration de part et d'autre de cette membrane (ΔC).

$$F = P_{eff} \times \Delta C \quad (1.1)$$

Le flux est décrit comme la quantité de médicaments (dQ) qui traverse la paroi intestinale pour une surface donnée (S) en fonction du temps (dt).

$$F = \frac{dQ}{dt \times S} \quad (1.2)$$

En combinant les équations 1.1 et 1.2, les formules obtenues sont :

$$\frac{dQ}{dt} = P_{eff} \times \Delta C \times S \quad (1.3)$$

$$\frac{dQ}{dt} = P_{eff} \times (C_{apical} - C_{basal}) \times S \quad (1.4)$$

La concentration de part et d'autre de la membrane intestinale est définie comme la différence de concentration entre le côté apical (C_{apical}), ou lumière intestinale, et le côté basolatéral des entérocytes (C_{basal}) ou la circulation sanguine. Cette formule peut être simplifiée. En effet, la concentration dans la lumière intestinale est tellement plus grande que la concentration retrouvée dans la circulation sanguine que $C_{apical} - C_{basal} \approx C_{apical}$. Lorsque $C_{apical} \gg \gg C_{basal}$ les conditions « *sink* » sont respectées. Cette formule simplifiée est nommée le « calcul de la perméabilité apparente » (P_{app}) :

$$\frac{dQ}{dt} = P_{app} \times C_{apical} \times S \quad (1.5)$$

Dans le cas des tests de perméabilité *in vitro* non cellulaires, la formule de la perméabilité apparente est majoritairement utilisée. Dans ce cas, la concentration du côté apical représente la concentration dans le compartiment donneur au début de l'essai (C_{D0}). La quantité de la molécule ayant diffusée correspond alors à la concentration de la molécule dans le compartiment receveur (C_R) après un temps donné (t) multiplié par le volume du compartiment receveur (V_R). L'équation de la perméabilité apparente s'écrit alors :

$$P_{app} = \frac{C_R \times V_R}{C_{D0} \times t \times S} \quad (1.6)$$

L'équation 1.6 peut être utilisée lorsque l'essai de perméabilité est réalisé, par exemple, sur une période de deux heures et qu'un seul prélèvement est fait à la fin de l'expérience. Il est également possible de réaliser la cinétique de diffusion d'une molécule au travers d'une membrane. Puisque plusieurs échantillons sont prélevés lors d'une cinétique, une courbe de la quantité cumulative de la molécule dans le compartiment receveur (Q) en fonction du temps (t) peut être tracée. Une courbe typique du transport d'une molécule au travers d'une membrane est présentée à la **Figure 1.8**. Dans ce cas, la pente obtenue peut être utilisée dans l'équation 1.5 afin de calculer la perméabilité apparente.

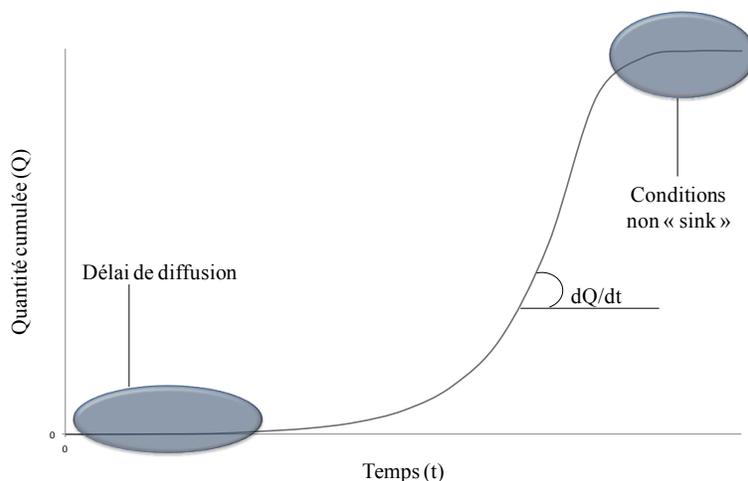


Figure 1.8 Courbe typique du transport d'une molécule au travers d'une membrane [Retracée et modifiée à partir de (31)]

Le délai de diffusion est généralement engendré par la rétention des molécules dans la membrane (31). Une fois la membrane saturée, les molécules diffusent selon une cinétique d'ordre un vers le compartiment receveur. Lorsque la perméabilité est évaluée sur une longue période de temps, un flux inverse (compartiment receveur vers le compartiment donneur) est observé et l'équation de la perméabilité apparente ne peut être utilisée. Ce sont des conditions non « *sink* ».

1.4 Méthode analytique des essais de perméabilité

Afin de calculer le coefficient de perméabilité, il est nécessaire de développer une méthode analytique capable de quantifier les composés dans le compartiment receveur et le compartiment donneur. La méthode analytique la plus couramment utilisée est la spectrophotométrie UV. Un résumé des méthodes d'analyse utilisées dans le cadre des essais de perméabilité est répertorié dans le **Tableau 1.2**. Le PAMPA est un essai de criblage à haut débit. La méthode de quantification doit donc nécessiter peu de développement, être rapide et facilement réalisable, trois caractéristiques de la spectrophotométrie UV. Par contre, les désavantages de cette technique d'analyse sont qu'elle est peu sensible et qu'elle n'est pas sélective. Le manque de sensibilité affecte principalement les molécules peu perméables, mais il peut être compensé par une augmentation de la concentration de la molécule d'intérêt dans le compartiment donneur. Dans un contexte de découverte du médicament, la quantité et la

solubilité des molécules sont souvent limitées et, par conséquent, cette alternative n'est pas toujours adéquate. Le manque de sélectivité est dû au fait que la majorité des molécules pharmaceutiques absorbent dans l'UV et qu'il peut y avoir une interférence entre deux composés pour une même longueur d'onde. La spectrophotométrie peut être couplée à de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour augmenter sa sélectivité, en séparant les analytes, ainsi que sa sensibilité. La méthode la plus sensible et la plus sélective présentée dans le **Tableau 1.2** est la quantification par HPLC-MS/MS.

Tableau 1.2 Méthodes analytiques employées pour la quantification des tests PAMPA

Référence	Méthode d'analyse	Molécule analysée
1998 - (29)	UV	25 médicaments
2001 - (32)	UV	32 médicaments génériques
2001 - (33)	UV	32 médicaments
2002 - (36)	HPLC-UV et UV	92 médicaments
2004 - (37)	UV	> 100 médicaments
2005 - (35)	UV	11 médicaments basiques
2006 - (34)	Scintillation	5 composés
2006 - (41)	UV	21 médicaments
2006 - (40)	Fluorescence	Fluorescéine et calcéine
2007 - (43)	UV	3 médicaments
2008 - (39)	UV	47 médicaments
2008 - (42)	HPLC-MS/MS	Testostérone
2012 - (44)	HPLC-UV	4 médicaments
2012 - (47)	UPLC-UV	Carbamazépine
2014 - (48)	UV	7 composés
2014 - (46)	UV	21 médicaments

1.4.1 Fonctionnement du HPLC-MS/MS

La description du fonctionnement du HPLC-MS/MS est basée sur les travaux de Fountain *et al.* (49) et de Doig *et al.* (50). Un appareil HPLC-MS/MS établit un couplage entre un HPLC et un spectromètre de masse tandem (MS/MS). La chromatographie liquide permet de séparer les analytes de la matrice ou des analytes entre eux. Ensuite la détection et la quantification des composés sont réalisées par le spectromètre de masse. Un spectromètre de masse analyse les composés en fonction de leur ratio masse sur charge (m/z). Pour comprendre ce concept, un survol du fonctionnement de la source d'ionisation et de l'analyseur sera discuté dans ce chapitre. Les différentes composantes de l'appareil sont présentées à la **Figure 1.9**.

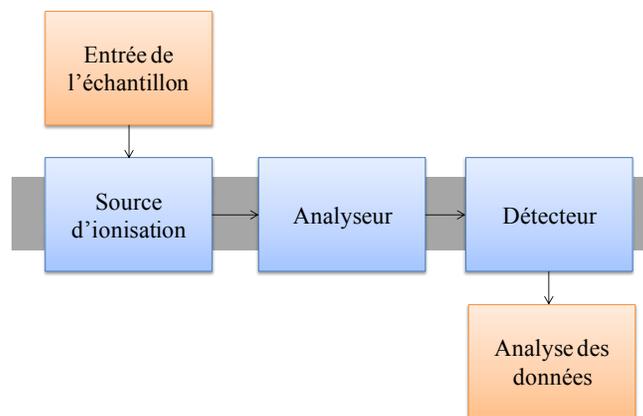


Figure 1.9 Composantes d'un spectromètre de masse

Dans le cas d'un appareil HPLC-MS/MS, l'échantillon qui entre dans la source d'ionisation du spectromètre de masse provient du chromatographe. Les composés analysés par HPLC sont majoritairement polaires et non volatils, ce qui réduit le nombre de sources d'ionisation adéquates pour leur quantification. La technique d'ionisation la plus utilisée est l'électronébulisation (ESI, *electrospray ionization*). L'ESI est une technique d'ionisation réalisée sous pression atmosphérique. L'échantillon provenant du chromatographe arrive sous forme liquide, dissous dans la phase mobile, dans le capillaire de la source d'ionisation. Un voltage est appliqué dans ce capillaire ce qui induit l'ionisation des molécules par la perte ou l'ajout d'un atome d'hydrogène. Elles peuvent posséder une charge négative (M^-) ou positive (MH^+) en fonction des groupements chimiques qu'elles contiennent. M^- correspond à la masse molaire de la molécule moins un atome d'hydrogène et MH^+ à la masse molaire plus un atome d'hydrogène. Suite à l'ionisation, l'échantillon est nébulisé sous forme de fines gouttelettes hors du capillaire. Sous l'effet de la chaleur existante dans la source, les gouttelettes sont peu à peu évaporées ce qui augmente la densité de charge, entraîne de la répulsion et, finalement, sépare les gouttelettes en de plus fines gouttelettes. Lorsque la phase mobile est complètement évaporée, l'échantillon se trouve dans une phase gazeuse ionique et les ions poursuivent leur chemin vers l'analyseur. À la **Figure 1.10**, une schématisation de l'ESI est présentée. Le vide est présent dans la source et l'azote peut être utilisé comme gaz d'électronébulisation. Cette technique est nommée vide d'azote. Elle maximise la désolvatation de l'échantillon et, ainsi, permet l'augmentation du débit des phases mobiles

pouvant entrer dans la source d'ionisation. De nos jours, les spectromètres de masse fonctionnent tous sous vide d'azote.

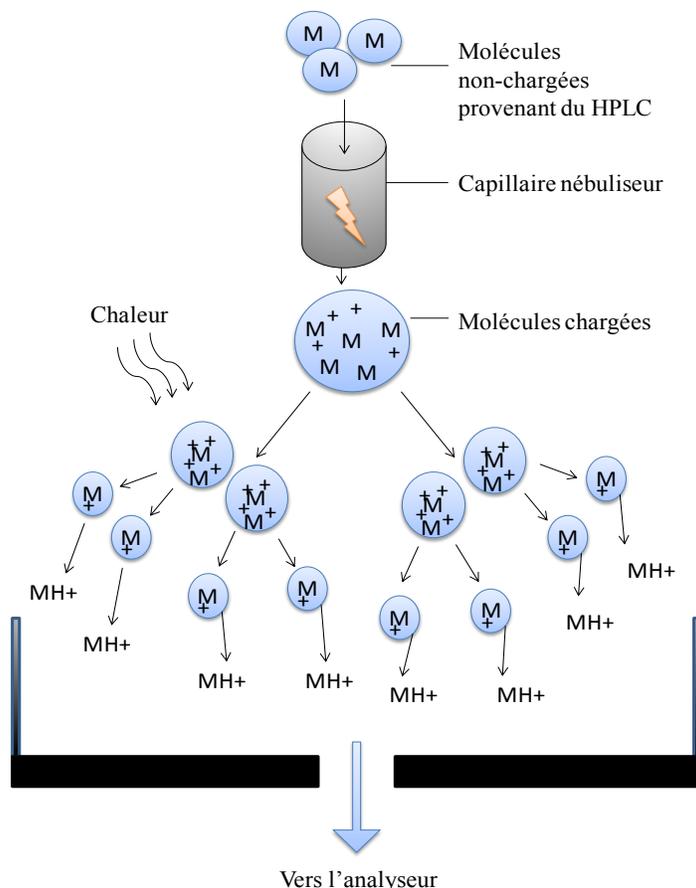


Figure 1. 10 Schématisation de l'ionisation par électronébulisation

Les ions sont guidés vers l'analyseur grâce au voltage existant dans le tube qui relie les deux composantes et au différentiel de pression. Seules les molécules possédant une charge se rendront à l'analyseur. Les molécules n'ayant pas subi d'ionisation seront exclues. La spectrophotométrie UV a essentiellement été remplacée par un analyseur à quadripôle pour l'analyse qualitative et quantitative de routine. Un quadripôle est composé de quatre tiges de métal conducteur (**Figure 1.11**). Un voltage ainsi que des radiofréquences sont appliqués à ces tiges. Les quatre tiges forment deux paires d'électrodes de charges opposées. Un ratio radiofréquence/voltage précis correspond sélectivement à un ratio m/z . Seuls les ions ayant ce ratio exact pourront atteindre le détecteur.

Cet analyseur peut être configuré sous forme de tandem (MS/MS) appelé triple quadripôle qui augmente exponentiellement les capacités de l'appareil. Il est composé d'un premier quadripôle (Q1), d'une cellule de collision (Q2) et d'un deuxième quadripôle (Q3). Un simple quadripôle permet d'analyser le ratio m/z de la molécule mère, M^- ou MH^+ , tandis qu'un triple quadripôle a la capacité d'être plus sélectif, car il permet l'analyse d'une transition de ratio m/z plutôt qu'un seul ratio m/z . Afin d'expliquer ce concept, l'exemple d'une molécule chargée ayant un ratio m/z de 455 sera détaillé. Le faisceau d'ions provenant de la source d'ionisation arrive au Q1. Les ions sont triés par le Q1 ce qui permet la sélection du m/z 455. C'est le ratio m/z précurseur. Les molécules ayant un m/z 455 sont ensuite dirigées vers le Q2 où elles sont fragmentées sous l'effet d'un voltage. Il y a donc création d'un nouveau faisceau d'ions constitué des fragments de la molécule ayant un ratio m/z 455. Les ions sont ensuite dirigés vers le Q3 afin de sélectionner un seul fragment provenant du Q2, par exemple un ratio m/z 162. C'est le fragment m/z . La transition de masse est la transition du m/z précurseur (455) \rightarrow m/z fragment (162). Le triple quadripôle est dit plus sélectif que le simple quadripôle puisqu'il est peu probable que deux molécules aient la même transition de masse comparativement à deux molécules mères ayant la même MH^+ ou M^- .

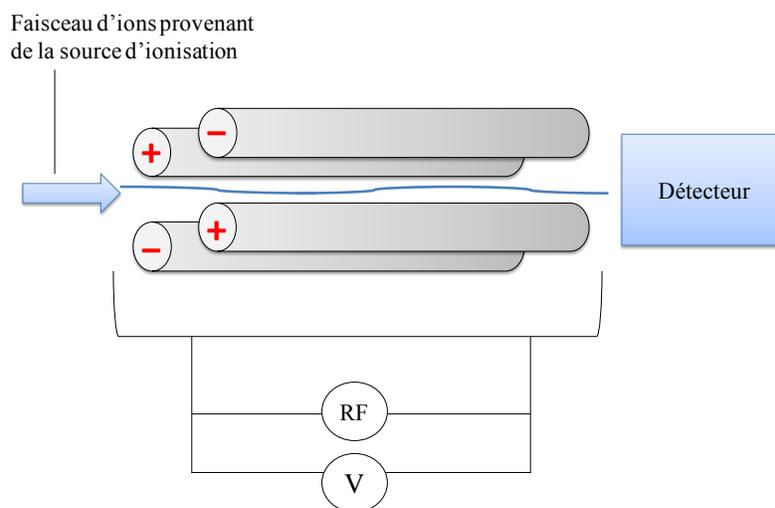


Figure 1.11 Schématisation de l'analyseur quadripôle
[Retracée de (49)]

1.4.2 Validation des méthodes bioanalytiques

Suite au développement d'une méthode analytique, cette dernière doit être validée afin d'assurer la fiabilité des résultats. Les agences réglementaires comme Santé Canada (51), la *Food and drug administration* (FDA) (52), l'Agence européenne du médicament (EMA) (53) ainsi que la Conférence internationale sur l'harmonisation (ICH) (54) ont développé des lignes directrices concernant les paramètres à valider. D'une agence réglementaire à l'autre, les paramètres à évaluer sont identiques, mais les critères d'acceptation diffèrent légèrement. Les méthodes d'analyse par HPLC-MS/MS, par exemple, doivent se conformer à ces exigences.

Les paramètres à valider sont la spécificité, la linéarité, l'exactitude, la précision, la limite de détection (LOD), la limite de quantification (LLOQ) ainsi que la robustesse. La spécificité est la capacité d'une méthode à évaluer de manière non équivoque l'analyte en présence d'autres composés. Les composés peuvent être issus de la matrice biologique dont faisait partie l'analyte comme du sang, du plasma ou de l'urine. Les composés pouvant interférer avec l'analyte peuvent également être des impuretés ou des produits de dégradation de la molécule d'intérêt. Dans le cas d'une solution contenant plusieurs analytes – une cassette – la méthode doit être en mesure d'être spécifique à chaque analyte. Pour tester la spécificité, l'analyte est analysé séparément puis en présence des autres composés. Le signal obtenu par le détecteur ne doit pas différer de plus de 20 %.

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à obtenir un signal qui est directement proportionnel à la concentration de l'analyte. La linéarité est testée pour une gamme de concentrations ainsi que pour un échantillon blanc (matrice) et un échantillon zéro (matrice et standard interne). Selon la FDA (52), la courbe de calibration doit être composée de six à huit points excluant l'échantillon blanc et zéro, mais incluant la plus petite concentration quantifiable. Un minimum de quatre points sur six doivent respecter les critères suivants : (1) un maximum de 20 % de différence entre la valeur obtenue et la valeur nominale pour la LLOQ; (2) un maximum de 15 % de différence entre la valeur obtenue et la valeur nominale pour les autres concentrations.

L'exactitude est la capacité d'une méthode analytique à obtenir un signal pour une concentration connue qui est près de la valeur identifiée comme vraie. L'exactitude doit être testée, au minimum, à trois concentrations de l'intervalle de linéarité : à la LLOQ, à une concentration au centre de la linéarité (MOL) et à la limite supérieure de quantification (ULOQ). La plus haute concentration quantifiable doit faire partie de l'intervalle de linéarité. La valeur mesurée doit être comprise dans $\pm 15\%$ de la valeur nominale pour la MOL et la ULOQ. La variabilité permise pour la LLOQ est de $\pm 20\%$. La précision est la capacité d'une méthode analytique à obtenir des résultats ayant des valeurs rapprochées pour une série de mesures données. Elle est exprimée sous forme d'écart-type ou de coefficient de variation de la valeur moyenne. Elle est évaluée aux mêmes concentrations que l'exactitude. Le coefficient de variation ne doit pas excéder 20% pour la LLOQ et ne doit pas excéder 15% pour les deux autres concentrations testées.

La LOD est la plus petite quantité d'analyte pouvant être détectée par l'instrument sans pour autant être quantifiée tandis que la LLOQ est la plus petite quantité d'analyte pouvant être quantifiée de manière exacte et précise. Il est important d'établir la LLOQ lorsque la teneur dans les échantillons à analyser est faible. La limite de détection peut être déterminée selon plusieurs méthodes soient par évaluation visuelle, par le ratio signal/bruit (SNR) ou par l'écart-type (ET) du signal du blanc. Un SNR de 3:1 est représentatif de la limite de détection. La détermination de la limite de quantification peut être réalisée selon les mêmes méthodes d'évaluation que la limite de détection. Un SNR de 10:1 (ICH) ou de 5:1 (FDA) est représentatif de la limite de quantification (52, 54).

La robustesse est la capacité d'une méthode analytique à ne pas être affectée par un petit changement, significatif et délibéré, de l'usage normal de l'instrument. Par exemple, le changement du lot de la colonne utilisée dans l'appareil HPLC, une variation du pH des phases mobiles, la température de la colonne, etc. Dans le cas de la chromatographie liquide, la méthode sera considérée robuste s'il n'y a pas de changement significatif du temps de rétention ou de l'intensité du signal obtenu par le détecteur suite au petit changement.

1.5 Vers le développement du modèle néoPAMPA

Les tests *in vitro* non cellulaires de l'évaluation de la perméabilité sont importants dans le domaine pharmaceutique et, surtout, lors de la phase de découverte du médicament. Ces modèles sont utilisés abondamment afin de réduire le nombre de molécules candidates prometteuses pour le traitement d'une maladie visée. Les modèles *in vitro* non cellulaires sont préférés aux modèles *in vitro* cellulaires dû à leur application pour le criblage à haut débit. Par contre, ils sont souvent critiqués concernant leur représentativité biologique. Le modèle PVPA présenté à la section 1.3.2 est, jusqu'à ce jour, le modèle qui représente le mieux la réalité cellulaire de l'intestin. La membrane étant composée de liposomes, les molécules doivent traverser des bicouches lipidiques afin d'atteindre le côté basolatéral. Par contre, en réalité, la perméabilité des molécules est gouvernée par le passage au travers d'une seule bicouche lipidique, soit le côté apical des entérocytes.

1.5.1 Hypothèse et objectifs

Des modèles PAMPA ont été présentés à la section 1.3.1. Les modèles de Kansy *et al.* (29), Wohnsland *et al.* (32), Zhu *et al.* (36) et de Kerns *et al.* (37) manquent de représentativité biologique, mais ils sont peu coûteux. Au contraire, les membranes proposées par Sugano *et al.* (33), Avdeef *et al.* (35), Seo *et al.* (34) et Chen *et al.* (39) sont composées de plus d'un type de lipides ce qui est plus représentatif de la paroi intestinale. Cependant, ces membranes sont plus coûteuses à produire puisque les lipides anioniques sont dispendieux. L'objectif général de ce mémoire est donc d'optimiser et de conditionner un nouveau modèle *in vitro* non cellulaire de l'évaluation de la perméabilité qui soit biologiquement plus représentatif de la paroi intestinale et à moindre coût. Ce modèle, nommé néoPAMPA, est constitué d'un filtre qui agit à titre de support, d'un coussin de polydopamine (pDA) qui apporte de la fluidité à la membrane et d'une bicouche lipidique supportée par le coussin de polydopamine (**Figure 1.12**).

Le modèle néoPAMPA sera biologiquement plus représentatif de la paroi intestinale humaine et, par conséquent, permettra une meilleure corrélation entre les résultats de

coefficients de perméabilité et la fraction absorbée chez l'humain que le test PAMPA traditionnel.

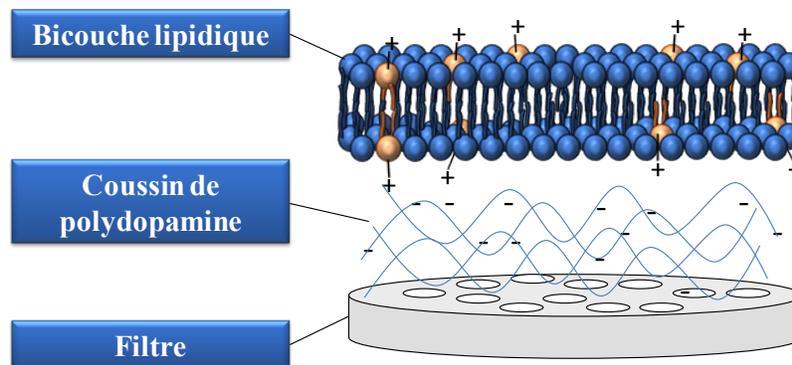


Figure 1.12 Modèle membranaire néoPAMPA

Les objectifs de ce projet étaient donc de:

1. Développer et valider une méthode analytique pour la quantification des molécules utilisées dans les tests PAMPA et néoPAMPA;
2. Évaluer la perméabilité des molécules avec le PAMPA à titre d'essai contrôle du test néoPAMPA;
3. Optimiser les composantes du test néoPAMPA;
4. Évaluer la stabilité des membranes néoPAMPA en fonction de différentes conditions d'entreposage

Chapitre 2: Validation of a HPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of eight standard drugs used in permeability assays

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

Marie-Eve Leclaire¹, Isabelle Marcotte² and Grégoire Leclair^{1*}

¹ Department of Pharmacy, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

² Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, and Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels, P.O. Box 8888, Downtown Station, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

*Corresponding author: Grégoire Leclair

2.1 Résumé en français

Une nouvelle méthode de chromatographie liquide haute performance couplée à une source d'électronébulisation et à un spectromètre de masse triple quadripôle (HPLC-ESI-MS/MS) a été développée afin de quantifier simultanément huit molécules standards utilisées dans les tests de perméabilité intestinale. Le vérapamil, le propranolol, le kétoconazole, le kétoprofène, l'antipyrine, l'aténolol, le furosémide et l'hydrochlorothiazide (HCT) ont été choisis pour représenter les quatre classes du système de classification biopharmaceutique (BCS). Suite au développement de la méthode analytique, celle-ci a été validée selon les spécifications des lignes directrices de la FDA et de l'EMA. La sélectivité, la linéarité, l'exactitude, la précision et la robustesse de la méthode analytique ont été mesurées. La méthode analytique était conforme aux spécifications des agences réglementaires. La suppression de signal était inférieure à 20 % pour les huit molécules (89 % - 102 %); la linéarité a été démontrée pour une gamme de concentrations équivalente à deux logarithmes pour un minimum de 6 concentrations; les données d'exactitude étaient entre 80 % et 120 % à la limite inférieure de quantification (LLOQ) (104 % - 115 %); et entre 85 % et 115 % à la concentration moyenne de la gamme linéaire (MOL) et à la limite supérieure de quantification (ULOQ) (97 % - 115 %). Un test de perméabilité *in vitro*, le *parallel artificial membrane permeability assay* (PAMPA), a été réalisé avec la cassette des huit molécules standards. La perméabilité des médicaments a été quantifiée en utilisant la méthode analytique validée. Les résultats obtenus concordaient avec les résultats de la littérature. Cette nouvelle méthode analytique peut maintenant être utilisée pour la quantification de huit médicaments standards de la perméabilité. Cette méthode sera utile pour la vérification de routine et la calibration des essais de perméabilité existants ainsi que pour le développement de nouveaux essais.

Mots clés : HPLC-ESI-MS/MS, PAMPA, perméabilité, BCS, criblage à haut débit, quantification simultanée

2.2 Résumé en anglais

A new method based on HPLC-ESI-MS/MS was developed to simultaneously quantify eight standard compounds used in intestinal permeability assays. Verapamil, propranolol, ketoconazole, ketoprofen, antipyrine, atenolol, furosemide and hydrochlorothiazide were chosen to represent the four classes of the biopharmaceutical classification system. After development, the optimized method was validated according to FDA and European Medicines Agency guidelines (EMA). The selectivity, linearity, accuracy, precision and robustness of the analytical method were evaluated. The analytical method complied with the specifications established by the regulatory agencies. Ion suppression was lower than 20 % for the eight molecules (89 % - 102 %); linearity was shown for a range of two logarithms of concentrations with a minimum of six levels; accuracy values were within 80 % and 120 % at LLOQ (104 % - 115 %); and within 85 % and 115 % at middle of linearity (MOL) and upper limit of quantification (ULOQ) (97 % - 115 %). An *in vitro* parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) was performed using a pooled solution of the eight standards. The permeability of the standard drugs was quantified using the validated analytical method. The calculated permeability results were in agreement with previously published data. This new analytical method can now be utilized for the quantification of the eight intestinal permeability standards. The simultaneous quantification of these standard drugs has the potential to provide standardization between different PAMPA assays. The method will be useful for the routine verification and calibration of existing permeability assays as well as for the development of novel permeability assays. It will also allow the verification and the calibration of permeability assays as well the comparison of intra-laboratory and inter-laboratory results.

Keywords: HPLC-ESI-MS/MS, PAMPA, permeability, BCS, high-throughput, simultaneous quantification

2.3 Introduction

High throughput assays have been developed to evaluate absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox) of new chemical entities (NCE) during the early stages of drug discovery. Among these biopharmaceutical properties, intestinal absorption is dependent on the solubility and the permeability of a molecule. Based on these properties and their effect on absorption, the biopharmaceutical classification system (BCS) is used to differentiate compounds between four classes: (I) Solubility and permeability are not limiting the absorption of the compound; (II) Solubility is limiting, while permeability is not; (III) Solubility is not limiting but permeability is limiting; and (IV) both the solubility and permeability are limiting (55). The classification of new drug candidates is important because prioritization of molecules with the best biopharmaceutical properties enhances the probability of success during the later phases of drug development as these compounds will demonstrate better bioavailability.

Absorption evaluation of new drugs can be realized using *in vitro* intestinal permeability assays. The most common are parallel artificial membrane permeability assays (PAMPA) and Caco-2 cell assays (56). PAMPA is a non-cellular assay composed of a hydrophobic polyvinylidene fluoride (PVDF) filter soaked in egg lecithin solubilized in dodecane (29, 39, 57). Permeability is evaluated by the quantification of drugs passing through this membrane, from a donor to a receiver compartment. Only the contribution of passive diffusion to permeability is determined by PAMPA because no active transporter is involved. On the other hand, Caco-2 is a cellular assay consisting of a hydrophilic polycarbonate filter supports carcinogenic human colon cells grown to confluence. This assay evaluates diffusion and active transport as cells membranes have influx (apical to basal side) and efflux (basal to apical side) transporters.

PAMPA are widely used in research laboratories and pharmaceutical companies since they present an efficiency advantage over Caco-2 assay where cell culture must grow for a minimum of 21 days. Laboratories have developed several variations from the original PAMPA model to meet different needs (58). Skin-PAMPA, for example, was designed to

evaluate skin penetration of different active drugs like topical corticosteroids used to treat inflammatory skin disorders (56, 59). Blood brain barrier PAMPA was also developed to assess the permeability of drugs across this protective barrier (60). Many parameters can be adapted for each specific PAMPA tests: type and composition of lipids, temperature of incubation, speed of agitation during diffusion, as well as pH of buffer solution (36, 61, 62).

Modifications of PAMPA parameters can result in 4 to 60 fold differences in the apparent permeability of a given molecule (37, 39, 63). Therefore, it is critical to validate and calibrate PAMPA assays using compounds of known permeability in order to be able to use the permeability results. These standard compounds should include two known drugs from each of the four BCS classes to ensure the accuracy and the robustness of the permeability assay (64). The quantification of several standard drugs can be tedious and time-consuming if individual assays have to be performed for each control compound. To increase the assay efficiency, multiple compounds can be pooled and simultaneously assayed using a suitable method. The drawback of this strategy would be the competition for specific transport mechanisms which is not an issue in the case of PAMPA as only passive diffusion is evaluated, contrary to Caco-2 assays.

The most common analytical methods for the quantification of drugs tested by PAMPA are UV spectrophotometry, HPLC-UV and HPLC-MS (41, 47, 48, 56, 65, 66). These instruments are useful but limited with respect to the simultaneous quantification of several compounds, or are not sensitive enough to quantify pooled molecules with a large range of physicochemical properties. A few publications report the simultaneous quantification of compounds by HPLC-MS/MS in the context of PAMPA. An HPLC-MS/MS method was described by Dobricic *et al.* (67) but the different steroids were analysed individually, and not in a pooled solution. Another study quantified two standards from class I (verapamil) and class IV (mannitol) by HPLC-MS/MS to evaluate the permeability of sotalol, but the four BCS classes were not represented since only two standards were analyzed (68).

There is therefore a need to develop a sensitive and accurate analytical method for the simultaneous quantification of standard drugs used in intestinal permeability assays. To our

knowledge, no standardization method for the quantification of more than two standard drugs used in permeability assays has been reported. Moreover, the eight standard drugs comes from the four BCS classes. The analytical method developed in this work is a need to verify, validate and calibrate existing and new permeability assays. In this work, we developed a high performance HPLC-ESI-MS/MS method to quantify eight standard drugs. This method was validated according to EMA and FDA guidelines (52, 53) and was used for the validation of a PAMPA assay. This HPLC-ESI-MS/MS method was designed to be routinely used by pharmaceutical laboratories to enhance the accuracy and the robustness of PAMPA results. This method will ensure the standardization of permeability assays by the relative comparison of the permeability coefficients of the eight controls.

2.4 Materials and method

2.4.1 Chemicals

Atenolol ($\geq 98\%$), ketoconazole ($\geq 98\%$), verapamil hydrochloride ($\geq 99\%$), antipyrine (99%), labetalol (98%) and n-dodecane were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Furosemide (97%), propranolol hydrochloride (99%) and ketoprofen (98%) were obtained from AK Scientific Inc. (Union City, CA, USA). Hydrochlorothiazide (98%) was purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Egg lecithin was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Methanol, acetonitrile, formic acid (FA) and monobasic potassium phosphate were supplied by Fischer Scientific (Ottawa, ON, Canada). Sodium hydroxide was purchased from ACP Chemicals Inc. (Quebec City, QC, Canada). Dimethylsulfoxide (DMSO) was obtained from EMD Millipore (Gloucester, NJ, USA)

2.4.2 Preparation of test, standard and control solutions

PBS (pH 6.4; 0.2 M) was prepared according to USP specifications (69). Stock solutions (1 mM) of the eight standard drugs were all prepared using different solvents to allow complete dissolution. Propranolol, verapamil, atenolol, antipyrine and ketoprofen stock solutions were all prepared in PBS. Hydrochlorothiazide stock solution was prepared in methanol while furosemide was prepared in methanol-PBS (1:4, v/v) and ketoconazole was

prepared in DMSO-PBS (1:4, v/v). Stock solutions were combined and further diluted with PBS to obtain a pooled test solution (10 μM) containing small proportions of methanol (1.2 %) and DMSO (0.2 %). All standard and control solutions were prepared at the required concentrations by diluting the pooled test solution with PBS. All stock solutions were stored at 4 °C and protected from light as ketoconazole, furosemide and hydrochlorothiazide are photosensitive.

2.4.3 Preparation of injection solutions

Injection solutions were prepared by diluting the samples (170 μL) with the internal standard (ISTD), namely 30 μL of labetalol 6.66 μM and FA 1.33 % in acetonitrile. Blank samples consisted of PBS while zero samples were prepared by adding the ISTD to the matrix as described above.

2.4.4 HPLC-ESI-MS/MS system

An Agilent Technologies (Mississauga, ON, Canada) HPLC 1100 series paired with a Sciex (Framingham, MA, USA) API4000 QTRAP triple quadrupole was used for the sample analysis. This instrument comprised a degassing system (G1379A), a binary pump (G1312A), a refrigerated autosampler (G1367A), a column oven (G1316A), a turbo electrospray ionisation source (ESI) and was controlled by the Analyst 1.6.1 software. Scan mode was set at multiple reactions monitoring (MRM) and the dwell time was 50 ms.

The chromatographic parameters are summarized in **Table 2.1**. The MS source used nitrogen gas and was set at a temperature of 350 °C, a gas flow of 50 L/min, a nebulizer pressure of 25 psi and capillary voltage at 5500 V in positive ESI mode and at 4500 V in negative ESI mode.

To determine the precursor and fragment ions, non-pooled drug solutions (1 μM) were directly injected (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) in the ion source of the mass spectrometer. After full-scan analysis (m/z 80 to 430) of each compound, including the ISTD, the most abundant ion was selected as precursor ion. Precursor ions were then fragmented in the second quadrupole and the most abundant fragment was retained to obtain the mass transition of each molecule. The

results are shown in **Table 2.2**. The declustering potential (DP) and the collision energy (CE) were optimized by voltage variation to enhance molecular ion sensibility and to obtain the best fragment ion sensibility, respectively. These optimized parameter values and ESI mode are listed in **Table 2.2**. The HPLC-ESI-MS/MS method was built in the period mode. Periods are defined by a range of time in which polarity is positive or negative and only compounds eluting in this period are targeted and quantified. Period sequence relative start times, number of scans per period and analyzed compounds are reported in **Table 2.3**.

Table 2.1 Chromatographic parameters used for the separation of the eight standard drugs

Column	YMC-Pack ODS AQ		
	50 mm x 3 mm, 5 μm, 12 nm		
Column temperature	45 °C		
Autosampler temperature	4 °C		
Injection volume	4 μ L		
Flow rate	0.9 mL·min ⁻¹		
Mobile phase	A: water + 0.2% FA B: acetonitrile + 0.1% FA		
Gradient	Time (min)	% A	% B
	0	98	2
	0.5	98	2
	7	5	95
	8	2	98
	8.2	98	2
	10.2	98	2

Table 2.2 Mass transitions and ionization parameters of the eight standard drugs and internal standard

Molecules	Monoisotopic MW (g·mol⁻¹)	Precursor ion (g·mol⁻¹)	Fragment ion (g·mol⁻¹)	DP^C (V)	CE^D (V)	ESI polarity
Verapamil	454.3	455.2	165.0	76	41	+
Propranolol	259.2	260.3	116.2	60	25	+
Ketoconazole	530.2	530.8	82.2	105	87	+
Ketoprofen	254.1	255.1	209.0	60	20	+
Antipyrine	188.1	189.2	77.0	60	58	+
Atenolol	266.2	267.3	145.2	41	37	+
Furosemide	330.0	329.0	285.0	-70	-21	-
HCT^A	296.9	296.0	268.9	-95	-28	-
Labetalol^B	328.4	329.1	91.0	65	61	+

^A Hydrochlorothiazide (HCT). ^B Labetalol was the internal standard (ISTD). ^C Declustering potential (DP). ^D Collision energy (CE).

Table 2.3 Detection mode periods used for the identification of the eight standard drugs and internal standard

Period	ST ^A (min)	RT ^B (min)	Compound	Polarity
1	0.00	1.93	Atenolol	Positive
2	2.15	2.34	Hydrochlorothiazide	Negative
3	2.70	2.91	Antipyrine	
		3.17	Labetalol	Positive
		3.32	Propranolol	
4	3.50	3.80	Ketoconazole	Positive
		3.84	Verapamil	
5	3.92	4.03	Furosemide	Negative
6	4.33	4.64	Ketoprofen	Positive

^A Start time of period.

^B Retention time of compound (RT).

2.4.5 Method validation

The validation of the method was realized according to the EMA and FDA guidelines for industry (52, 53, 70). To do so, the selectivity, linearity, LOD, LLOQ, accuracy, precision and robustness were assessed for the pooled compounds. The selectivity was determined by comparing the LLOQ of pooled and non-pooled compounds (n = 5), and results had to demonstrate that there was no ion suppression. According to FDA guidelines, standard curves should contain six to eight non-zero samples, therefore linearity was evaluated for thirteen concentrations to cover the linearity range of the eight molecules (n = 5). Moreover, the accuracy of the back calculated concentrations should range between 80 % and 120 % at LLOQ and between 85 % and 115 % at higher concentrations. The LOD and LLOQ values respectively corresponding to 3 and 5 times the signal-to-noise ratio (SNR) were evaluated to determine the sensitivity of the method. Accuracy and precision were measured at three concentration levels in five replicates: (1) LLOQ, (2) middle of linearity (MOL); and (3) upper limit of quantification (ULOQ). According to the EMA and FDA guidelines, accuracy results must be between 80 % - 120 % at LLOQ; and between 85 % - 115 % at the MOL and ULOQ. Precision specifications should be no more than 20 % of error at LLOQ and no more than 15 % at MOL and ULOQ. Precision and accuracy were measured for pooled compounds; however LLOQ, MOL and ULOQ concentrations differed between molecules because of their

difference in the range of linearity. The robustness of the method was evaluated by reproducing measurements with a YMC-Pack ODS-AQ column from different lot numbers (#0305001213 and #0305001168).

2.4.6 Application of the method to permeability assay samples

PAMPA was performed as described by Kansy *et al.* (29). Briefly, 96-well filter plates (PVDF, hydrophobic, 0.45 μm ; EMD Millipore) were soaked with egg lecithin in dodecane (1:100, w/v) during 5 minutes. Then the pooled standard drugs solution (200 μM , 200 μL) was loaded in the top compartments while the receiver compartments of the plate (EMD Millipore) were filled with blank PBS (300 μL). The plates were incubated during 16 h (37 $^{\circ}\text{C}$, 50 rpm rocking mixer). After incubation, the samples were collected from the receiver compartments and quenched as described in section 2.5.3. A control sample was taken from the donor compartment at time zero, diluted 100-fold using PBS, and then quenched as described above.

The calculation of diffusion is based on Fick's first law. To simplify the calculation of the apparent permeability, three assumptions were made: (1) the concentration of the donor compartment was considered constant because its concentration is much higher than the receiver compartment was much lower than the concentration in the donor compartment; (2) the membrane is two-dimensional and its thickness will be constant during the experiment; (3) the apparent permeability of the membrane will not change during the experiment. The volume of the receiver compartment was considered in the equation (Eq. 2.1) (66, 68) as it provided a better approximation of the diffusion. According to the previous assumptions, the simplified equation is:

$$P_{app} = \frac{Q}{t S C_0} = \frac{C_r V_r}{t S C_0} = \frac{AUC_r V_r}{t S AUC_{C_0}} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

where, P_{app} : apparent permeability; Q : quantity of diffused drug at the end of the assay; t : duration of the assay; S : surface of the membrane; C_0 : initial concentration in the donor compartment; C_r : concentration in the receiver compartment at the end of the assay; V_r : volume of the receiver compartment; AUC_r and AUC_{C_0} : integration signals for the receiver sample at the end of the assay and for the donor sample at the beginning of the assay, respectively.

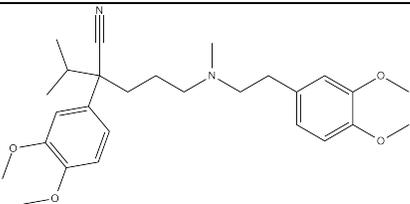
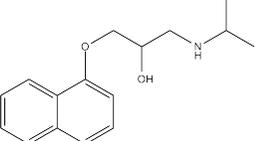
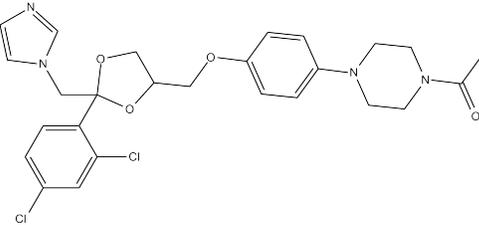
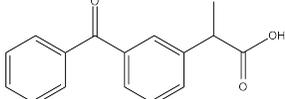
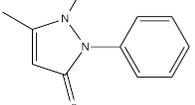
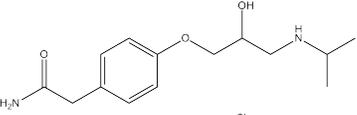
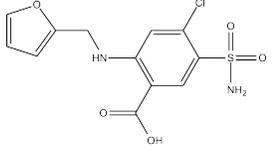
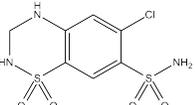
2.5 Results and Discussion

A sensitive and accurate HPLC-ESI-MS/MS method was developed to simultaneously quantify eight standard drugs used in intestinal permeability assay. These eight drugs come from the four BCS classes to ensure an accurate permeability assay calibration. The analytical method developed in this work can be used to verify and validate permeability assays as PAMPA. To develop this method, drugs were first selected and chromatographic parameters were optimized to obtain an elution time under five minutes and a peak resolution allowing the separation of the method in defined period. Spectrometric parameters were then optimized. This method was applied to the *in vitro* PAMPA test, and permeability coefficients were calculated. Results were compared with literature values.

2.5.1 Selection of standard drugs

Two drugs within each of the four BCS classes were selected to cover the permeability range expected for control compounds. The choice was also based on the diversity of their physicochemical properties. Verapamil and propranolol (class I) (71), ketoconazole and ketoprofen (class II) (72, 73), atenolol and antipyrine (class III) (39, 72), and finally furosemide and hydrochlorothiazide (class IV) (71, 73) were chosen. The structures of these molecules and their classification are shown in **Table 2.4**. Seven of these eight compounds are recommended by the FDA guidelines as good standards to evaluate the suitability of a permeability assay (74).

Table 2.4 Molecules structure and classification of the eight standard drugs

Molecule	Structure	BCS class
Verapamil		I
Propranolol		I
Ketoconazole		II
Ketoprofen		II
Antipyrine		III
Atenolol		III
Furosemide		IV
Hydrochlorothiazide		IV

2.5.2 Development of chromatographic conditions

After a literature review of the various mobile phases employed for the chromatographic separation of these molecules (75-81), different solvents were tested. Water-FA (0.1:100, v/v and 0.2:100, v/v) was tested as aqueous mobile phase, while acetonitrile-FA (0.1:100, v/v and 0.2:100, v/v) and methanol-FA (0.1:100, v/v and 0.2:100, v/v) were evaluated as the organic mobile phase. The determination of the suitable mobile phases for

pooled samples was based on the peak resolution and intensity. Water-FA (0.2:100, v/v) and acetonitrile-FA (0.1:100, v/v) were selected as the best mobile phase for the eight pooled compounds. The mobile phase gradient was optimized to achieve complete elution within 5 min and to ensure retention of highly polar compounds such as atenolol. The final gradient began at 98 % of aqueous mobile phase and decreased to 5 % in 6.5 min. The retention time of atenolol was 2.0 min and that of ketoconazole - the last eluted drugs - was 4.9 min. **(Figure 2.1)**

The BCS classes of the eight compounds were different because of their respective chemical properties, thus two types of polar aqueous column were tested, i.e., the Hypersil Gold Aq and the YMC-Pack ODS AQ. The stationary phase of these columns is end-capped with polar groups to enhance the retention time of hydrophilic compounds. The YMC-Pack column was finally selected for its ability to separate the eight standard drugs, thus allowing the use of a period method.

The preparation of the injected sample was optimized by evaluating different organic solvent proportions. The AUCs of pooled samples at 0.1 μ M were compared for 10 %, 15 % and 20 % organic phase. Our results (not shown) showed that the peak intensity was higher at 15 % versus 10 % of organic phase for seven of the eight drugs. The peak intensity was also higher at 15 % compared to 20 % of organic phase for five of the eight molecules.

The final analytical method employed a period mode but the switching mode was also considered. In the switching mode, the analysis time continuously cycles between the positive and negative modes. Therefore, during the elution of a given molecule, the number of measurements is divided by two since the acquisition rapidly switches from one mode to the other. Due to the minimum settling time of 700 ms and a pause of 5 ms between each switch, the number of sampling per peak was insufficient. However, good chromatographic resolution of each peak allowed the use of defined periods of positive and negative ionization modes and increased detector resolution. A typical chromatogram of the pooled drugs sample is presented in **Figure 2.1**.

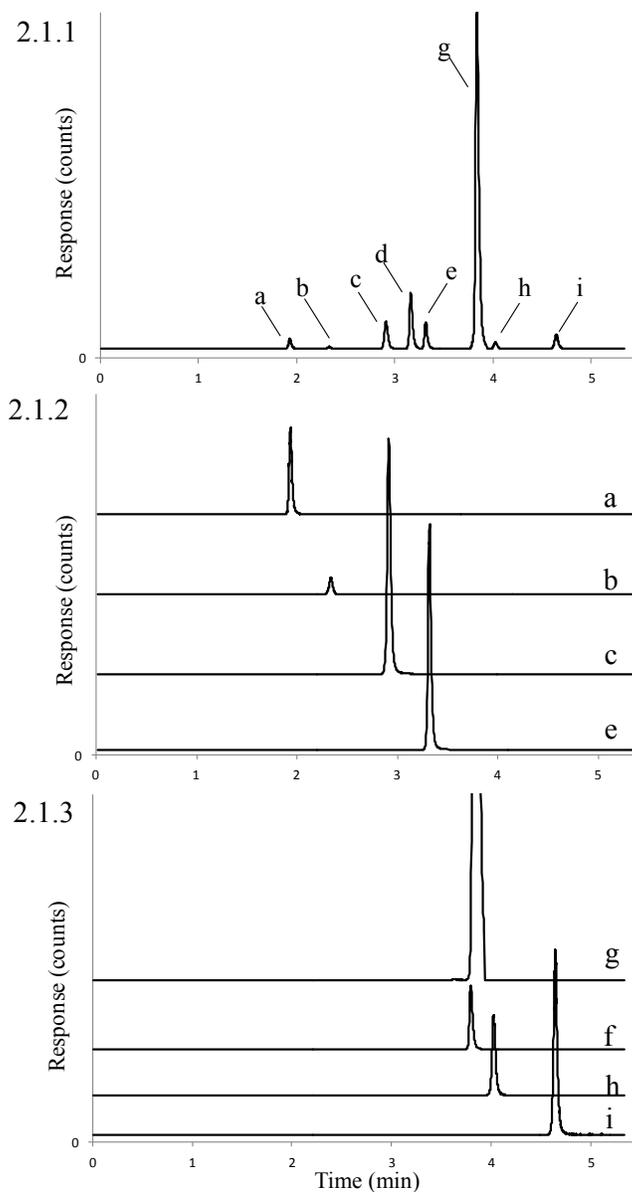


Figure 2.1 Chromatograms of the eight molecules

2.1.1 Representative total ion chromatograms of the eight permeability standards (1 μM) and the ISTD. a) atenolol; b) hydrochlorothiazide; c) antipyrine; d) labetalol; e) propranolol; g) verapamil; h) furosemide; and i) ketoprofen. Coelution of ketoconazole and verapamil was observed at 3.9 min. Compounds eluted within 5 minutes and their resolution allowed the use of period mode. **2.1.2** Ion chromatograms of the first four molecules were a) Extracted-ion chromatogram (XIC) of atenolol b) XIC of hydrochlorothiazide c) XIC of antipyrine e) XIC of propranolol **2.1.3** Ion chromatograms of the last four molecules f) XIC of ketoconazole g) XIC of verapamil h) XIC of furosemide i) XIC of ketoprofen.

2.5.3 Validation of the method

The validation of the analytical method was realized according to FDA and EMA specifications as described in section 2.5 (52, 53). Selectivity results ranged between 89 % and 102 % as detailed in **Table 2.5**. The eight compounds complied with selectivity specifications of less than 20 % ion suppression (80 % to 120 % recovery) between pooled and non-pooled drugs. The highest ion suppression was observed with verapamil (89 %). This can be caused by the co-elution of ketoconazole and verapamil which have retention times of 3.59 min and 3.62 min, respectively, but no effect was seen on ketoconazole's peak intensity (102 %).

Table 2.5 Validation of the HPLC-ESI-MS/MS method

	Verapamil	Propranolol	Ketoconazole	Ketoprofen	Antipyrine	Atenolol	HCT	Furosemide
Selectivity (%)	89	98	102	98	102	94	100	90
Linearity range (µM)	0.0098-1.25	0.0098-1.25	0.156-5.0	0.039-5.0	0.0098-1.25	0.0098-1.25	0.019-2.5	0.039-5
R²^A	0.9978	0.9989	0.9987	0.9994	0.9995	0.9998	0.9999	0.9998
LOD (nM)	2.4	2.4	19.0	19.0	2.4	2.4	9.8	19.0
LLOQ (nM)	9.8	9.8	156.0	39.0	9.8	9.8	19.0	39.0
Accuracy (%)								
-LLOQ	115	115	108	104	109	111	115	106
-MOL	115	105	107	103	113	112	107	104
-ULOQ	102	97	104	104	97	106	109	103
Precision (%)								
-LLOQ	5	8	4	3	6	3	3	4
-MOL	4	1	3	2	1	1	2	2
-ULOQ	2	1	2	2	2	1	1	1

^A Regression coefficient (R^2).

The drugs concentrations were found to be linear over a minimum of six levels as shown in **Table 2.5**. More specifically, the linearity of verapamil, propranolol, antipyrine and atenolol was ensured from a concentration of 0.0098 µM to 1.25 µM; hydrochlorothiazide from 0.019 µM to 2.5 µM; ketoprofen and furosemide from 0.039 µM to 5.0 µM; and ketoconazole from a 0.156 µM to 5.0 µM. The concentrations of atenolol, hydrochlorothiazide and propranolol were linear up to 5 µM but a maximum of 8 points had to be retained regarding industry guidelines. The range of concentrations was considered to be linear when a minimum of four over six concentrations respected the following specifications: accuracy must range between 80 % and 120 % at LLOQ and between 85 % and 115 % at MOL and ULOQ. The regression coefficients were calculated and ranged from 0.9978 to 0.9999. Higher concentrations for the other five compounds resulted in quadratic fitting, but only the linear section was considered. Weighted least squares linear regression (WLSLR) was applied to all standard curves to improve accuracy of the lower concentrations. This is an analytical standard

practice because homoscedasticity is almost never met when x-values are larger than one order of magnitude. In the article of Almeida et al., WLSLR was applied because x-values range from nanomolar to micromolar and therefore variance of lower concentrations did not have enough weight compared to higher concentrations (82).

LODs ranged between 2.4 and 19 nM, thus allowing detection of low concentrations. LLOQs varied between 9.8 and 39 nM; only ketoconazole had a LLOQ value of 156 nM. Data are listed in **Table 2.5**. LODs and LLOQs were measured at 3:1 and 5:1 SNR, respectively. The highest LLOQ was obtained for ketoconazole probably due to the co-elution of verapamil. Verapamil had a higher peak intensity compared to ketoconazole which generated a higher noise in this period, but noise did not affect verapamil sensitivity as much as ketoconazole's because the AUC of this latter was 100 times lower. However, samples concentrations after permeability assays were higher than ketoconazole LLOQ. Ketoconazole (BCS II) presented a permeability superior to $1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, thus the concentration recovered in the receiver compartment after permeability assay was 3.6 μM .

Accuracy and precision were measured in five replicates at each concentration as shown in **Table 2.5**. The accuracy at LLOQ ranged between 104 % and 115 %; between 103 % and 115 % at MOL; and between 97 % and 102 % at ULOQ. The specifications guidelines are 80 % to 120 % at LLOQ and 85 % to 115 % at the other two tested concentrations. Therefore, all compounds met accuracy and precision specifications at LLOQ, MOL and ULOQ. The internal standard AUC were steady over the analysis with no more than 4.7 % variation. Data precision showed very low variability ranging from 3 % to 8 % at LLOQ; 1 % to 4 % at MOL; and 1 % to 2 % at ULOQ. The higher was the concentration, the higher was the precision. Nevertheless, the precision specifications were met since no more than 20 % at LLOQ and no more than 15 % of variation was observed at the MOL and ULOQ. These accuracy and precision results prove the reproducibility of the 8 selected standard drugs and of the analytical method.

The use of the periodic method versus the switching mode allowed the quantification of specific molecules over a defined range of time. With switching mode, however, the time of

analysis was divided between eight molecules, thus reducing the number of measurements per peak and increasing the noise. The periodic mode provided a higher sensitivity.

Finally, the robustness of the analytical method was tested with two columns of different lot. As shown in **Figure 2.2**, the peak shape and retention times are similar on the chromatograms obtained with the two columns. The retention times of the eight molecules did not differ by more than 0.13 min between two columns, demonstrating the robustness of the method.

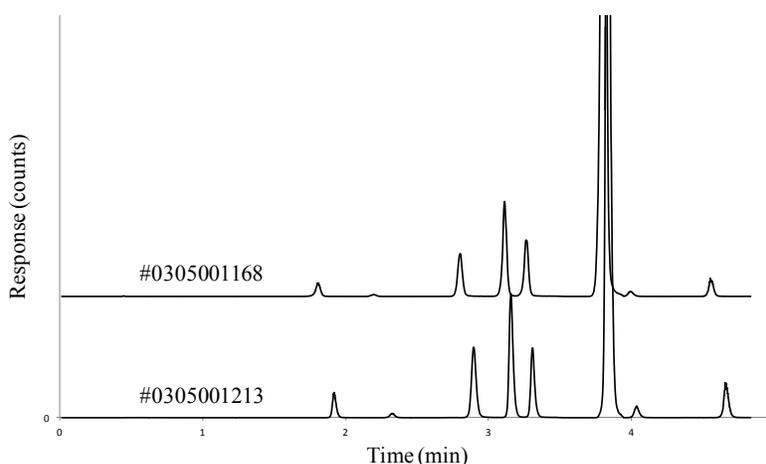


Figure 2.2 Comparison of chromatograms from two different lots of column

2.5.4 Application of standard drugs to permeability assays

The validated HPLC-ESI-MS/MS method was used to verify and calibrate the PAMPA by comparing permeability between BCS classes. The 8 pooled standard drugs were quantified in the receiver compartment after the PAMPA assays as well as the initial concentration of the solution in the donor compartment. As the PAMPA membrane contained egg lecithin, its presence in the test samples was quantified by HPLC-ESI-MS/MS (data not shown) and it was not detected; therefore no further evaluation of matrix effect was performed. The concentrations of molecules recovered in the receiver compartment after diffusion were higher than their respective LLOQs and within the linearity domain of the analytical method – thus allowing their quantification. The initial concentrations of the drug samples (200 μ M) had to be diluted 200 times to be within the range of linearity.

The permeability coefficients were calculated as described in Equation 2.1. Highly permeable molecules (verapamil, propranolol, ketoprofen and ketoconazole) from BCS classes I and II had permeability coefficients ranging from 1.60×10^{-6} to $12.10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ while poorly permeable compounds (antipyrine, atenolol, furosemide and hydrochlorothiazide) had permeability coefficients between 0.06×10^{-6} and $3.71 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. The permeability results obtained for these eight permeability standards are shown in **Table 2.6**. Our results were compared to literature values to validate if the permeability coefficients determined with our method were in agreement with those reported using similar PAMPA conditions. The permeability coefficients differ 4 to 60 folds between published values (37, 39, 57, 63, 83, 84) due to PAMPA experimental conditions such as the percentage and type of lipids used for the membrane preparation. As an example, the permeability coefficient of verapamil from the literature ranges between $5.63 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ using 1.5 % of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) membranes to $39.4 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ with a membrane soaked with 10 % egg lecithin (37, 39). Similarly, the permeability coefficients reported for ketoprofen ranged from 0.05×10^{-6} (39) to $2.84 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (63). Comparatively, the permeability diffusion of this drug after only 5 h was $0.05 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ while $2.84 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ was calculated after 24 h of diffusion with a similar membrane. Altogether, the permeability coefficients determined in our study favorably compare to literature values since they are within the range of published values for the eight permeability standards and follow the expected order of permeability.

Table 2.6 PAMPA results for the eight standard drugs and comparison with literature

Compound	BCS class	Experimental P_{app} ($10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)	Literature P_{app} ($10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)	Literature references
Verapamil	I	12.10 ± 0.92	5.63-39.4	(37, 39, 57, 63, 84)
Propranolol	I	9.65 ± 0.44	3.0-39.8	(37, 39, 57, 63)
Ketoconazole	II	1.94 ± 0.09	1.7-6.2	(37, 83)
Ketoprofen	II	1.60 ± 0.07	0.05-2.84	(37, 39, 63)
Antipyrine	III	3.71 ± 0.07	0.7-4.46	(37, 39, 63, 83)
Atenolol	III	0.06 ± 0.10	0.06-2.75	(37, 39, 83)
Furosemide	IV	0.06 ± 0.10	0.01-1.45	(39, 63, 83)
HCT	IV	0.09 ± 0.16	0.01-1.82	(37, 39, 63, 83)

The simultaneous quantification of these eight standard drugs has the potential to provide standardization between different PAMPA assays. The permeability coefficients of

the selected molecules provide a threshold allowing the discrimination of highly permeable from poorly permeable compounds. Moreover, it does not require more analysis time than only one standard compounds. As a result, this method is applicable to high throughput screening in drug discovery. For example, the permeability coefficient obtained for a NCE can be easily compared to the calibration results in order to determine if the absorption of this compound will be limited or not by its permeability. Finally, the HPLC-ESI-MS/MS method was validated according to FDA and EMA guidelines and allowed the simultaneous quantification of the 8 standard drugs.

2.6 Conclusion

A new HPLC-ESI-MS/MS method was developed and optimized to allow the rapid and simultaneous quantification of eight permeability standards. This method was validated according to FDA and EMA guidelines and successfully applied to quantify the diffusion of drugs in a PAMPA assay. PAMPA requires the quantification of at least one permeability standard, but the reported method allows the simultaneous quantification of eight permeability standards without the use of any additional equipment and time. This is the first reported method allowing the standardization of permeability assays by the simultaneous quantification of eight standard drugs. Our method could be routinely used to quantify standard drugs in a variety of intestinal permeability assays realized in drug discovery research. It also allows the verification and the calibration of permeability assays as well the comparison of intra-laboratory and inter-laboratory results.

2.7 Acknowledgements

Financial support was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Canadian Institute of Health Research (CIHR) and the Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologie (FRQNT). The authors wish to thank M. Jutras and A. Chefson for sharing their HPLC-MS/MS expertise, S. Zaraa for technical support, as well as S. Nirasay and J. Claverie (Université du Québec à Montréal), A. Badia (Université de Montréal) and Y. Mouget (Corealis Pharma Inc.) for insightful discussions.

Chapitre 3 : Optimisation de la membrane néoPAMPA

3.1 Introduction

Le développement de la membrane néoPAMPA a nécessité l'optimisation de la composition et du mode de préparation de ses trois constituants soient le filtre, la pDA et la bicouche lipidique. Des changements ont également été apportés au dispositif des tests de perméabilité ainsi qu'à la liste des médicaments standards testés. Les travaux d'optimisation ont été réalisés par les trois étudiantes impliquées dans ce projet. Ma participation à l'optimisation de la membrane néoPAMPA a principalement concerné la taille et la nature du filtre, la taille et la composition des lipides ainsi que la mise à l'échelle de l'essai de perméabilité pour une application à haut débit. Un historique de l'évolution de la membrane est d'abord présenté pour permettre une meilleure compréhension des résultats qui suivront.

3.1.1 Le filtre

La nature du filtre ainsi que la taille des pores ont été modifiées au cours du projet néoPAMPA. La perméabilité des molécules au travers des filtres de polycarbonate et d'alumine, tous deux hydrophiles, a été testée par S. Zaraa et S. Nirasay. Les coefficients de perméabilité obtenus étaient similaires pour les deux types de filtre. Par contre, les filtres d'alumine étaient cassants et plus dispendieux. Les filtres de polycarbonate ne présentaient pas ces désavantages et ont donc été retenus pour la continuation des travaux. Ces filtres sont troués au laser ce qui permet d'obtenir des pores de taille précise. La **Figure 3.1** montre la régularité des pores des filtres de polycarbonate. Les tailles de pores ayant été testées lors des essais de perméabilité sont de 400 et 100 nm. La taille initialement évaluée était de 400 nm et les résultats de la perméabilité des médicaments étaient identiques pour toutes les molécules; le filtre ne discriminait donc pas les molécules en fonction de leur perméabilité attendue dans la littérature, ce qui était souhaité.

Dans la littérature, les bicouches lipidiques typiquement formées par fusion de liposomes sont préparées sur des surfaces lisses au niveau atomique comme la silice, le mica et le verre (85-87). Afin d'utiliser des filtres contenant moins d'irrégularités et de maintenir les

liposomes d'un seul côté du filtre, la taille des pores a été diminuée de 400 nm à 100 nm. Ainsi, les chances de fusion des liposomes sur les filtres, et non dans les pores, étaient maximisées. De plus, selon les résultats ayant été obtenus, le filtre de 100 nm ne discriminait pas les médicaments en fonction de leur perméabilité attendue. Suite à ces travaux, les filtres de polycarbonate ayant une taille de pores de 100 nm ont été retenus comme support de la membrane néoPAMPA.

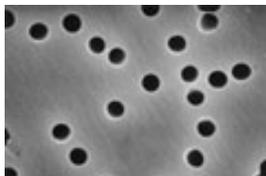


Figure 3.1 Filtre de polycarbonate

3.1.2 La polydopamine

La pDA est formée par la polymérisation *in situ* de la dopamine en solution (88). Lors de la polymérisation, il y a formation d'un film et d'agrégats. Le film peut recouvrir plusieurs matériaux et ainsi modifier leur propriété de surface. Par exemple, la pDA peut être utilisée pour recouvrir et conférer des propriétés hydrophiles à des matériaux hydrophobes comme le PVDF, le polyéthylène et le polytétrafluoroéthylène (89).

L'épaisseur du film de pDA est directement influencée par le temps d'incubation du support en présence de la dopamine (90). Le temps de déposition de la pDA a donc été optimisé dans les travaux de S. Zaraa et de S. Nirasay (2). L'épaisseur de la pDA a été évaluée après 4 h, 12 h et 24 h d'incubation. Après 24 h d'incubation, des images par microscopie électronique à balayage ont montré que les pores des filtres de polycarbonate avaient été obstrués (3) alors qu'il n'en était rien après 4 h. L'épaisseur du film de pDA, après 4 h et 12 h de déposition, a été évaluée par ellipsométrie. Un film de 20 nm, en milieu sec, a été mesuré après 4 h tel que démontré à la **Figure 3.2**. Un prolongement du temps d'immersion entraîne la formation d'agrégats non liés au support; ces agrégats sont insolubles dans l'eau. De plus, l'augmentation de l'épaisseur du film en fonction du temps de déposition atteint un plateau aux alentours de 24 h (2). Aussi, plus l'épaisseur du film augmente plus la variabilité augmente tel qu'indiqué par les barres d'erreur de la **Figure 3.2**. C'est pourquoi une

incubation de 4 h a été choisie pour le recouvrement des filtres parce que l'épaisseur du film de pDA était optimale pour la déposition des liposomes et que la variabilité de l'épaisseur du film était minimale.

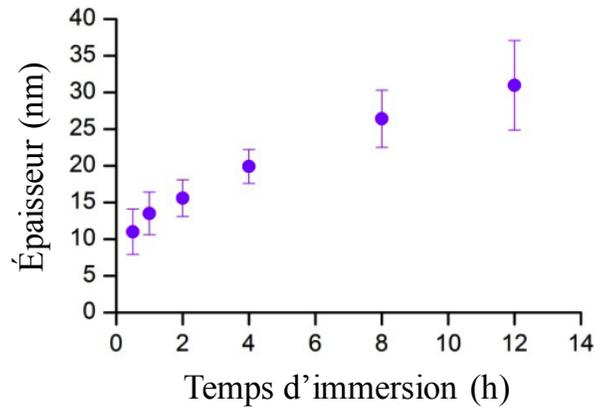


Figure 3.2 Épaisseur du film de pDA en fonction du temps d'immersion du support [Traduite et reproduite avec permission (2)]

3.1.3 La bicouche lipidique

La bicouche lipidique est formée par la fusion spontanée des liposomes. La fusion est enclenchée par l'adhésion des liposomes au support. Le processus de formation d'une bicouche lipidique par fusion liposomale est détaillé à la **Figure 3.3**.

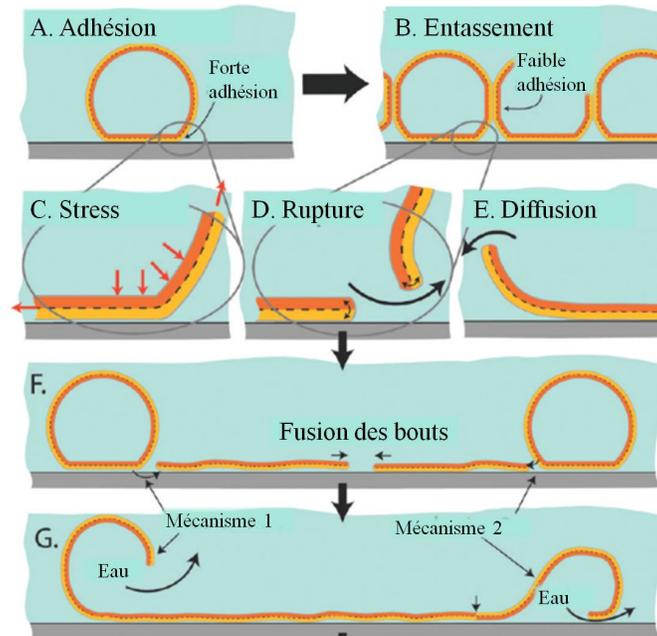


Figure 3.3 Processus de formation des bicouches lipidiques par fusion des liposomes [Traduit et reproduit avec permission (85)]

Plusieurs changements ont été apportés à cette composante par S. Zaraa et S. Nirasay : (1) la méthode de préparation des liposomes, (2) la taille des liposomes, (3) la composition des lipides de la bicouche et (4) les conditions expérimentales lors de la fusion.

3.1.3.1 La méthode de préparation des liposomes

Au départ, les liposomes étaient préparés selon la méthode de gel/dégel. Brièvement, cette méthode consiste à soumettre une solution de lipides à cinq cycles de gel/dégel, pour ensuite la soniquer, la centrifuger et, finalement, l'extruder (1). Cette technique était fastidieuse, non robuste et produisait un faible volume de préparation liposomale. Une autre technique de préparation a donc été développée par S. Zaraa : la méthode par film lipidique (3). Brièvement, selon cette méthode, le solvant de la solution lipidique est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif, ce qui entraîne la formation d'un film lipidique sur les contours du ballon. Ce film est réhydraté, puis extrudé. Cette technique était beaucoup plus rapide et elle permettait la production d'un grand volume de préparation liposomale. Par conséquent, en vue d'une production à plus grande échelle, la méthode par film lipidique a été conservée.

3.1.3.2 La taille des liposomes

Des liposomes de 100 nm, 200 nm, 400 nm et 600 nm ont été préparés selon la méthode par film lipidique. Au départ, lors de la préparation des membranes néoPAMPA, les liposomes utilisés pour la formation de la bicouche lipidique avaient une taille inférieure à la taille des pores. Pour maximiser la fusion liposomale, la taille des liposomes doit être supérieure à la taille des pores. Des liposomes de 400 et de 600 nm ont donc été déposés sur les filtres ayant des pores de 400 nm (section 3.1.1) alors que les liposomes de 100 nm et de 200 nm ont été déposés sur les filtres ayant des pores de 100 nm. Les résultats de perméabilité n'ont pas permis de déterminer la taille des liposomes conduisant à la bicouche lipidique la plus uniforme et la plus étanche. Par contre, il a été conclu que par mesure de précaution les liposomes devaient toujours avoir une taille supérieure à la taille des pores du filtre.

3.1.3.3 La composition des lipides de la bicouche lipidique

Tout d'abord, des liposomes de DMPC ont été préparés par S. Nirasay (1). Tel que mentionné à la section 1.2, les phospholipides sont une composante majeure des bicouches

lipidiques humaines, majoritairement les PCs, et la DMPC répond à ce critère. De plus, la DMPC est couramment utilisée pour la préparation de membranes modèles. Cependant, la DMPC n'était pas le choix optimal pour la fusion liposomale à cause de ses propriétés physico-chimiques. Afin d'assurer la formation des liposomes et leur fusion spontanée en bicouche, les lipides doivent être en phase fluide. Or, la T_m de la DMPC est de 23 °C (26); les manipulations devaient donc être réalisées à une température plus élevée que la température ambiante. Pour remédier à ce problème, S. Zaraa a préparé des liposomes à base de 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) (3) qui possèdent une T_m de -17 °C (26). Les expériences pouvaient donc être réalisées plus facilement à température de la pièce. Les résultats de perméabilité obtenus par S. Zarra n'ont montré aucune différence entre l'utilisation de la DMPC et de la DOPC. (**Figure 3.4**) La DOPC a donc été conservée pour la préparation des liposomes.

Tableau 3.1 Comparaison des coefficients de perméabilité des bicouches lipidiques formées de DMPC et de DOPC

Composé	Coefficient de perméabilité (x 10 ⁻⁶ cm·s ⁻¹)	
	DMPC (n = 3)	DOPC (n = 3)
Vérapamil	25 ± 4	27 ± 4
Propranolol	32 ± 2	31 ± 5
Kétoprofène	34 ± 1	32 ± 1
Carbamazépine	38 ± 9	31 ± 4
Aténolol	31 ± 7	35 ± 1
Antipyrine	34 ± 5	41 ± 2
Furosémide	8 ± 2	36 ± 1
HCT	30 ± 8	37 ± 2

[Reproduit et modifié de (3)]

Filtre de polycarbonate hydrophile de taille de pores de 400 nm, plaque 12 puits

De plus, dans les derniers travaux de S. Zaraa, 5 % de cholestérol ont été ajoutés dans les liposomes afin de rigidifier légèrement la bicouche lipidique. La bicouche formant les membranes néoPAMPA était donc constituée de 95 % DOPC et de 5 % cholestérol. Le cholestérol a ensuite été remplacé par du cholestérol cationique. La pDA présente une charge négative à pH 6,4, il a donc été supposé que l'incorporation d'une charge positive dans les liposomes favoriserait l'attraction, et l'adhésion, entre ces deux constituants. Malgré ces

changements de composition, il a été conclu que la membrane néoPAMPA ne permettait pas de discriminer les molécules en fonction de leur capacité à diffuser de manière passive. Les hypothèses de ces résultats sont que la bicouche lipidique n'était pas uniforme, stable et complète. Suite à ces résultats, une optimisation de la composition des liposomes a été jugée nécessaire afin d'améliorer la qualité de la bicouche lipidique formée.

3.1.3.4 Les conditions expérimentales lors de la fusion de vésicules

Selon les travaux précédents, la fusion des liposomes a été réalisée à 37 °C lorsque les liposomes étaient constitués de DMPC, et à température ambiante pour les liposomes de DOPC. Selon les travaux de S. Nirasay (1), la fusion optimale des liposomes a été obtenue après 16 h d'incubation. L'agitation des puits lors de la déposition des liposomes avait été introduite par S. Zaraa. Les résultats n'étant pas concluants, cette condition supplémentaire avait été abandonnée. Par conséquent, les conditions expérimentales ayant été conservées pour la fusion liposomale sont une incubation à température ambiante pour une durée de 16 h.

3.1.4 Le dispositif

Le dispositif a été modifié à plus d'une reprise. Les premiers tests de perméabilité ont été réalisés dans des cellules de Franz verticales (**Figure 3.4 a**) pour ensuite être effectués dans des cellules de Franz horizontales (**Figure 3.4 b**). Ces cellules nécessitaient des volumes de l'ordre de 3-4 mL et un maximum de six expériences pouvaient être réalisées à la fois. Ces deux conditions ne permettaient pas l'application du test néoPAMPA au criblage à haut débit. Les cellules de Franz ont donc été remplacées par les plaques « sandwich » utilisées lors des tests PAMPA. Les plaques « sandwich » sont constituées de 96 puits : une plaque de puits donneurs, dont le fond des puits est un filtre de PVDF, qui s'insère dans une plaque de puits receveurs (**Figure 3.4 c**). Les filtres de PVDF devaient être retirés puis remplacés par des filtres de polycarbonate afin de préparer les membranes néoPAMPA. Ces plaques 96 puits limitaient les prélèvements pouvant être effectués lors des tests de perméabilité puisque pour accéder aux puits receveurs, tous les puits donneurs devaient être retirés; ce sont des puits regroupés en une seule plaque. Pour remédier à ce problème, les plaques 12 puits Costar ont remplacé les plaques 96 puits. (**Figure 3.4 d**) Ces plaques sont principalement employées pour les tests de perméabilité Caco-2 et les filtres des inserts devaient également être remplacés.

Les puits donneurs sont des inserts individuels, ce qui permettait de réaliser des prélèvements dans un puits sans retirer les inserts des autres puits. De plus, cette plaque était avantageuse pour souder les filtres puisque les inserts sont plus grands. En conséquence, les plaques 12 puits ont été sélectionnées comme dispositif optimal.

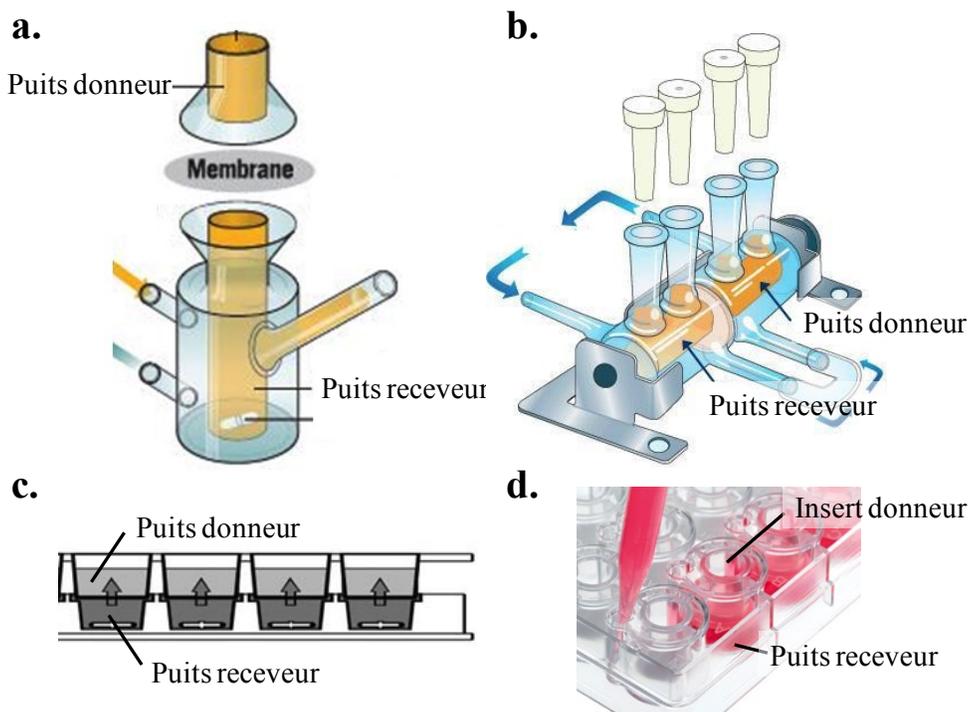


Figure 3.4 Dispositifs des tests de perméabilité
a. Cellules de Franz verticales (Modifiée et traduite de (91)) **b.** Cellules de Franz horizontales (Modifiée et traduite de (92)) **c.** Plaques « sandwich » 96 puits (Traduite de (93)) **d.** Plaques Costar avec inserts (Modifiée de (94))

3.1.5 Les médicaments standards

Les premiers tests de perméabilité ont été réalisés avec l'acétaminophène et la famotidine (1). Ensuite, la perméabilité du jaune Lucifer - un marqueur de l'intégrité des membranes utilisé lors des tests Caco-2 - a été évaluée. Par la suite, une cassette de huit médicaments a été élaborée dans le but de déterminer la capacité de la membrane néoPAMPA à discriminer les molécules très perméables des molécules peu perméables. La première cassette était constituée du vérapamil, du propranolol, du carbamazépine, du kétoprofène, de l'antipyrine, de l'aténolol, du furosémide et de l'hydrochlorothiazide. Finalement, le carbamazépine a été remplacé par le kétoconazole afin d'élaborer une méthode analytique

capable de quantifier simultanément cette cassette de molécules. Cette méthode a été présentée au Chapitre 2 et la structure des molécules est présentée dans le **Tableau 2.4**. De plus, la concentration de la cassette de médicaments a été variée de 10 à 250 μM . Les tests PAMPA sont réalisés à une concentration de médicaments variant entre 100 et 250 μM . Les premiers tests avec la membrane néoPAMPA avaient donc été réalisés à ces concentrations. La méthode analytique décrite au Chapitre 2 s'est avérée très sensible et, par conséquent, la concentration de la cassette de médicaments a pu être diminuée à 10 μM .

3.2 Objectifs

Plusieurs travaux d'optimisation ont suivi ceux présentés dans l'introduction de ce chapitre puisque la membrane néoPAMPA ne permettait toujours pas de discriminer les molécules connues comme étant très perméables des molécules peu perméables. Ces optimisations concernent :

- Le filtre
 - Filtre de PVDF hydrophobe ayant des pores de 450 nm
 - Filtre de polycarbonate hydrophile ayant des pores de 15 nm
- La bicouche lipidique
 - Composition de la bicouche lipidique
 - Déposition de la bicouche lipidique
- Les conditions du test de perméabilité
 - Adhérence de la cassette de médicaments
 - Cinétique de la perméabilité des médicaments

Le premier objectif était de vérifier l'influence de la nature du filtre sur la perméabilité des composés. Le deuxième objectif était de déterminer si l'optimisation des paramètres de la bicouche lipidique permettait d'améliorer l'uniformité de celle-ci. Finalement, le troisième objectif visait à expliquer les résultats de recouvrement et à diminuer la durée du test de perméabilité. Les résultats des optimisations sont présentés dans ce chapitre.

3.3 Matériel

Les filtres de polycarbonate Nuclepore (15 nm; 25 mm) ont été achetés chez GE Healthcare BioScience (Texas, États-Unis). Les plaques 96 puits « sandwich » (PVDF, 450 nm) ont été commandées chez EMD Millipore (Ontario, Canada) Les plaques 12 puits Costar (polycarbonate hydrophile, 400 nm) proviennent de chez VWR International (Ontario, Canada). Les plaques d'injection 96 puits 0,5 mL en polypropylène ont été achetées chez Agilent Technologies (Californie, États-Unis) Le chlorhydrate de 2-(3,4-dihydroxyphényl)éthylamine (chlorhydrate de dopamine, $\leq 100\%$), le DC-Cholestérol·HCl (DC-Chol, $\approx 95\%$), l'acétate de butyle (ACS Reagent) et l'hydroxyanisole butylé (BHA, $\geq 98,5\%$) ont été commandés chez Sigma Aldrich (Ontario, Canada). Le méthanol (grade HPLC) et le chloroforme (anhydre $\geq 99\%$) ont été achetés chez Fisher Scientific (Ontario, Canada). Le DOPC ($> 99\%$) et les filtres de polycarbonate hydrophile (400 nm; 19 mm) proviennent de chez Avanti Polar lipids (Alabama, États-Unis). Les tampons phosphates ont été préparés selon la pharmacopée américaine USP (69) à pH 6,4, 7,4 et 8,5.

3.4 Méthodes

3.4.1 Préparation des membranes

Les membranes néoPAMPA possèdent trois composantes : un filtre, un coussin de polydopamine et une bicouche lipidique, tel que montré à la **Figure 1.12**. La préparation de chacune de ces composantes est décrite dans les sections suivantes.

3.4.1.1 Collage des filtres

Les filtres de polycarbonate (400 nm) déjà fixés aux inserts ont été remplacés par des filtres de même nature ayant des pores de 15 nm. Ces filtres ont été choisis afin d'obtenir la surface la plus régulière possible. Les pores de 15 nm sont les plus petits offerts commercialement pour ce type de filtre. Pour ce faire, les filtres de 400 nm ont été retirés des inserts des plaques Costar (**Figure 3.5 d**). À l'aide d'un pinceau, l'acétate de butyle a été apposé sur la surface de l'insert accueillant le nouveau filtre (15 nm). Une légère pression uniforme a été appliquée afin que l'acétate de butyle soude le filtre à l'insert. Les résidus de

solvant ont été évaporés sous la hotte (24 h). Ensuite, la taille des filtres a été ajustée à la taille des puits à l'aide d'un scalpel en découpant l'excédent des filtres. Les inserts ont été examinés par microscopie optique (Zeiss, Discovery V.8) afin d'assurer l'absence de défaut. Finalement, les inserts ont été transférés dans la plaque de puits receveurs pour la suite de la préparation des membranes néoPAMPA.

3.4.1.2 Déposition de la polydopamine (2)

Une solution de chlorhydrate de dopamine ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a été préparée dans du tampon phosphate pH 8,5. La solution doit être fraîche lors de chaque expérience puisque la polymérisation du chlorhydrate de dopamine en pDA débute dès la mise en solution. La solution de dopamine a été déposée dans les inserts (1 mL) et incubée à température ambiante (4 h). Les inserts ont été rincés à l'eau MilliQ (3 x 1 mL) et l'excédent d'eau a été retiré à l'aide d'une micropipette. Les filtres recouverts de pDA peuvent ensuite être conservés à sec.

3.4.1.3 Préparation des liposomes

Les solutions initiales de DOPC (30 mM), de BHA ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) et de DC-Chol (220 mM) ont été préparées dans du chloroforme. Le BHA (125 μL) a été ajouté à la solution de DOPC (9875 μL) afin de minimiser sa dégradation par oxydation. Les compositions des solutions lipidiques pour la préparation des liposomes contenant 0 %, 10 %, 20 % et 30 % DC-Chol sont présentées dans le **Tableau 3.2**. Du chloroforme (202 μL) et du méthanol (333 μL) ont été ajoutés aux solutions lipidiques. Les solutions lipidiques (1 mL, 20 mM) ont été mélangées puis le solvant a été évaporé par un évaporateur rotatif (Büchi RE-121; 30 min, 265 rpm, 50 °C). Le film lipidique formé a été réhydraté avec du tampon phosphate pH 7,4 (1 mL) sous rotation (2 h, 65 rpm). La préparation liposomale a ensuite été mélangée à l'aide d'un Vortex (30 s) puis extrudée 21 fois avec une mini-extrudeuse d'Avanti Polar lipids à travers un filtre ayant des pores de 400 nm.

Tableau 3.2 Composition des solutions lipidiques utilisées pour la préparation des liposomes

Lipide	0 % DC-Chol	10 % DC-Chol	20 % DC-Chol	30 % DC-Chol
DOPC (μL)	464,8	454,2	443,6	433
DC-Chol (μL)	0	10,6	21,2	31,8

La taille et le potentiel zêta des liposomes ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière (Malvern, Zetasizer) suite à une dilution dans l'eau MilliQ (1 :19). Cette dilution a permis d'obtenir une valeur d'atténuation de 7. La position du laser a été déterminée de manière automatique pour chaque mesure. L'angle de la mesure était de 173°. Afin d'assurer la reproductibilité, trois mesures de 25 cycles ont été prises par échantillon.

3.4.1.4 Déposition des liposomes

Les préparations liposomales (20 mM) ont été diluées (1 :9) dans du tampon phosphate pH 7,4 ou dans un mélange de tampon phosphate pH 7,4 et NaCl (150 mM). Les liposomes (800 µL) ont été déposés dans les inserts puis incubés à température ambiante (16 h). Suite à l'incubation, les inserts ont été rincés trois fois avec de l'eau MilliQ en prenant soins que le filtre ne soit jamais en contact avec l'air. Ensuite, les inserts ont été incubés (1 h) ou non dans une solution saturée en lipides (800 µL, 30 mg·mL⁻¹). Finalement, l'excès de solution a été retiré (750 µL). La perméabilité des molécules à travers la membrane néoPAMPA a ensuite été testée.

3.4.2 Tests de perméabilité

La cassette de médicaments utilisée lors des tests de perméabilité était composée du vérapamil, du propranolol, du kétoprofène, du kétoconazole, de l'antipyrine, de l'aténolol, du furosémide et de l'hydrochlorothiazide. La cassette a été préparée dans du tampon phosphate pH 6,4 (10 µM). Les puits receveurs ont été remplis avec du tampon phosphate pH 6,4 (1,2 mL) et les inserts avec la cassette de médicaments (400 µL). Les deux compartiments ont été assemblés afin de débiter le test de perméabilité (15 min ou 2 h, 21 °C). À la fin du test, les puits ont été séparés. Des *aliquots* de la concentration initiale ainsi que des compartiments donneurs et receveurs ont été transférés dans une plaque 96 puits pour injection, puis dilués avec une solution organique à des fins d'analyse. La dilution des échantillons est présentée dans le **Tableau 3.3**.

Tableau 3.3 Dilution des échantillons issus des tests de perméabilité

Endroit d'échantillonnage	Échantillon	Volume (µL)	
		Tampon phosphate pH 6,4	Solution organique ¹
Compartiment donneur Concentration initiale	17	153	30
Compartiment receveur	170	0	30

¹ *Solution organique : acétonitrile, 1,33 % acide formique, 6,6 µM labétalol*

3.4.3 Adhérence des médicaments

L'adhérence des médicaments aux différentes composantes de la membrane néoPAMPA a été évaluée. Pour le test de l'adhérence au plastique, la cassette de médicaments (800 µL, 10 µM, 100 µM et 200 µM) a été incubée (2 h) dans les puits receveurs des plaques Costar. Pour le test de l'adhérence à la pDA (plastique et pDA), les puits receveurs des plaques Costar ont été recouverts de polydopamine (2 mL, 2 mg·mL⁻¹, 4 h). Ensuite, le test de recouvrement s'est déroulé de la même manière que le test de l'adhérence au plastique. Pour le test de collage au filtre de polycarbonate 15 nm (plastique et filtre), la cassette de médicaments (400 µL, 10 µM) a été incubée (2 h) dans les puits donneurs. À la fin de l'incubation, des échantillons (17 µL) des compartiments donneurs et accepteurs ainsi que de la concentration initiale ont été transférés dans une plaque 96 puits pour injection. Les échantillons ont été dilués selon la méthode décrite dans le **Tableau 3.3**. Finalement, le recouvrement relatif à la concentration initiale a été calculé.

3.4.4 Quantification des résultats

Les échantillons des tests de perméabilité ont été quantifiés par la méthode HPLC-MS/MS validée et décrite au Chapitre 2. Une première méthode avait été développée sur un autre appareil, un HPLC-MS/MS Agilent. Cette méthode était moins sensible et a donc été abandonnée. C'était un HPLC Agilent 1260 Series couplé à un spectromètre de masse Agilent triple quadripôle G6410B. Cet instrument était équipé d'un échantillonneur automatique G1367E, d'un compartiment de colonne à température contrôlée G1316A et d'une pompe quaternaire Infinity G1311B. Les coefficients de perméabilité apparente ont été calculés à partir de l'Équation 1.6 détaillée à la section 1.3.3.

3.5 Résultats

Les résultats présentés dans ce chapitre reflètent les optimisations apportées au filtre, à la bicouche lipidique et aux conditions du test de perméabilité. Les filtres de polycarbonate ayant des pores de 100 nm avaient été retenus suite aux travaux de S. Nirasay et de S. Zaraa. Par contre, les membranes néoPAMPA formées sur ces supports n'ont pas permis la discrimination des molécules en fonction de leur perméabilité. Les filtres de PVDF hydrophobe ayant des pores de 450 nm et les filtres de polycarbonate ayant des pores de 15 nm ont donc été testés. Les modifications de la bicouche lipidique ont concerné le pourcentage de cholestérol et les conditions de déposition. Finalement, les résultats des conditions du test de perméabilité ont porté sur l'adhérence des molécules au plastique, au filtre et à la pDA ainsi que sur l'évaluation d'une cinétique de perméabilité. En dernier lieu, les résultats de perméabilité ayant été obtenus avec les conditions optimisées sont détaillés.

3.5.1 Le filtre

3.5.1.1 PVDF hydrophobe, 450 nm

La perméabilité de la cassette de médicaments a été évaluée au travers de la membrane néoPAMPA ayant comme support un filtre de PVDF hydrophobe. Ces filtres sont présents sur les plaques « sandwich » de 96 puits. Le but était de déterminer si l'ajout d'une composante hydrophobe majeure permettrait de discriminer davantage les molécules très perméables des molécules peu perméables. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3.4**.

Tableau 3.4 Étude de l'effet d'un filtre de PVDF hydrophobe (pores de 450 nm) sur la perméabilité de la cassette de médicaments

Perméabilité attendue	Composé	Coefficient de perméabilité (x 10 ⁻⁶ cm·s ⁻¹)	
		Filtre ¹	Membrane néoPAMPA ²
Très perméable	Vérapamil	8,5	8,2 [7,8; 8,6] ³
	Propranolol	8,2	6,8 [6,5; 7,1]
	Kétoprofène	9,0	5,2 [4,9; 5,4]
	Kétoconazole	-	-
	Carbamazépine	9,8	5,7 [5,4; 6,1]
Peu perméable	Aténolol	8,4	5,3 [5,1; 5,5]
	Antipyrine	10,7	6,0 [5,8; 6,3]
	Furosémide	7,8	4,0 [3,9; 4,2]
	HCT	8,0	4,4 [4,1; 4,7]

¹ Mémoire de S. Zaraa (3), n = 1, plaque 96 puits, filtre PVDF 450 nm, test 2 h, autres informations non disponibles

² n = 3, plaque 96 puits, filtre PVDF 450 nm, pDA 4 h, liposomes DOPC 551 nm, test 2 h, [cassette] = 10 µM.

³ Moyenne des coefficients de perméabilité calculés avec leur IC₉₅

Les coefficients de perméabilité des filtres seuls, tirés du mémoire de S. Zaraa, étaient similaires pour toutes les molécules soient de 7,8 à 10,7 ×10⁻⁶ cm·s⁻¹. Le filtre n'a donc pas discriminé les molécules en fonction de leur perméabilité attendue. Dans le cas de la membrane néoPAMPA, la perméabilité des molécules connues comme étant très perméables a varié entre 5,2 [4,9; 5,4] et 8,2 [7,8; 8,6] ×10⁻⁶ cm·s⁻¹ alors que la perméabilité des molécules connues comme étant peu perméables a varié entre 4,0 [3,9; 4,2] et 6,0 [5,8; 6,3] ×10⁻⁶ cm·s⁻¹. La membrane néoPAMPA n'a donc pas permis la discrimination des molécules en fonction de leur perméabilité attendue. Cependant, l'ajout de la pDA et de la bicouche lipidique a permis de limiter légèrement la diffusion des composés puisque les coefficients de perméabilité observés avec la membrane néoPAMPA étaient plus faibles. Toutefois, cette diminution n'a pas été observée dans le cas du vérapamil. La taille des liposomes déposés sur les filtres de PVDF (pores 450 nm) était de 551 nm, ce qui est limite pour la fusion liposomale. La présence de la bicouche lipidique peut donc être mise en doute, ce qui expliquerait la faible différence entre les coefficients de perméabilité obtenus avec le filtre seul et la membrane néoPAMPA et les coefficients de perméabilité plus rapides comparativement au tableau 3.1.

Lorsque le support de la membrane est hydrophile, comme les filtres de polycarbonate, la membrane néoPAMPA (**Figure 1.12**) résultante est majoritairement hydrophile comparativement à un test PAMPA. En effet, dans le test PAMPA, l'épaisseur de la membrane hydrophobe est de l'ordre du micron, car le filtre est imbibé d'une solution de lipides dissous dans le dodécane. Dans le cas de la membrane néoPAMPA, lorsque le filtre utilisé est hydrophile, la seule composante hydrophobe est la bicouche lipidique dont l'épaisseur est de l'ordre de quelques nanomètres. Le test PAMPA permet la discrimination des molécules très et peu perméables. Cependant, l'ajout d'un support hydrophobe à la membrane néoPAMPA n'a pas apporté cette discrimination. Ce manque de discrimination du néoPAMPA avec filtre hydrophobe, comparativement au test PAMPA traditionnel, pourrait être causé par la superposition en sandwich d'une couche hydrophobe (filtre), hydrophile (polydopamine), hydrophobe (bicouche lipidique).

3.5.1.2 Polycarbonate hydrophile, 15 nm

Puisque le support hydrophobe n'a pas fonctionné, la taille des pores des filtres de polycarbonate hydrophile a été modifiée. La taille des pores a été diminuée à 15 nm. Des pores plus petits pourraient être obstrués par la polydopamine alors que les pores plus grands minimisent les chances de déposition des liposomes. Cependant, il n'existe pas de plaques Costar commercialisées ayant cette taille de pores. Les filtres ont donc été retirés puis de nouveaux filtres y ont été collés. Trois méthodes de collage ont été testées : (1) sous l'effet de la chaleur, (2) avec de la colle à modèle réduit TESTOR puis finalement (3) avec de l'acétate de butyle. Les filtres collés à l'aide de la première technique ont décollé suite à une incubation de 16 h dans du tampon phosphate pH 6,4. De plus, cette technique n'a pas permis un collage uniforme des filtres. Dans le cas de la colle TESTOR, le temps d'action pour l'application de la colle était trop court, soit d'environ 15 s. L'acétate de butyle est l'un des solvants qui compose la colle TESTOR. Suite à l'application, les filtres de polycarbonate ont fusionné avec le plastique de l'insert, ce qui les a empêchés de décoller lors des incubations en solution. La troisième méthode a donc été la plus efficace.

Des images des filtres collés avec l'acétate de butyle ont été prises par microscopie optique. La **Figure 3.5** montre que les filtres de polycarbonate ayant des pores de 15 nm sont

bien collés à l'insert et qu'ils n'ont pas été endommagés, à l'échelle microscopique, par le solvant. Il est important de noter que la surface des filtres disponible pour l'évaluation de la perméabilité ne doit pas être en contact avec le solvant, car l'acétate de butyle permet la dissolution partielle du plastique.

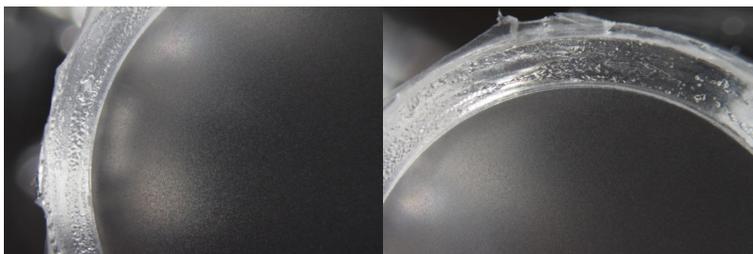


Figure 3.5 Images de microscopie optique des filtres de polycarbonate (15 nm) collés aux inserts

La perméabilité de la cassette de médicaments au travers des filtres de polycarbonate de 15 nm a été évaluée afin de s'assurer que le filtre n'était pas en mesure de discriminer les molécules en fonction de leur perméabilité attendue. Les résultats de perméabilité du filtre seul ont été comparés aux résultats de perméabilité obtenus avec la membrane néoPAMPA complète (**Tableau 3.5**).

Selon le **Tableau 3.5**, les filtres de polycarbonate de 15 nm n'ont pas discriminé la perméabilité des médicaments, car les coefficients de perméabilité calculés étaient similaires pour toutes les molécules (sauf pour le kétoconazole). Par contre, le filtre n'a pas limité la perméabilité des médicaments puisqu'il n'y a pas eu de diminution significative (10 fois) entre les perméabilités obtenues avec le filtre seul et la membrane néoPAMPA complète. En effet, les perméabilités mesurées avec la membrane néoPAMPA étaient seulement 2 fois plus petites que celles obtenues avec le filtre seul. La pDA et la bicouche lipidique ajoutées au support n'ont procuré qu'une faible restriction supplémentaire à la perméabilité des molécules. De plus, la membrane néoPAMPA n'a pas été en mesure de discriminer les molécules en fonction de leur perméabilité attendue. Les coefficients de perméabilité calculés pour les molécules considérées très perméables ont varié entre $1,5$ et $29,9 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ contre $13,2$ et $37,3 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ pour les molécules considérées peu perméables. Seul le kétoconazole a présenté une perméabilité plus faible ($1,5 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) comparativement aux autres molécules ($11,0$ à $37,3 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$). Cette différence a également été observée lors de

l'évaluation de la perméabilité avec le filtre seul, ce qui suppose que cette différence a été causée par l'adhérence du kétoconazole au plastique et au filtre. Une affinité entre les molécules et la polydopamine peut également être envisagée. Ces possibilités d'adhérence de la cassette de médicaments aux différentes composantes de la membrane néoPAMPA ont été testées et seront présentées à la section 3.5.3.1.

Tableau 3.5 Étude de l'effet d'un filtre de polycarbonate hydrophile (pores de 15 nm) sur la perméabilité de la cassette de médicaments

Perméabilité attendue	Composé	Coefficient de perméabilité (x 10 ⁻⁶ cm·s ⁻¹)	
		Filtre ¹	NéoPAMPA ²
Très perméable	Vérapamil	73,5 [67,1; 79,9]	29,9 [7,4; 52,4]
	Propranolol	39,5 [38,2; 40,8]	19,2 [5,0; 33,8]
	Kétoprofène	37,8 [36,4; 39,2]	11,0 [2,4; 19,6]
	Kétoconazole	5,3 [4,9; 5,8]	1,5 [0,2; 2,7]
	Carbamazépine	-	-
Peu perméable	Aténolol	37,8 [37,0; 38,6]	17,4 [4,2; 30,5]
	Antipyrine	76,0 [75,1; 76,9]	37,3 [9,8; 64,9]
	Furosémide	44,6 [37,9; 51,3]	13,2 [3,0; 23,4]
	HCT	49,8 [45,2; 54,4]	19,5 [3,2; 33,8]

¹ n = 3, plaque 12 puits, filtre polycarbonate 15 nm, test 2 h, [cassette] = 10 µM;

² n = 3, plaque 12 puits, filtre polycarbonate 15 nm, pDA 4 h, liposomes 70% DOPC/ 30% DC-Chol 439 nm, test 2h, [cassette] = 10 µM

De plus, la variabilité des résultats a considérablement augmenté suite à l'ajout de la pDA et de la bicouche lipidique formant la membrane néoPAMPA. Par exemple, la perméabilité du propranolol au travers du filtre est de 39,5 [38,2; 40,8] × 10⁻⁶ cm·s⁻¹ comparativement à 19,2 [5,0; 33,8] × 10⁻⁶ cm·s⁻¹ au travers de la membrane néoPAMPA. Le processus de polymérisation de la pDA est encore mal compris à ce jour. En effet, le réactif et le produit sont connus, mais la réaction de polymérisation n'est pas encore définie (95). De plus, la polymérisation est aléatoire, ce qui entraîne une déposition variable. Le film de pDA recouvrant les filtres n'était probablement pas homogène sur toute la surface du filtre, ce qui a pu entraîner des variabilités de perméabilité entre les membranes. La bicouche lipidique peut également s'être formée différemment en fonction de la déposition de la pDA et donc être plus ou moins uniforme. Ces deux composantes ont donc pu apporter de la variabilité entre les échantillons.

En résumé, les filtres de 15 nm n'ont pas limité, ni discriminé la diffusion des médicaments. Ils ont donc été choisis comme nouveau support de la membrane néoPAMPA. Les membranes néoPAMPA, ayant comme support les filtres de 15 nm, n'ont pas été en mesure de discriminer les médicaments en fonction de leur perméabilité attendue. D'autres modifications sont nécessaires afin que la membrane néoPAMPA soit fonctionnelle. Une meilleure caractérisation physico-chimique de la polydopamine et de la bicouche lipidique déposées sur les filtres, et non sur le mica, serait nécessaires afin d'avoir une meilleure compréhension de la membrane obtenue. Pour mieux comprendre les résultats du Tableau 3.5, un essai contrôle de perméabilité devrait être réalisé avec un filtre recouvert seulement de polydopamine.

3.5.2 La bicouche lipidique

3.5.2.1 La composition de la bicouche lipidique

Dans les travaux présentés dans l'introduction de ce chapitre, les bicouches lipidiques des membranes néoPAMPA étaient composées de 95 % DOPC et de 5 % cholestérol. Cependant, tel que présenté à la section 1.2, les bicouches lipidiques des cellules humaines sont composées d'environ 30 % de cholestérol. Le cholestérol cationique (DC-Chol) a été choisi afin de maximiser les interactions entre les liposomes chargés positivement et le coussin de pDA chargé négativement aux environs du pH 7 (96). Le but était donc de préparer des bicouches lipidiques contenant différents pourcentages de DC-Chol et d'évaluer l'influence de ce changement sur la capacité de la membrane à discriminer la perméabilité des médicaments de la cassette. Les bicouches lipidiques des membranes néoPAMPA ont été préparées avec des liposomes ayant différentes compositions de DC-Chol soient 0 %, 10 %, 20 % ou 30 %. La taille et le potentiel zêta des liposomes utilisés pour la formation des bicouches lipidiques ont été mesurés. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3.6**.

Tableau 3.6 Taille et potentiel zêta des liposomes composés de DC-Chol

Pourcentage de DC-Chol	Taille moyenne (nm)	Potentiel zêta (mV)
30%	448 ± 10	41,8 ± 4,7
20%	356 ± 10	26,7 ± 5,7
10%	309 ± 1	4,4 ± 4,1
0%	152 ± 1	-3,3 ± 3,4

Seuls les liposomes composés de plus de 20 % de DC-Chol ont présenté une charge nette positive ($26,7 \pm 5,7$ et $41,8 \pm 4,7$ mV). Des résultats semblables sont répertoriés dans la littérature dans le cas de liposomes composés de DOPE et de DC-Chol (97). Cette charge est importante pour favoriser l'adsorption des liposomes au coussin de pDA ainsi que leur fusion spontanée en bicouche. Il a été possible d'observer que plus le pourcentage de DC-Chol était élevé plus la taille moyenne des liposomes augmentait. Les liposomes cationiques ont tendance à s'agglomérer, tel que décrit par Zhang *et al.* (97), ce qui a pour effet d'augmenter la taille moyenne des liposomes contenant du DC-Chol. Il a été supposé que des liposomes ayant une taille 10 fois supérieure à la taille des pores ont une meilleure adsorption au support. La fusion des liposomes en bicouche lipidique est favorisée lorsque l'adsorption est augmentée. Les liposomes contenant 10 % et plus de DC-Chol (308 à 447 nm) ont une taille 10 fois supérieure à la taille des pores. Suite à ces résultats, les liposomes composés de 20 % et de 30 % DC-Chol ont été retenus comme les meilleurs choix pour la formation des bicouches lipidiques étant donné leur taille et leur charge nette favorables à la déposition. Pour finaliser le choix de la composition des liposomes, la perméabilité de la cassette de médicaments au travers de la membrane néoPAMPA a été évaluée en fonction du pourcentage de DC-Chol. Les coefficients de perméabilité obtenus suite aux différentes conditions sont présentés dans le **Tableau 3.7**.

Tableau 3.7 Perméabilité de la cassette de médicaments en fonction du pourcentage de DC-Chol

Composé	Coefficient de perméabilité ($\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$)			
	0 % DC-Chol ¹	10 % DC-Chol ²	20 % DC-Chol ²	30 % DC-Chol ³
Vérapamil	52,3 ± 24,8	26,4 ± 1,1	17,0 ± 1,7	7,1
Propranolol	30,5 ± 11,2	17,0 ± 0,7	13,7 ± 0,7	4,7
Kétoprofène	24,2 ± 10,9	12,9 ± 1,4	10,2 ± 0,2	2,2
Kétoconazole	3,9 ± 2,9	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,2
Aténolol	29,8 ± 12,6	15,1 ± 1,0	12,4 ± 0,4	4,0
Antipyrine	62,8 ± 21,7	36,8 ± 2,1	30,5 ± 0,8	9,2
Furosémide	32,2 ± 14,1	16,0 ± 1,7	12,4 ± 0,1	2,9
HCT	42,2 ± 14,2	24,3 ± 1,0	20,4 ± 1,2	4,9

¹ *n* = 3, plaque 12 puits, filtre polycarbonate 15 nm, pDA 4 h, liposomes DOPC, test 2h, [cassette] = 10 μM , testé la même journée que 10% et 20% DC-Chol

² *n* = 3, plaque 12 puits, filtre polycarbonate 15 nm, pDA 4 h, liposomes DOPC/DC-Chol, test 2h, [cassette] = 10 μM , testés la même journée

³ *n* = 1, plaque 12 puits, filtre polycarbonate 15 nm, pDA 4 h, liposomes DOPC/DC-Chol, test 2h, [cassette] = 10 μM

Une diminution de la perméabilité des médicaments a été observée lors de l'augmentation du pourcentage de DC-Chol dans la bicouche lipidique; cette tendance a été conclue pour toutes les molécules et elle concorde avec la littérature (23, 25). Par exemple, la perméabilité du vérapamil au travers d'une bicouche lipidique sans DC-Chol a été calculée à 52,3 versus 7,1 $\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ pour une bicouche contenant 30 % de DC-Chol. Lorsque le cholestérol est incorporé dans les bicouches lipidiques en phase fluide, il entraîne une augmentation de la rigidité de celle-ci. Une bicouche lipidique rigide est moins perméable aux molécules puisque le déplacement des lipides au passage des molécules est restreint (98). C'est ce qui a été observé lors de cette expérience.

De plus, il n'y a pas de corrélation entre les coefficients de perméabilité calculés et la perméabilité réelle des molécules; la membrane néoPAMPA n'a pas été en mesure de discriminer les molécules les plus perméables (ex. : vérapamil) des moins perméables (ex. : furosémide). Ce manque de discrimination a probablement été causé par la présence de trous dans la bicouche lipidique. En effet, les images de S. Nirasay (2) prises par microscopie à force atomique (AFM) ont montré que la bicouche lipidique (100% DOPC) formée sur du mica recouvert de pDA n'était pas continue. Les bicouches présentaient des trous de quelques

nanomètres. D'autres résultats (non-publiés, S. Nirasay) ont montré que le recouvrement maximal atteint était de 80% pour des bicouches lipidiques composées de 70% DOPC/ 30% DC-Cholestérol. Par conséquent, les molécules ont pu emprunter la voie entraînant le moins de restriction; c'est-à-dire là où il y a absence de bicouche lipidique. Il est probable que ces trous aient empêché la discrimination de la perméabilité des molécules.

Pour imager les membranes néoPAMPA, la pDA et la bicouche lipidique doivent être déposées sur le mica, puisque c'est un matériau atomiquement lisse. La visualisation de la bicouche lipidique sur un filtre de polycarbonate n'a pas été possible étant donné la rugosité importante du filtre. (Non publiés, S. Nirasay) Il faut donc supposer que ces trous sont présents lorsque la bicouche lipidique est déposée sur les filtres de polycarbonate 15 nm recouverts de pDA. Cependant, leur taille reste indéterminée. Afin de minimiser la présence de trous dans la bicouche lipidique, un changement des conditions du test de perméabilité a été réalisé. Ce changement est présenté à la section 3.5.2.2.

Les travaux de Zhang *et al.* (99) ont démontré que les bicouches lipidiques contenant plus de 20 % d'un lipide cationique était morphologiquement exemptes de défauts. Les charges électrostatiques établies entre les lipides permettent la formation d'un réseau lipidique condensé, ce qui resserre les trous jusqu'à ce qu'il n'y en ait plus. Par contre, les bicouches lipidiques de Zhang *et al.* (99) étaient en phase gel. Pour les membranes néoPAMPA, les bicouches lipidiques sont présentes sous leur phase fluide. Le concept pourrait dépendre de l'état physique dans lequel se trouve les bicouches.

Pour cette raison, les membranes composées de 30 % DC-Chol ont été conservées à titre de meilleur choix pour la poursuite de l'optimisation de la membrane néoPAMPA. Ce pourcentage de DC-Chol a été choisi puisqu'il a limité davantage la perméabilité des médicaments – malgré l'absence de barres d'erreur – et qu'il est biologiquement représentatif.

3.5.2.2 La déposition de la bicouche lipidique

Plusieurs facteurs extérieurs peuvent maximiser l'adsorption et la fusion des liposomes en bicouche lipidique. Les deux paramètres ayant été testés dans ce projet sont l'ajout de NaCl et l'équilibre de la bicouche lipidique en présence d'une solution saturée en DOPC.

Il a été rapporté dans la littérature que la formation des bicouches lipidiques peut être améliorée par l'ajout d'un sel inorganique lors de la fusion liposomale (85, 86, 100-102). En effet, l'ajout de NaCl entraîne une augmentation de l'efficacité d'adsorption des liposomes à la surface du support. La force ionique engendrée par le sel perturbe les liposomes ce qui provoque leur ouverture; une étape cruciale de l'adsorption des vésicules au support. De plus, l'augmentation de la force ionique entraîne une augmentation des forces d'attraction de van der Waals entre le coussin de pDA et les liposomes, améliorant ainsi la déposition. La concentration de NaCl utilisée dans ces essais de fusion liposomale était de 150 mM puisqu'elle est représentative des conditions physiologiques. L'objectif était donc d'évaluer l'influence de l'ajout de 150 mM de NaCl, lors de la déposition des liposomes, sur la perméabilité des composés.

Tout d'abord, la taille des liposomes ayant de 0 % à 30 % DC-Chol a été évaluée en présence et en absence de NaCl. Ensuite, des mesures de la taille des liposomes, composés de 30 % DC-Chol, ont été prises en fonction du temps afin d'estimer le temps d'action du sel sur les liposomes. Les résultats sont rapportés dans le **Tableau 3.8**.

L'ajout de NaCl a entraîné une diminution importante de la taille des liposomes ayant une charge nette positive. En effet, la taille des liposomes 30 % DC-Chol en absence de NaCl était de 511 ± 9 nm et elle a diminué à 364 ± 6 nm suite à l'ajout du sel. À titre comparatif, la taille des liposomes 0 % DC-Chol est restée constante en présence de NaCl, 152 ± 1 à 158 ± 1 nm. La diminution de la taille a pu être causée par le retrait d'une couche des liposomes multi-lamellaires tel que décrit dans les travaux de Harvey *et al.* portant sur le comportement de vésicules de surfactants en présence d'électrolytes et de cholestérol (103). L'effet du sel sur les liposomes peut aussi être comparé au comportement des érythrocytes

dans un milieu hypertonique. Par un effet d'osmose, l'eau comprise à l'intérieur des cellules est diffusée hors de la celle-ci afin de ramener leur environnement dans un état isotonique. La sortie d'eau entraîne une diminution de la taille des érythrocytes tel qu'observé dans le cas des liposomes (104).

Tableau 3.8 Taille des liposomes de différentes compositions en fonction de la présence de 150 mM NaCl et du temps

Temps	30 % DC-Chol		20% DC-Chol		10% DC-Chol		0 % DC-Chol	
	Taille moyenne (nm)	PdI						
Sans NaCl	511 ± 9	0,254	366 ± 10	0,289	310 ± 1	0,444	152 ± 1	0,172
0 h	364 ± 6	0,256	277 ± 2	0,266	288 ± 2	0,401	158 ± 1	0,190
3 h	362 ± 10	0,224	-	-	-	-	-	-
17 h	394 ± 8	0,243	-	-	-	-	-	-

De plus, l'effet du NaCl sur les liposomes a été instantané puisque la taille a diminué drastiquement suite à l'ajout du sel (511 ± 9 nm à 364 ± 6 nm), mais elle est restée stable pour les trois heures suivantes (364 ± 6 à 394 ± 8 nm). Après 17 h, la taille moyenne a augmenté légèrement et ceci aurait été causé par l'agglomération d'une certaine proportion des liposomes lors de l'entreposage. L'effet du temps n'a été testé que pour les liposomes ayant 30 % de DC-Chol.

L'ajout de NaCl est l'un des deux facteurs ayant été testés. Le second est l'équilibre de la bicouche lipidique en présence d'une solution saturée en DOPC. Une fois formées, les bicouches lipidiques sont dynamiques; les lipides les constituant sont constamment en échange avec la solution dans laquelle ils baignent. Lors de la préparation des membranes néoPAMPA, la bicouche lipidique a abondamment été rincée avec de l'eau MilliQ. L'eau aurait pu entraîner la perturbation de la bicouche et possiblement la perte d'îlots lipidiques. Pour compléter les trous engendrés, la bicouche lipidique peut être incubée dans une solution saturée en lipides (85, 105). Dû au dynamisme de la bicouche, un échange entre les lipides de la solution et de la bicouche peut avoir lieu ce qui permet la rectification des trous.

La perméabilité de la cassette de médicaments au travers de la membrane néoPAMPA, selon les conditions optimisées, a été mesurée. À titre comparatif, la perméabilité des médicaments au travers du filtre seul a également été évaluée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3.9**. Cet essai a été réalisé dans les plaques 96 puits et les filtres ont été collés avec de la colle à modèle réduit. Plusieurs filtres ont décollé durant l'essai de perméabilité, ce qui explique un nombre d'échantillons différent pour chaque essai. Suite à cette expérience, la méthode de collage a été modifiée pour laisser place à l'acétate de butyle. Malgré cette nouvelle technique de collage des filtres, des micro-fuites non visibles par microscope sont possibles.

Premièrement, tel qu'observé précédemment, le filtre de polycarbonate de 15 nm a limité la perméabilité des médicaments sans toutefois discriminer les molécules en fonction de leur perméabilité attendue. La membrane néoPAMPA a toutefois limité davantage la perméabilité des médicaments. En effet, une diminution significative de la perméabilité des médicaments a été observée avec l'ajout de la pDA et de la bicouche lipidique. Cependant, malgré l'optimisation de la déposition de la bicouche lipidique, la membrane néoPAMPA n'a pas été en mesure de discriminer les molécules en fonction de leur perméabilité attendue. Les coefficients de perméabilité des molécules considérées très perméables sont situés entre 2,8 et $14,3 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ contre 1,0 à $8,3 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les molécules considérées peu perméables.

Tableau 3.9 Perméabilité de la cassette de médicaments suite à l'optimisation de la déposition de la bicouche lipidique avec NaCl et solution saturée en lipides

Perméabilité attendue	Composé	Coefficient de perméabilité ($\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$)	
		Filtre ¹	NéoPAMPA ²
Très perméable	Vérapamil	67,8 ± 7,6	14,3
	Propranolol	44,6 ± 15,6	4,3
	Kétoprofène	32,6 ± 11,1	2,8
	Kétoconazole	42,2 ± 7,2	2,8
Peu perméable	Aténolol	48,5 ± 19,5	6,9
	Antipyrine	45,8 ± 12,0	8,3
	Furosémide	55,2 ± 24,8	1,7
	HCT	14,2 ± 5,5	1,0

¹ $n = 2$, plaque 96 puits, filtre polycarbonate 15 nm, colle à modèle réduit, test 2h, [cassette] = 15 μM

² $n = 1$, plaque 96 puits, filtre polycarbonate 15 nm, colle à modèle réduit, pDA 4 h, liposomes 70 % DOPC/ 30 % DC-Chol, 640 nm, NaCl et solution saturée en lipides, test 2h, [cassette] = 15 μM

Les résultats obtenus ont probablement été causés par la présence de trous dans la bicouche lipidique. Les liposomes n'auraient pas formé une bicouche continue malgré l'optimisation des conditions de déposition des liposomes. Dans les travaux cités précédemment, le NaCl et l'équilibre de la bicouche dans la solution saturée en lipides ont réellement amélioré la structure de la bicouche. Cependant, les bicouches n'avaient pas été déposées sur des filtres, mais plutôt sur du mica, du verre ou de la silice (85, 86, 100-102, 105). Les pores du filtre, même s'ils ont une taille de 15 nm, représentent une irrégularité majeure comparativement à la surface du mica, par exemple.

Un exemple de l'efficacité de l'ajout du NaCl est présenté à la **Figure 3.6**. Dans les travaux de Moura *et al.* (101), l'adsorption des liposomes sur la surface de silice a été évaluée en fonction de la concentration de liposomes et de la concentration de NaCl ajoutée lors de la déposition des vésicules. La quantité adsorbée sur la surface de silice a été déduite en soustrayant la quantité initialement introduite à la quantité restante en solution après 1 h d'incubation. Les expériences ont été réalisées à pH 6,3 ce qui est représentatif des expériences de ce projet. Les résultats ont démontré que l'ajout de 10 mM ou plus de NaCl

augmentait l'affinité entre le support et les liposomes (**Figure 3.6 C-E**) comparativement aux concentrations de 0,1 et 1 mM de NaCl (**Figure 3.6 A-B**). Dans le cas des plus faibles concentrations de sel, la concentration limite d'adsorption n'a pas été atteinte, ce qui implique que l'affinité entre les liposomes et le support n'était pas maximale.

En résumé, les résultats de l'optimisation de la déposition des liposomes sur les filtres de polycarbonate n'ont pas été concluants. Les coefficients de perméabilité ayant été obtenus sans l'optimisation de la déposition des liposomes (**Tableau 3.7**) sont similaires à ceux obtenus dans le **Tableau 3.9**. Selon ces résultats de perméabilité, les nouvelles conditions de déposition n'ont pas été suffisantes pour rendre la membrane néoPAMPA fonctionnelle. Cependant, les conditions optimisées ont été conservées pour la suite des expériences. En effet, les images prises par AFM, par S. Nirasay (non publiées), ont montré que l'ajout de NaCl et l'équilibre dans la solution saturée de DOPC diminuaient la proportion de trous dans la bicouche lipidique. Malgré cette diminution, la proportion résiduelle de trous empêcherait la discrimination de la perméabilité des molécules (section 4.1).

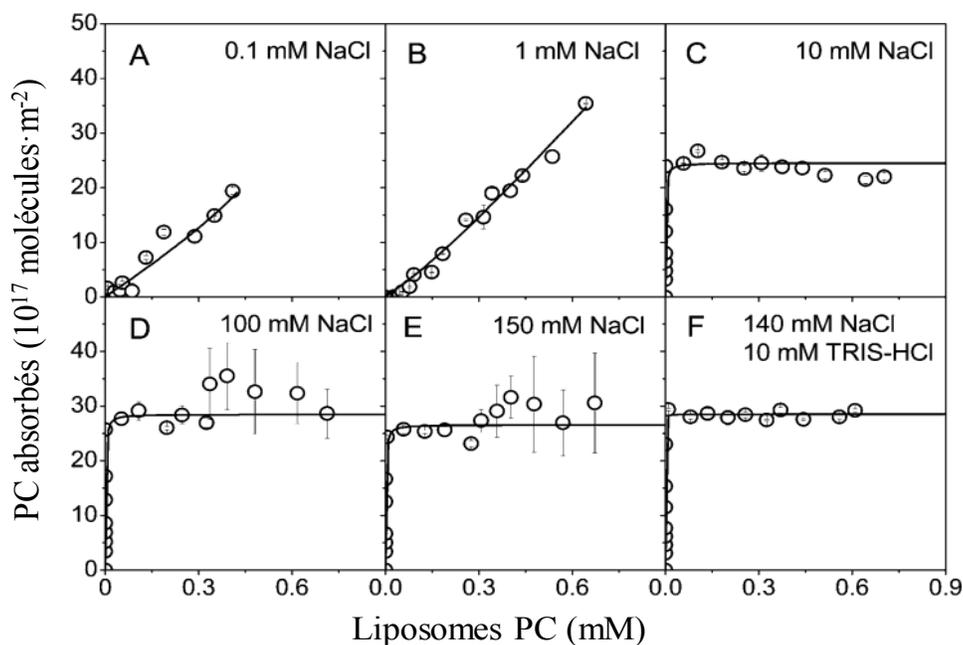


Figure 3.6 Effet du NaCl sur la déposition des liposomes sur une surface de silice [Reproduite et traduite avec permission de (101)]

3.5.3 Conditions du test de perméabilité

3.5.3.1 Adhérence de la cassette de médicaments

À la fin des tests de perméabilité, la quantité totale de médicaments initialement introduite dans l'essai doit être retrouvée. En effet, la somme de la quantité de médicaments dans le compartiment donneur et le compartiment receveur doit correspondre à la quantité initiale introduite; c'est le recouvrement. Si le recouvrement n'est pas total alors une certaine quantité de médicaments a adhéré à une surface disponible dans l'essai de perméabilité ou s'est dégradée. Les surfaces disponibles dans le test de perméabilité néoPAMPA sont nombreuses. Il y a le plastique du dispositif, le filtre, la pDA et les lipides. De plus, si la quantité de médicaments ayant adhéré aux surfaces est plus grande que la quantité de médicaments ayant diffusé alors le calcul du coefficient de perméabilité apparente est altéré. Le but était donc de déterminer le recouvrement de la quantité de médicaments en fonction de ces différentes surfaces et en fonction de la concentration de la cassette de médicaments. Les résultats de l'adhérence des médicaments au plastique, à la pDA et au filtre sont présentés à la **Figure 3.7**.

La concentration de la cassette de médicaments n'a pas influencé l'adhérence des médicaments aux différentes surfaces. La saturation des sites de liaison n'a donc pas été atteinte. Il avait été supposé que l'augmentation de la concentration de la cassette de médicaments minimiserait l'impact du collage, or ça n'a pas été le cas. Un recouvrement incomplet (< 100 %) a été observé pour le kétoconazole en présence du plastique et du filtre. Les résultats observés pour le collage au plastique et à la pDA étaient identiques. Le plastique étant également présent lors du test de collage à la pDA, il a été supposé que le kétoconazole présentait seulement de l'adhérence au plastique. Un recouvrement incomplet a également été observé pour le vérapamil à une concentration de 10 μ M en présence du plastique. Par contre, il n'a pas présenté d'adhérence aux autres constituants de la membrane néoPAMPA. Le vérapamil et le kétoconazole possèdent les deux logP calculés (CSPredict) les plus élevés de la cassette de médicaments, soient 3,77 et 3,91 respectivement. Les molécules hydrophobes ont tendance à adhérer au plastique, ce qui peut expliquer leur comportement dans les puits des plaques Costar. Le recouvrement a été complet pour les autres molécules en présence du

plastique et de la pDA. Cependant, en présence des filtres, une adhérence marquée a été observée pour le furosémide; son logP calculé (CSPredict) est de 2,15. Cette adhérence pourrait être attribuée à l'affinité du furosémide pour le filtre.

Ainsi, selon ces tests, seul le kétoconazole et le furosémide ont présenté un recouvrement inférieur à 90 % et donc une adhérence supérieure à la quantité de médicaments acceptable pour ces tests de perméabilité.

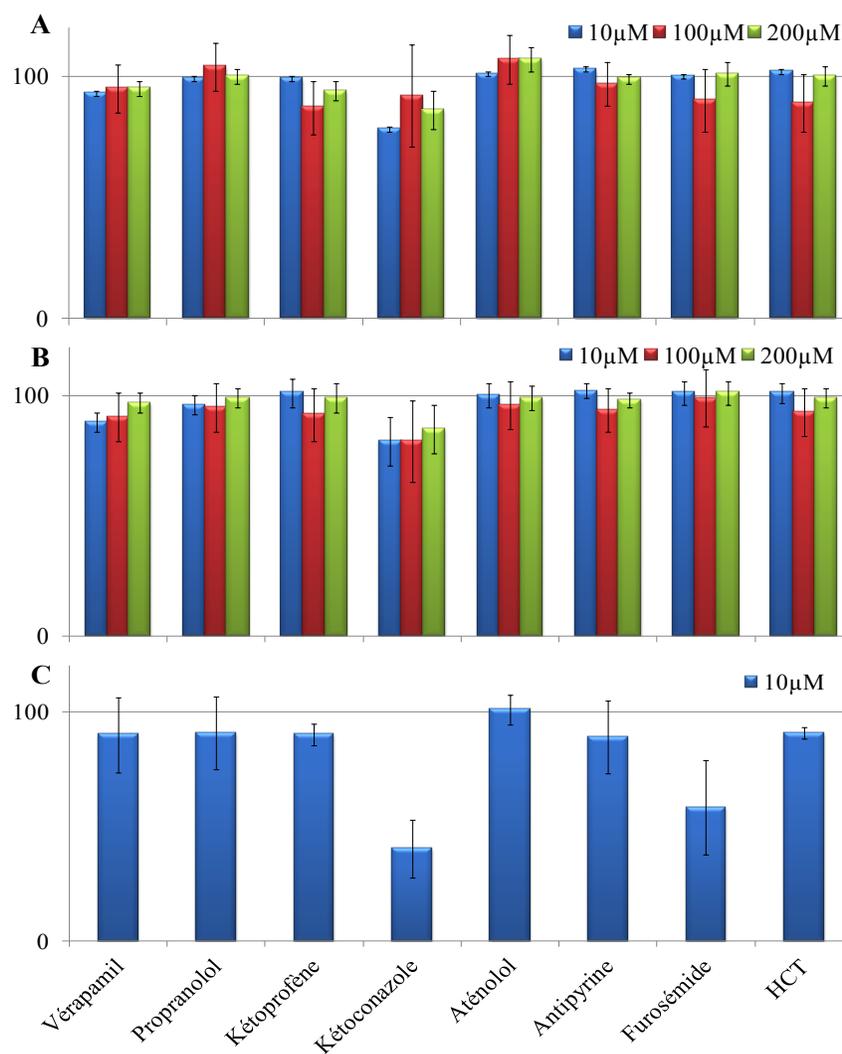


Figure 3.7 Recouvrement de la cassette de médicaments
A. Adhérence au plastique (n = 6) **B.** Adhérence à la combinaison plastique et pDA (n = 6) **C.** Adhérence à la combinaison plastique et filtre de polycarbonate 15 nm (n = 3)

Le pourcentage de recouvrement a également été déterminé suite aux tests de perméabilité avec la membrane néoPAMPA complète afin de déterminer la contribution totale du collage. La superposition des constituants de la membrane a pu modifier la disponibilité des surfaces de collage changeant ainsi les proportions d'adhérence des médicaments. Les résultats de ce test sont présentés dans le **Tableau 3.10**.

Tableau 3.10 Pourcentage de recouvrement de la cassette de médicaments suite à un test de perméabilité avec la membrane néoPAMPA complète

Composé	Recouvrement (%)
Vérapamil	90 ± 2
Propranolol	90 ± 5
Kétoprofène	86 ± 6
Kétoconazole	61 ± 2
Aténolol	92 ± 3
Antipyrine	94 ± 5
Furosémide	85 ± 4
HCT	86 ± 6

¹ *n* = 42, plaque 96 puits, filtre polycarbonate 15 nm, pDA 4 h, liposomes 70 % DOPC/ 30 % DC-Chol, test 2h, [cassette] = 10 µM

Des résultats similaires ont été obtenus avec la membrane néoPAMPA complète. Les recouvrements du kétoconazole et du furosémide ont atteint 61 % et 85 %, respectivement. Cependant, le recouvrement du furosémide a été plus élevé en présence de la membrane complète comparativement au filtre seul. En effet, la surface de filtre disponible est minimisée dans la membrane complète due à l'ajout de la pDA et de la bicouche lipidique. De plus, le test de recouvrement avec la membrane complète a démontré que le kétoprofène, le furosémide ainsi que l'HCT ont de l'affinité pour les lipides de la bicouche lipidique puisque leur recouvrement était également inférieur à 90 %.

Les résultats des tests ont donc démontré que le recouvrement n'a pas été total pour le kétoconazole, le kétoprofène, le furosémide et l'HCT. Le calcul du coefficient de perméabilité a donc été modifié pour ces quatre molécules. Pour ce faire, la valeur de C_{D0} dans l'équation 1.6 a été remplacée par la quantité totale de médicaments retrouvée à la fin du test de perméabilité.

3.5.3.2 Cinétique de perméabilité

Les tests de perméabilité de la membrane néoPAMPA doivent être applicables au criblage à haut débit tout comme le test PAMPA. La préparation des membranes du test PAMPA prend environ 5 min versus 20 h pour la préparation des membranes néoPAMPA. Cependant, le test de perméabilité PAMPA est 8 fois plus long que celui du test néoPAMPA. Afin de minimiser davantage la durée des tests de perméabilité du néoPAMPA, la perméabilité de la cassette de médicaments a été évaluée sur une période de 15 min. Les risques étaient que la quantité ayant diffusé dans le compartiment receveur se trouve sous la limite de quantification de la méthode analytique. Finalement, les résultats ont été concluants, puisqu'il a été possible de quantifier les médicaments dans le compartiment receveur (Figure 3.8). De plus, les coefficients de perméabilité calculés pour les huit molécules étaient proportionnels à ceux obtenus après un test de perméabilité d'une durée de 2 h. Le test néoPAMPA a donc permis d'obtenir des résultats de perméabilité 64 fois plus rapidement que le PAMPA, un avantage considérable.

L'évaluation de la cinétique de diffusion des médicaments à des intervalles de 15 min sur une période de 2 h a été réalisée. Les résultats – tenant compte du collage – sont présentés à la **Figure 3.8**. Tel que discuté à la section 1.3.3, le calcul du coefficient de perméabilité apparente selon l'équation 1.6 est possible lorsque la cinétique de diffusion est linéaire. C'est ce qui a été observé pour les huit prélèvements effectués lors du test de perméabilité. En utilisant la pente des droites, un coefficient de perméabilité a pu être calculé selon l'équation 1.5.

Un autre avantage a pu être tiré de cette durée d'essai. En considérant chaque essai de diffusion de 15 min comme un test individuel ceci permet d'obtenir huit coefficients de perméabilité (selon l'équation 1.6) sur une période de 2 h. C'est-à-dire que six membranes néoPAMPA ont permis d'obtenir un $n = 48$ augmentant ainsi la puissance statistique du test. Il est important de comprendre que ceci n'est possible que lorsque la cinétique de diffusion est linéaire. Suite à ces résultats, il a été conclu que les tests de perméabilité subséquents seraient réalisés sous la forme de cinétique de diffusion.

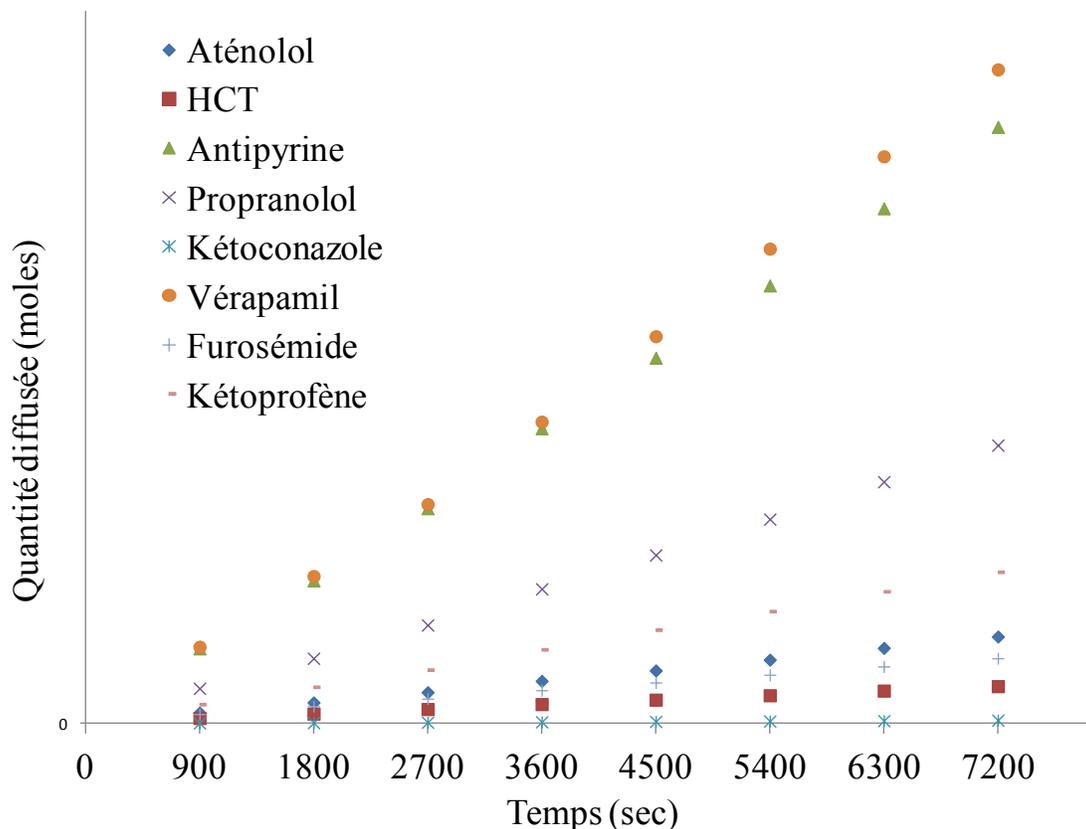


Figure 3.8 Cinétique de diffusion de la cassette de médicaments sur une période de 2 h (n = 6, les écarts-types ont été omis afin d'alléger la figure)

3.5.4 Coefficients de perméabilité avec conditions optimisées

Finalement, un test de perméabilité a été effectué selon les conditions optimisées discutées dans les sections 3.5.1 à 3.5.3. Les conditions optimisées retenues étaient : collage des filtres à l'aide de l'acétate de butyle, filtre de polycarbonate hydrophile ayant des pores de 15 nm à titre de support, plaques Costar 12 puits comme dispositif des tests de perméabilité, bicouche lipidique composée de 70 % DOPC et de 30 % DC-Chol, déposition des liposomes en présence de 150 mM NaCl, équilibre d'une heure de la bicouche lipidique en présence d'une solution saturée en DOPC, concentration de la cassette de médicaments équivalente à 10 μ M, évaluation cinétique de la perméabilité de la cassette de médicaments sur une période de 2 h (n = 48) et, finalement, calcul des coefficients de perméabilité du kétoconazole et du furosémide en fonction de la quantité restante de médicaments à la fin de l'essai. À titre comparatif, la perméabilité de la cassette a également été évaluée au travers du filtre seul et du filtre recouvert de pDA. Les résultats de ce test sont présentés dans le **Tableau 3.11**.

Tableau 3.11 Perméabilité de la cassette de médicaments au travers du filtre, du filtre recouvert de pDA et de la membrane néoPAMPA préparée selon les conditions optimisées, plaque de 96 puits

Perméabilité attendue	Composé	Coefficient de perméabilité ¹ (x 10 ⁻⁶ cm·s ⁻¹)		
		Filtre	Filtre + pDA	NéoPAMPA
Très perméable	Vérapamil	33,9 [30,4; 37,5]	19,8 [17,6; 22,0]	12,4 [11,3; 13,6]
	Propranolol	39,0 [36,3; 41,8]	29,2 [26,7; 31,6]	21,9 [20,5; 23,3]
	Kétoprofène	38,4 [36,3; 40,5]	17,3 [15,9; 18,6]	16,9 [15,8; 18,0]
	Kétoconazole	13,9 [11,8; 16,0]	4,2 [3,4; 5,1]	4,4 [3,8; 4,9]
Peu perméable	Aténolol	38,0 [35,6; 40,4]	27,3 [25,1; 29,5]	17,8 [16,7; 19,0]
	Antipyrine	53,3 [50,5; 56,1]	35,4 [32,9; 37,9]	29,2 [27,6; 30,7]
	Furosémide	37,2 [36,3; 41,8]	8,4 [5,9; 10,9]	6,0 [5,2; 6,8]
	HCT	45,2 [42,6; 47,8]	31,7 [29,4; 34,0]	29,4 [27,9; 31,0]

¹ Les résultats représentent la moyenne des coefficients de perméabilité et leur IC₉₅

La variabilité des résultats des huit molécules était minime, et ce pour les trois essais. Ceci peut être attribué au grand nombre d'échantillons qui a permis d'augmenter la confiance sur l'exactitude la valeur moyenne.

Le filtre recouvert de pDA a limité davantage la perméabilité que le filtre seul ce qui laisse supposer que la pDA a entraîné une restriction de la diffusion des composés. Cette restriction est probablement physique, car la pDA a formé un film sur le support qui a pu recouvrir les pores sans toutefois les obstruer complètement. Les médicaments ont dû diffuser au travers de la pDA avant d'atteindre le compartiment receveur.

Les coefficients de perméabilité de la membrane néoPAMPA n'ont pas été, dans tous les cas, inférieurs aux coefficients de perméabilité mesurés avec le filtre recouvert de pDA. Une diminution significative a été observée pour le vérapamil, le propranolol, l'aténolol et l'antipyrine, mais pas pour les quatre autres molécules. Donc, dans la moitié des cas, la membrane néoPAMPA n'a pas démontré de différence dans la perméabilité des molécules par rapport au filtre recouvert de pDA.

De plus, la membrane néoPAMPA n'a pas été en mesure de discriminer les molécules en fonction de leur perméabilité attendue. La perméabilité des molécules considérées très

perméables a varié entre 4,4 [3,8; 4,9] et 21,9 [20,5; 23,3] $\times 10^{-6}$ $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ comparativement aux molécules considérées peu perméables dont les coefficients de perméabilité sont situés entre 6,0 [5,2; 6,8] et 29,4 [27,9; 31,0] $\times 10^{-6}$ $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. L'objectif primaire de la membrane néoPAMPA était de discriminer les molécules en fonction de leur perméabilité attendue; cet objectif n'a donc pas été accompli malgré les optimisations apportées.

3.6 Conclusion

La préparation de la membrane néoPAMPA ainsi que les conditions des tests de perméabilité ont été optimisées. Le support de la membrane néoPAMPA, la bicouche lipidique et la manière de mener les tests de perméabilité ont été modifiés par rapport aux travaux de S. Nirasay et de S. Zarra. Plusieurs conclusions ont découlé de ces optimisations : (1) la représentativité biologique de la membrane a été améliorée par l'incorporation de 30 % DC-Chol dans la bicouche lipidique; (2) l'adaptation du test au criblage à haut débit a également été améliorée en diminuant la durée du test de perméabilité de 2 h à 15 min; (3) l'ajout de NaCl et de l'équilibre dans la solution saturée en DOPC lors de la déposition des liposomes ont favorisé la fusion des liposomes; et (4) les études d'adhérence ont permis de mieux de comprendre où se trouvait la quantité manquante de médicaments à la fin des tests de perméabilité. Malgré tous ces changements, la membrane néoPAMPA n'a pas permis de discriminer les molécules très perméables des molécules peu perméables comparativement au test de référence, le PAMPA. D'autres optimisations sont nécessaires afin d'obtenir une bicouche lipidique uniforme et continue ne présentant pas de trous. La modification du coussin de polydopamine pourrait également être envisagé.

Chapitre 4 : Stabilité et conditionnement

4.1 Introduction

Afin de déterminer le conditionnement optimal de l'essai néoPAMPA, l'évaluation de la stabilité de la cassette de médicaments, de la préparation liposomale et de la membrane néoPAMPA sont nécessaires.

L'évaluation de la stabilité de la cassette de médicaments et des liposomes n'a pas été réalisée par S. Zaraa et S. Nirasay. Par contre, la stabilité des membranes néoPAMPA complètes a été déterminée par cette dernière. Les membranes néoPAMPA ont été préparées sur du mica puis elles ont été entreposées à 4 °C dans une solution saturée de DOPC. Les membranes ont été imagées par AFM à différents temps donnés. Les images d'AFM ont permis de calculer le rapport de la surface occupée par la bicouche lipidique sur la surface occupée par les trous ou les défauts de la bicouche. Par exemple, une membrane ayant un rapport de surface de 50 % est une membrane dont seulement la moitié de sa surface est recouverte d'une bicouche lipidique. La stabilité de la membrane a été évaluée en fonction du changement de ce rapport de surface. Une diminution significative du rapport de surface indiquait un manque de stabilité.

La stabilité des membranes composées de différents pourcentages de DC-Chol a été évaluée. Les membranes néoPAMPA contenant 10 %, 20 % et 30 % DC-Chol ont montré une stabilité pour une période de sept jours. Ce sont les membranes contenant 20 % et 30 % DC-Chol qui ont présenté le meilleur rapport de surface soit environ 80 % comparativement à 50 % pour les membranes composées de 10 % DC-Chol. Les rapports de surface étaient de 78 ± 4 % au jour 1, de 80 ± 3 % au jour 3 et de 81 ± 7 % au jour 7 pour les membranes néoPAMPA composées de 30 % DC-Chol. (S. Nirasay, données non publiées)

Selon ces résultats, les membranes néoPAMPA composées à 30 % DC-Chol ont un rapport de surface de 80 % lorsqu'elles sont préparées sur un support de mica. Il a été supposé que le pourcentage est moindre ou similaire lorsque les membranes sont préparées sur une

surface moins lisse et poreuse tel un filtre. Un recouvrement incomplet du filtre par la bicouche pourrait expliquer le manque de discrimination de la perméabilité des composés observé à la section 3.5.4. Une présence accrue de défauts peut également influencer négativement la stabilité des membranes. La stabilité des membranes néoPAMPA préparées sur les filtres de polycarbonate devra être évaluée lorsque celles-ci seront fonctionnelles, c'est-à-dire lorsqu'elles seront en mesure de discriminer les molécules en fonction de leur perméabilité attendue.

Les résultats de stabilité permettront d'établir le conditionnement optimal pour la commercialisation de l'essai néoPAMPA. Le conditionnement final ne pourra être connu que lorsque les membranes néoPAMPA seront fonctionnelles puisque la stabilité devra être évaluée sur le produit fini.

4.2 Objectifs

Les membranes néoPAMPA n'étant pas encore complètement fonctionnelles, la stabilité de ses précurseurs, soit la cassette de médicaments et de la préparation liposomale, ont été évaluées. La stabilité de ces deux éléments a été déterminée dans trois conditions d'entreposage.

4.3 Matériel

Les plaques d'injection 96 puits 0,5 mL en polypropylène ont été achetées chez Agilent Technologies (Californie, États-Unis). Le DC-Cholestérol·HCl ($\approx 95\%$) et l'hydroxyanisole butylé (BHA) ($\geq 98,5\%$) ont été commandés chez Sigma Aldrich (Ontario, Canada). Le méthanol (grade HPLC) et le chloroforme (anhydre $\geq 99\%$) ont été achetés chez Fisher Scientific (Ontario, Canada). Le DOPC ($> 99\%$) et les filtres de polycarbonate hydrophile (400 nm; 19 mm) proviennent de chez Avanti Polar lipids (Alabama, États-Unis). Les tampons phosphates ont été préparés selon la pharmacopée américaine USP (69) à pH 6,4 et 7,4. La provenance des composés de la cassette de médicaments est répertoriée au Chapitre 2.

4.4 Méthodes

4.4.1 Stabilité de la cassette de médicaments

Trois solutions de la cassette de médicaments (50 mL, 10 µM) ont été préparées selon la méthode décrite au Chapitre 2. Trois conditions d'entreposage ont été testées : au réfrigérateur à 4 °C dans des bouteilles en verre clair, à 21 °C dans des flacons en verre clair et dans des flacons en verre ambré. La concentration de la cassette de médicaments de chaque lot a été évaluée aux jours 0 et 14. Les échantillons du test de stabilité ont été quantifiés par la méthode HPLC-MS/MS validée et décrite au Chapitre 2. Les produits de dégradation n'ont pas été quantifiés.

4.4.2 Stabilité des liposomes

Trois préparations liposomales (1 mL, 70 % DOPC / 30 % DC-Chol) ont été réalisées selon la méthode décrite au Chapitre 3. Deux conditions d'entreposage ont été testées : au réfrigérateur à 4 °C et dans l'azote liquide. Les préparations ont été entreposées dans des tubes de 1,5 mL en plastique. La stabilité des liposomes a été déterminée en fonction de leur taille aux jours 0, 1, 7, 14, 21, 28, 35 et 41.

La taille de chaque préparation liposomale a été mesurée par diffusion dynamique de la lumière (Malvern, Zetasizer) suite à une dilution dans l'eau MilliQ (1:19). Cette dilution a permis d'obtenir une valeur d'atténuation de 7. La position du laser a été déterminée de manière automatique pour chaque mesure. L'angle de la mesure était de 173° et la température était de 21 °C. Afin d'assurer la reproductibilité, 3 mesures de 25 cycles ont été prises par échantillon.

4.5 Résultats

4.5.1 Stabilité de la cassette de médicaments

Les données de stabilité de la cassette de médicaments sont des données préliminaires puisque la stabilité n'a été évaluée que sur 14 jours et les produits de dégradation n'ont pas été identifiés. De plus, la variabilité des résultats est plus élevée qu'attendue. La quantité restante

de médicaments par rapport à la quantité initiale (en pourcentage) pour chaque lot et pour les trois conditions sont présentées dans le **Tableau 4.1**. La stabilité a été évaluée en fonction d'un ratio; le pourcentage de la concentration de la solution à un temps donné relativement à la concentration initiale de cette solution. Il a été établi que le pourcentage relatif à la concentration initiale devait être situé au-dessus de 90 % pour que la solution soit considérée stable.

Tableau 4.1 Stabilité de la cassette de médicaments à 14 jours

Composé	Condition	Lot 1 (%)	Lot 2 (%)	Lot 3 (%)	Moyenne (%)
Vérapamil	21 °C, clair	71	75	79	75 ± 4
	21 °C, ambré	74	78	74	75 ± 2
	4 °C	67	63	77	69 ± 7
Propranolol	21 °C, clair	72	76	77	75 ± 3
	21 °C, ambré	75	81	74	77 ± 4
	4 °C	66	71	84	74 ± 9
Kétoprofène	21 °C, clair	19	17	20	19 ± 2
	21 °C, ambré	48	56	47	50 ± 5
	4 °C	43	42	53	46 ± 6
Kétoconazole	21 °C, clair	120	106	113	113 ± 7
	21 °C, ambré	133	130	114	126 ± 10
	4 °C	84	109	154	116 ± 35
Aténolol	21 °C, clair	95	100	101	99 ± 3
	21 °C, ambré	97	105	92	98 ± 7
	4 °C	103	86	106	98 ± 11
Antipyrine	21 °C, clair	104	116	111	110 ± 6
	21 °C, ambré	109	127	95	110 ± 16
	4 °C	73	77	100	83 ± 15
Furosémide	21 °C, clair	24	26	27	26 ± 2
	21 °C, ambré	37	38	38	38 ± 1
	4 °C	39	31	40	37 ± 5
HCT	21 °C, clair	127	102	118	116 ± 13
	21 °C, ambré	109	98	100	102 ± 6
	4 °C	27	35	93	52 ± 36

Après 14 jours, seul le kétoconazole et l'hydrochlorothiazide possédaient une concentration moyenne supérieure à la limite de 90 % à 21 °C. À 4 °C, seul le kétoconazole et l'aténolol étaient stables après 14 jours. Les données supérieures à 120% (erreur acceptable)

obtenues pour le kétoconazole peuvent résulter d'une mauvaise homogénéisation des échantillons ou d'évaporation. Toutes les autres molécules ont été dégradées. De plus, une tendance attendue a été observée; les solutions entreposées à 21 °C se sont dégradées plus rapidement que les solutions entreposées à 4 °C. Une exception à cette tendance est l'hydrochlorothiazide. Cette molécule fait partie de la classe BCS IV et elle est donc peu soluble. Une baisse de la température a pu entraîner une diminution de sa solubilité et donc une précipitation. Le kétoprofène est connu pour être sensible à la lumière ce qui explique sa dégradation accrue dans les vials en verre clair (106). L'instabilité de ce composé, formulé sous forme de suspension, a déjà été observée après seulement sept jours d'entreposage à 5 °C à un pH de 6,5. Pour améliorer la stabilité de l'hydrochlorothiazide, le pH de la solution a dû être diminué à 3,3 afin de minimiser l'hydrolyse du groupement thiazide (107). Cependant, dans le cas de l'essai néoPAMPA, la diminution du pH n'est pas possible.

Après 14 jours d'entreposage, 6 des 8 composés, et ce peu importe la condition, ont atteint moins de 90 % de la concentration initiale. La cassette de médicaments ne pourra donc pas être conditionnée avec l'essai néoPAMPA. Une option à ce manque de stabilité serait de conditionner l'essai avec les solutions mères à 10 mM de chacun des composés. Les solutions seraient préparées dans le DMSO ou l'acétonitrile en fonction de la solubilité des molécules. La stabilité de ces solutions devra être évaluée, mais l'absence d'eau dans les solutions réduirait les risques de dégradation par hydrolyse.

4.5.2 Stabilité de la suspension liposomale

Des données préliminaires de stabilité de la suspension liposomale (70% DOPC/30% DC-Chol) entreposée à 4 °C sont présentées dans le **Tableau 4.2**. La stabilité a été évaluée pour un seul lot sur une période de 28 jours. La taille moyenne des liposomes entreposés à 4 °C est restée constante durant 28 jours.

Tableau 4.2 Taille moyenne des liposomes (70% DOPC/30% DC-Cholestérol) en fonction du temps et des conditions d'entreposage

Temps (jour)	4 °C	
	Taille moyenne (nm)	PdI
0	310 ± 3	0,151
1	318 ± 4	0,199
7	322 ± 7	0,218
14	320 ± 5	0,174
28	319 ± 8	0,193

Suite à ces résultats, des études de stabilité sur trois lots de préparation liposomale ont été réalisées à 4 °C et dans l'azote liquide. Un entreposage de la préparation liposomale dans l'azote liquide a été testé puisque l'entreposage à -20 °C n'aurait pas été concluant. Les résultats de ces études de stabilité sont présentés à la **Figure 4.1** et la **Figure 4.2**.

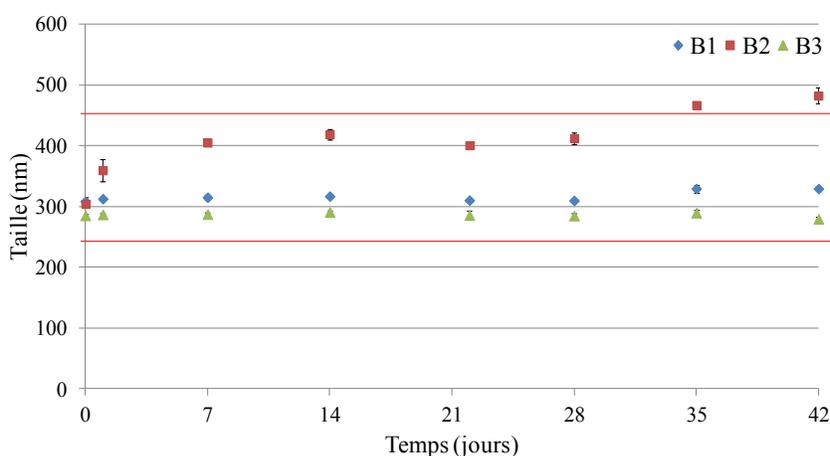


Figure 4.1 Taille moyenne des liposomes (70% DOPC/30% DC-Cholestérol) entreposés à 4 °C en fonction du temps

Une taille de liposomes entre 250 nm et 450 nm a été établie comme étant une taille acceptable pour la déposition des liposomes. Les trois préparations liposomales ont été stables jusqu'au jour 28 lorsqu'elles ont été entreposées à 4 °C. (**Figure 4.1**) Cependant, le lot B2 a dépassé la limite de 450 nm au jour 31. En effet, la taille de ce lot n'a cessé d'augmenter depuis le jour 1 comparativement aux deux autres lots dont leur taille est restée stable tout au long de l'étude. Il semble que ce lot soit aberrant. L'étude a été reprise avec trois lots et les résultats ont montrés qu'ils étaient tous stables jusqu'à 35 jours.

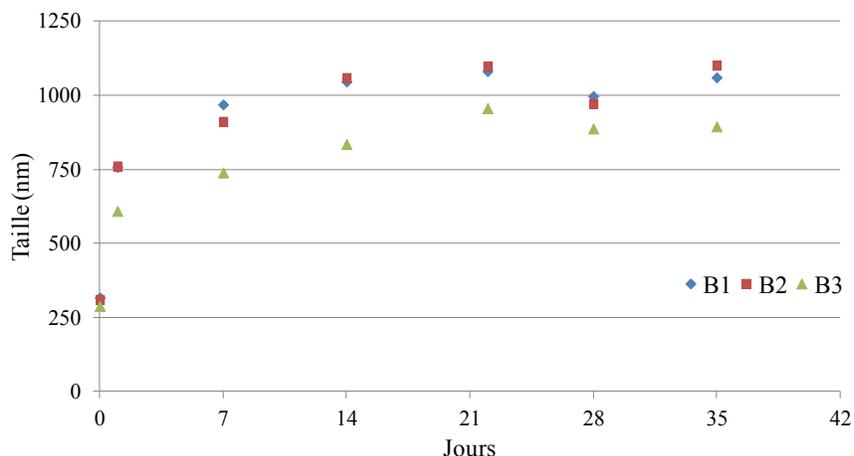


Figure 4.2 Taille moyenne des liposomes (70% DOPC/30% DC-Cholestérol) entreposés dans le N₂ liquide en fonction du temps

Suite à un entreposage des liposomes dans l'azote liquide, la taille moyenne a augmenté au-dessus de 450 nm dès la première journée. Les préparations liposomales entreposées dans l'azote liquide n'ont donc pas été stables. Par conséquent, un entreposage de la suspension liposomale est recommandé pour une durée maximale de 28 jours à 4 °C.

4.6 Conclusion

Une solution de la cassette de médicaments ne pourra pas être commercialisée avec l'essai néoPAMPA étant donné le manque de stabilité. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer la stabilité des solutions mères des molécules. L'acheteur de l'essai n'aura qu'à préparer une solution fraîche le jour de l'essai à partir des solutions mères fournies. Un protocole de la préparation de la cassette pourra également être inclus. De plus, si la stabilité des membranes néoPAMPA fonctionnelles n'est pas démontrée, l'essai néoPAMPA pourrait être conditionné sous forme de pièce détachée. Une stabilité de 28 jours pour la préparation liposomale n'est pas suffisante pour la commercialisation de l'essai. La préparation de lipides réhydratés dans le tampon phosphate pH 7,4 pourrait alors être conditionnée. L'extrusion serait réalisée par l'acheteur et il pourrait conserver les liposomes à 4 °C durant un mois. L'essai vendu contiendrait alors la plaque 12 puits Costar avec les filtres de polycarbonate recouvert de pDA, la préparation de lipides réhydratés et une solution saturée en DOPC réfrigérée à 4 °C ainsi qu'une solution de tampon phosphate à pH 7,4

contenant 150 mM NaCl. L'acheteur n'aurait plus qu'à effectuer la déposition dans son laboratoire.

Chapitre 5 : Conclusion

Les objectifs énumérés au Chapitre 1 ont été réalisés. Premièrement, une méthode analytique HPLC-MS/MS a été développée et validée afin de quantifier les huit molécules standards qui composent la cassette. L'analyse simultanée de cette cassette de médicaments est favorable à l'application de l'essai néoPAMPA au criblage à haut débit. De plus, la méthode analytique peut être utilisée avec d'autres tests de perméabilité *in vitro* non cellulaires, tels que le PAMPA ou le PVPA, pour permettre la standardisation des résultats de perméabilité. Deuxièmement, le test PAMPA a été reproduit à titre d'essai contrôle de la perméabilité passive transcellulaire. Les coefficients de perméabilité obtenus concordent avec les résultats de la littérature. Les valeurs de perméabilité peuvent donc être utilisées à titre comparatif de l'essai néoPAMPA. Troisièmement, deux composantes de la membrane néoPAMPA ont été optimisées, le filtre (nature et taille des pores) et la bicouche lipidique. Ces optimisations ont apportées des améliorations à la membrane ainsi qu'une meilleure compréhension du fonctionnement de celle-ci. Finalement, la stabilité de la cassette de médicaments et des liposomes a été évaluée ce qui a permis d'ériger un plan pour le conditionnement de l'essai néoPAMPA.

Cependant, la membrane néoPAMPA n'est pas pleinement fonctionnelle malgré les optimisations effectuées. Le manque de discrimination de la membrane néoPAMPA est possiblement causé par la bicouche lipidique. Le recouvrement complet, uniforme et continu du filtre par la bicouche lipidique n'a pas été obtenu. Tel que mentionné, le recouvrement optimal obtenu du mica par la bicouche lipidique, composée de 70 % DOPC / 30 % DC-Chol, a été de 80 %. Le recouvrement d'une surface plus poreuse, comme les filtres, par cette même bicouche risque d'être inférieur ou égal. Pour rendre la membrane néoPAMPA fonctionnelle, un autre type de polymère ou d'ancrage pourrait être utilisé afin que l'adhérence entre le coussin de polymère et les lipides soit plus forte, plus solide. Une meilleure adhérence pourrait ainsi augmenter le taux de recouvrement des filtres. Il serait également possible d'envisager le retrait du coussin de polymère afin de fonctionnaliser directement le filtre. Le retrait du coussin de polydopamine permettrait d'obtenir une surface plus lisse et possiblement un meilleur recouvrement du filtre par la bicouche lipidique. L'utilisation d'un filtre de nature

hydrophobe pourrait également être envisagée. Cette hypothèse a été testée brièvement au cours des travaux présentés, mais les conditions de préparation de la membrane n'avaient pas été optimisées pour ce type de filtre. L'utilisation d'un filtre hydrophobe augmenterait la composante hydrophobe totale de la membrane néoPAMPA ce qui permettrait une meilleure discrimination entre les molécules dû à la nécessité d'une affinité hydrophobe pour traverser la membrane.

D'autres options ont également été envisagées afin de remédier aux problèmes liés à la bicouche lipidique. Premièrement, S. Nirasay poursuit les optimisations afin de maximiser l'ancrage des lipides à la pDA dans le but d'obtenir un recouvrement total. Deuxièmement, un autre type de modèle de perméabilité a été envisagé soit le filtre simplement recouvert de pDA. En effet, tel que présenté au **Tableau 3.11**, les coefficients de perméabilité calculés pour la combinaison filtre recouvert de pDA avaient montré une limitation inattendue des molécules par ce modèle. La membrane de ce nouveau modèle devient alors entièrement hydrophile et négativement chargée due à la présence de la pDA. Ces deux caractéristiques sont représentatives des jonctions serrées des membranes cellulaires et donc de la diffusion passive paracellulaire. La membrane néoPAMPA pourrait évoluer vers un modèle de perméabilité paracellulaire, le néoPARA.

Peu de modèles de l'évaluation de la perméabilité paracellulaire existent. En fait, il existe des modèles *ex vivo* et *in vitro* cellulaires, mais aucun modèle *in vitro* non cellulaire n'a été répertorié. Les sacs d'intestins éversés peuvent être utilisés pour l'évaluation de la perméabilité paracellulaire et des autres mécanismes de transport (108). Dans ce modèle, la contribution de la voie paracellulaire est déterminée grâce à l'utilisation d'un activateur paracellulaire comme l'acide tétraacétique de l'éthylène glycol (EGTA). La perméabilité d'une molécule est évaluée en présence et en absence de cet activateur. Si la perméabilité totale augmente en présence de l'activateur, alors la voie paracellulaire est empruntée par la molécule. Les cellules Caco-2 peuvent également être utilisées pour l'évaluation de la perméabilité paracellulaire (109, 110). Cependant, la perméabilité sera sous-estimée puisque les jonctions serrées du colon sont plus étroites que les jonctions serrées du jéjunum (111). Une autre culture cellulaire peut alors être utilisée, la 2/4/A1. La monocouche formée par ces

cellules permet d'obtenir la taille des jonctions serrées du petit intestin. Cependant, la culture de ces cellules est ardue puisqu'elles ne sont pas immortelles. Un plasmide doit être transfecté afin qu'elles le deviennent (111). Les modèles paracellulaires cellulaires ou *ex vivo* existants nécessitent des installations particulières et ils sont dispendieux à réaliser. Il y a donc un réel besoin pour le développement d'un modèle *in vitro* non cellulaire de l'évaluation de la perméabilité paracellulaire. Ce type d'essai serait utile pour l'évaluation en phase de découverte du médicament de composés ionisés qui relèvent typiquement de la classe BCS III.

La perméabilité paracellulaire est influencée par le logP, la masse molaire (MM) ainsi que la charge des molécules. Afin de déterminer l'applicabilité du modèle néoPARA (filtre de polycarbonate ayant des pores de 15 nm recouvert de pDA), les coefficients de perméabilité obtenus ont été comparés à l'indice paracellulaire (IP) de la cassette de médicaments. L'IP a été calculé à partir du logP et de la MM des composés en assumant qu'ils contribuaient de manière égale à la diffusion passive paracellulaire. Le logP, la MM, le pKa, la charge des molécules à pH 6,4 ainsi que l'IP des molécules de la cassette sont présentés dans le **Tableau 5.1**. Les valeurs ont été estimées à partir du logiciel CSPredict.

Tableau 5.1 Propriétés physicochimiques des molécules de la cassette de médicaments

Composé	LogP	MM	pKa	Charge à pH 6,4	IP
Vérapamil	3,8	455,6	7,73	+	1,83
Propranolol	1,7	259,4	9,1 et 14,3	+	0,92
Kétoprofène	2,7	254,3	4,18	-	1,16
Kétoconazole	3,9	531,4	6,8	+/neutre	2,00
Aténolol	0,4	266,3	8,6 et 13,3	+	0,60
Antipyrine	0,3	188,2	5,6	neutre	0,43
Furosémide	2,2	330,7	2,1 et 3,4	-	1,17
HCT	-0,4	297,7	1,7	+	0,46

L'IP n'est pas connu de la littérature. Il a été calculé ici afin d'estimer la perméabilité paracellulaire des molécules de la cassette de médicaments à défaut d'un test de perméabilité contrôle. L'IP a été calculé, selon l'équation 1.7, relativement au kétoconazole puisqu'il présente le logP et la MM les plus élevés soit le passage paracellulaire le moins probable.

$$\text{Indice paracellulaire} = \frac{\log P}{3,9} + \frac{MM}{531,4} \quad (\text{Éq. 1.7})$$

Plus l'IP est élevé, plus la diffusion passive paracellulaire est faible. Les résultats des coefficients de perméabilité ont alors été comparés aux IP. Une corrélation a été observée pour six des huit molécules. (**Figure 5.1**) Le traitement statistique réalisé est un ANOVA unilatéral avec ajustement de Bonferroni. Le modèle néoPARA est donc prometteur pour l'évaluation de la perméabilité paracellulaire.

Des expériences futures ont été planifiées afin de valider le nouveau modèle. Des molécules standards dont la perméabilité paracellulaire est connue doivent être testées avec le modèle néoPARA. Ainsi, les résultats obtenus pourraient être comparés à ceux de la littérature plutôt qu'à un indice paracellulaire. La perméabilité paracellulaire de plusieurs molécules a été évaluée dans les modèles *in vitro* cellulaires élaborés par Pade *et al.* (110) et Adson *et al.* (109). Les perméabilités mesurées dans leurs essais sont présentées dans le **Tableau 5.2**. Les molécules répertoriées seraient les molécules standards du test néoPARA.

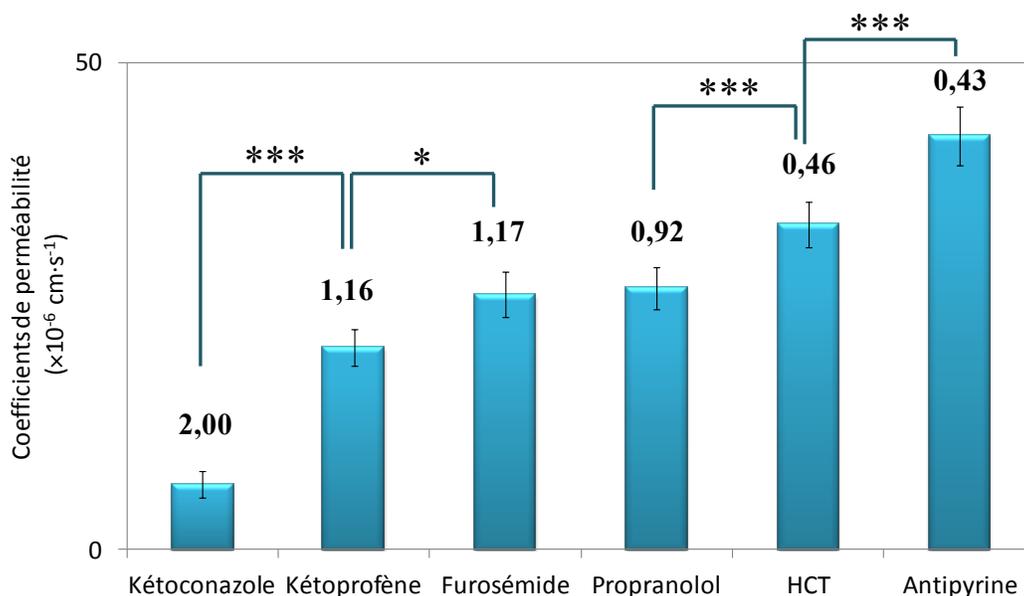


Figure 5.1 Comparaison de la perméabilité des composés et de leur indice paracellulaire

Tableau 5.2 Perméabilité paracellulaire des 9 molécules standards déterminées par Adson *et al.* (109)

Composé	Perméabilité paracellulaire ($\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$)
Urée	4,26
Mannitol	1,17
Aténolol	1,50
Chlorothiazide	~ 0,22
Furosémide	~ 0,17
Cimétidine	~ 0,27
Acide salicylique	~ 0,54
Propranolol	~ 0,25
Naproxène	~ 0,25

En conclusion, le test néoPAMPA tel qu'élaboré au début de ce projet n'a pu discriminer les molécules en fonction de leur capacité à diffuser de manière transcellulaire. Ce manque de discrimination est vraisemblablement causé par une déposition incomplète de la bicouche lipidique. En retirant la bicouche lipidique, un modèle néoPARA de l'évaluation de la perméabilité paracellulaire pourrait être développé.

Bibliographie

1. Nirasay S, Mouget Y, Marcotte I, Claverie JP. Supported bilayer on a nanopatterned membrane as model PAMPA membranes. *Int J Pharm.* 2011;421(1):170-5.
2. Nirasay S, Badia A, Leclair G, Claverie JP, Marcotte I. Polydopamine-Supported Lipid Bilayers. *Materials.* 2012;5(12):2621-36.
3. Zaraa S. Optimisation et évaluation d'un nouveau test PAMPA amélioré pour la prédiction de l'absorption intestinale de médicaments (Mémoire de maîtrise). Université de Montréal. 2013.
4. Lim DV. *Microbiology*. Third edition. éd.: Kendall/Hunt; 2003. Disponible: <http://books.google.fr/books?id=CKEgLmqfbRQC>
5. Garrett RH, Grisham CM, Lubochinsky B. *Biochimie. De Boeck Supérieur*; 2000. Disponible: <http://books.google.fr/books?id=qBHikj6nLwIC>
6. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews.* 2001;46(1-3):3-26.
7. Ungell A-LB. Drug transport mechanisms across the intestinal epithelium Dans: Dressman JB, Reppas C, rédacteurs. *Oral drug absorption: prediction and assessment.* 2nd ed. éd. New York: New York : Informa Healthcare; 2010.
8. Pandit NK. *Introduction to the Pharmaceutical Sciences.* Lippincott Williams & Wilkins; 2007. Disponible: <http://books.google.fr/books?id=CkQ9VI8jMocC>
9. Xu Y, Tillman TS, Tang P. Membranes and drug action. Dans: Bachmann KA, Messer WS, rédacteurs. *Pharmacology : Principles and Practice.* London: Academic Press; 2008.
10. Fromm M, Schulzke JD. *Molecular Structure and Function of the Tight Junction.* Wiley; 2009. [cité le 2014-05-19]. Disponible: <http://books.google.fr/books?id=j0GfDB6uiTYC>
11. Griffin B, O'Driscoll C. Models of the small intestine. Dans: Ehrhardt C, Kim K-j, rédacteurs. *Drug absorption studies : in situ, in vitro and in silico models.* New York: Springer; 2008.
12. Baluska F, Volkmann D, Barlow PW. *Cell-Cell Channels.* Landes Bioscience / Eureka.com; 2007. Disponible: http://books.google.fr/books?id=WbptF_uwNKUC
13. König J. Uptake transporters of the human OATP family. Dans: Fromm MF, Kim RB, rédacteurs. *Drug transporters.* Heidelberg, New York: SpringerLink; 2011.
14. Friedhelm S, Atshaves BP, Gallegos AM, McIntosh AL, Liu JCS, Kier AB, et al. Lipid rafts and caveolae organization. Dans: Frank PG, Lisanti MP, rédacteurs. *Caveolae and lipid rafts roles in signal transduction and the pathogenesis of human disease.* Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press; 2005.
15. Orlichenko SL, McNiven AM. The caveolae internalization machinery. Dans: Frank PG, Lisanti MP, rédacteurs. *Caveolae and lipid rafts roles in signal transduction and the pathogenesis of human disease.* Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press; 2005.
16. Washington N. *Physiological pharmaceuticals : barriers to drug absorption.* 2nd ed. éd. Washington C, Wilson CG, rédacteurs. London: Taylor & Francis; 2001.

17. Ramakrishnan S. Textbook of Medical Biochemistry. Orient Longman; 2004. [cité le 2014-05-20]. Disponible: <http://books.google.fr/books?id=BVpDI7n2M9gC>
18. Ahmad S. Manual of clinical dialysis. 2nd ed. éd. SpringerLink, rédacteur. New York, London: Springer; 2009.
19. Eaton DC. Vander's renal physiology. 7th ed. éd. Pooler JP, Vander AJ, rédacteurs. New York, Toronto: McGraw Hill Medical; 2009.
20. Valtin H. Renal function : mechanisms preserving fluid and solute balance in health. 3rd ed. éd. Schafer JA, rédacteur. Boston: Toronto : Little, Brown, and Co.; 1995.
21. Cooper GM. The cell : a molecular approach. 5th ed. éd. Hausman RE, rédacteur. Washington, DC : Sunderland, MA: ASM Press : Sinauer Associates; 2009.
22. Karp G. Cell and molecular biology : concepts and experiments. 7th ed. éd: Hoboken, NJ : John Wiley; 2013.
23. McMullen TPW, Lewis RNAH, McElhaney RN. Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Curr Opin Colloid In.* 2004;8(6):459-68.
24. UCDavisPhysWiki. Sterol addition directly affects membrane fluidity by fluidizing gel phases and ordering liquid phases from liquid-disordered. Repéré à http://physwiki.ucdavis.edu/Wikitexts/UCD_BPH241/The_fluid_phase 2014.
25. Filippov A, Oradd G, Lindblom G. The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers. *Biophys J.* 2003;84(5):3079-86.
26. Marsh D. CRC handbook of lipid bilayers: CRC Press; 1990.
27. Kohlmann M. Absorption - in vitro Tests - Non-Cell Based. Dans: Vogel HG, rédacteur. Drug discovery and evaluation : safety and pharmacokinetic assays. Berlin, New York: Springer; 2006.
28. Kohlmann M. Absorption: In vitro tests - Non Cell Based. Dans: Vogel HG, Maas J, Hock FJ, Mayer D, rédacteurs. Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013.
29. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem.* 1998;41(7):1007-10. Epub 1998/04/17.
30. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;175(3):880-5. Epub 1991/03/29.
31. Brouwers J, Deferme S, Annaert P, Augustijns P. Permeability measurements. Dans: Dressman JB, Reppas C, rédacteurs. Oral drug absorption : prediction and assessment. 2nd ed. éd. New York: Informa Healthcare; 2010.
32. Wohnsland F, Faller B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J Med Chem.* 2001;44(6):923-30.
33. Sugano K, Hamada H, Machida M, Ushio H. High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. *J Biomol Screen.* 2001;6(3):189-96.
34. Seo PR, Teksin ZS, Kao JPY, Polli JE. Lipid composition effect on permeability across PAMPA. *Eur J Pharm Sci.* 2006;29(3-4):259-68.
35. Avdeef A, Artursson P, Neuhoﬀ S, Lazorova L, Gråsjö J, Tavelin S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA method. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(4):333-49.

36. Zhu C, Jiang L, Chen TM, Hwang KK. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *European journal of medicinal chemistry*. 2002;37(5):399-407. Epub 2002/05/15.
37. Kerns EH, Di L, Petusky S, Farris M, Ley R, Jupp P. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *J Pharm Sci*. 2004;93(6):1440-53. Epub 2004/05/05.
38. Avdeef A. The rise of PAMPA. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005;1(2):325-42.
39. Chen X, Murawski A, Patel K, Crespi CL, Balimane PV. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. *Pharm Res*. 2008;25(7):1511-20. Epub 2008/01/11.
40. Flaten GE, Bunjes H, Luthman K, Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier 2. Characterization of barrier structure, storage stability and stability towards pH changes. *Eur J Pharm Sci*. 2006;28(4):336-43.
41. Flaten GE, Dhanikula AB, Luthman K, Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *Eur J Pharm Sci*. 2006;27(1):80-90. Epub 2005/10/26.
42. Flaten GE, Luthman K, Vasskog T, Brandl M. 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. *Eur J Pharm Sci*. 2008;34(2-3):173-80.
43. Flaten GE, Skar M, Luthman K, Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: 3. Characterization of drug-membrane interactions and the effect of agitation on the barrier integrity and on the permeability. *Eur J Pharm Sci*. 2007;30(3-4):324-32.
44. Fischer SM, Buckley ST, Kirchmeyer W, Fricker G, Brandl M. Application of simulated intestinal fluid on the phospholipid vesicle-based drug permeation assay. *Int J Pharm*. 2012;422(1-2):52-8. Epub 2011/10/27.
45. Fischer SM, Flaten GE, Hagesaether E, Fricker G, Brandl M. In-vitro permeability of poorly water soluble drugs in the phospholipid vesicle-based permeation assay: the influence of nonionic surfactants. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(8):1022-30. Epub 2011/07/02.
46. Naderkhani E, Isaksson J, Ryzhakov A, Flaten GE. Development of a Biomimetic Phospholipid Vesicle-based Permeation Assay for the Estimation of Intestinal Drug Permeability. *J Pharm Sci*. 2014;103(6):1882-90. Epub 2014/03/26.
47. Beig A, Miller JM, Dahan A. Accounting for the solubility-permeability interplay in oral formulation development for poor water solubility drugs: the effect of PEG-400 on carbamazepine absorption. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;81(2):386-91. Epub 2012/03/06.
48. Vizseralek G, Balogh T, Takacs-Novak K, Sinko B. PAMPA study of the temperature effect on permeability. *Eur J Pharm Sci*. 2014;53:45-9. Epub 2013/12/24.
49. Fountain ST. A mass spectrometry primer. Dans: Rossi DT, Sinz M, rédacteurs. *Mass Spectrometry in Drug Discovery*: Taylor & Francis; 2001.
50. Doig MV, Highton DM. Fundamental aspects of mass spectrometry. Dans: Venn RF, rédacteur. *Principles and practice of bioanalysis*. 2nd ed.e éd. Boca Raton: CRC Press; 2008.

51. SC. Santé Canada, Validation of analytical procedures: Methodology, Repéré à http://wwwhc-scgccca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodpharma/q2b-engpdf. accessed 23.07.14.
52. FDA. Food and drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, Repéré à <http://wwwfdagov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107pdf> accessed 29.04.14.
53. EMA. European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation, Repéré à http://wwwemaeuropaeu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686pdf. accessed 29.04.14.
54. ICH. International Conference on Harmonization, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), Repéré à http://wwwichorg/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. accessed 23.07.14.
55. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12(3):413-20. Epub 1995/03/01.
56. Sinko B, Garrigues TM, Balogh GT, Nagy ZK, Tsinman O, Avdeef A, et al. Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *Eur J Pharm Sci.* 2012;45(5):698-707. Epub 2012/02/14.
57. Liu H, Sabus C, Carter GT, Du C, Avdeef A, Tischler M. In vitro permeability of poorly aqueous soluble compounds using different solubilizers in the PAMPA assay with liquid chromatography/mass spectrometry detection. *Pharm Res.* 2003;20(11):1820-6. Epub 2003/12/10.
58. Kansy M, Avdeef A, Fischer H. Advances in screening for membrane permeability: high-resolution PAMPA for medicinal chemists. *Drug Discovery Today: Technologies.* 2004;1(4):349-55.
59. Markovic BD, Vladimirov SM, Cudina OA, Odovic JV, Karljickovic-Rajic KD. A PAMPA assay as fast predictive model of passive human skin permeability of new synthesized corticosteroid C-21 esters. *Molecules.* 2012;17(1):480-91. Epub 2012/01/10.
60. Mensch J, Jaroskova L, Sanderson W, Melis A, Mackie C, Verreck G, et al. Application of PAMPA-models to predict BBB permeability including efflux ratio, plasma protein binding and physicochemical parameters. *Int J Pharm.* 2010;395(1-2):182-97. Epub 2010/07/17.
61. Faller B. Artificial membrane assays to assess permeability. *Curr Drug Metab.* 2008;9(9):886-92. Epub 2008/11/11.
62. Avdeef A, Tsinman O. 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. *Eur J Pharm Sci.* 2006;28(1-2):43-50. Epub 2006/02/16.
63. Fujikawa M, Ano R, Nakao K, Shimizu R, Akamatsu M. Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorg Med Chem.* 2005;13(15):4721-32. Epub 2005/06/07.
64. Lennernas H. Human intestinal permeability. *J Pharm Sci.* 1998;87(4):403-10. Epub 1998/04/21.

65. Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem.* 2001;1(4):277-351. Epub 2002/03/20.
66. Balimane PV, Pace E, Chong S, Zhu M, Jemal M, Pelt CK. A novel high-throughput automated chip-based nanoelectrospray tandem mass spectrometric method for PAMPA sample analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;39(1-2):8-16. Epub 2005/06/28.
67. Dobricic V, Markovic B, Nikolic K, Savic V, Vladimirov S, Cudina O. 17beta-carboxamide steroids--in vitro prediction of human skin permeability and retention using PAMPA technique. *Eur J Pharm Sci.* 2014;52:95-108. Epub 2013/11/19.
68. Liu W, Okochi H, Benet LZ, Zhai SD. Sotalol permeability in cultured-cell, rat intestine, and PAMPA system. *Pharm Res.* 2012;29(7):1768-74. Epub 2012/02/22.
69. USP. United State Pharmacopeial Convention, USP 37-NF 32 Reagents: Buffer solutions, Repéré à <http://www.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=37&nf=32&s=0&officialOn=May1,2014>. accessed 29.04.14.
70. Yáñez KP, Bernal JL, Nozal MJ, Martín MT, Bernal J. Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column. *J Chromatogr A.* 2013;1285(0):110-7.
71. Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(2):265-78. Epub 2004/08/07.
72. Buckley ST, Frank KJ, Fricker G, Brandl M. Biopharmaceutical classification of poorly soluble drugs with respect to "enabling formulations". *Eur J Pharm Sci.* 2013;50(1):8-16. Epub 2013/04/16.
73. Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res.* 2005;22(1):11-23. Epub 2005/03/18.
74. FDA. Food and drug administration, Guidance for Industry: Biowaiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate - Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, Repéré à <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070246pdf>. accessed 29.04.14.
75. Cai MQ, Feng L, Jiang J, Qi F, Zhang LQ. Reaction kinetics and transformation of antipyrine chlorination with free chlorine. *Water Res.* 2013;47(8):2830-42. Epub 2013/03/26.
76. Gajula R, Pilli NR, Ravi VB, Maddela R, Inamadugu JK, Polagani SR, et al. Simultaneous Determination of Atorvastatin and Aspirin in Human Plasma by LC-MS/MS: Its Pharmacokinetic Application. *Scientia pharmaceutica.* 2012;80(4):923-40. Epub 2012/12/25.
77. Gonzalez O, Iriarte G, Rico E, Ferreiros N, Maguregui MI, Alonso RM, et al. LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(28):2685-92. Epub 2010/09/18.
78. Li Y, Shirasaka Y, Langguth P, Tamai I. Quantitation of talinolol in rat plasma by LC-MS-MS. *J Chromatogr Sci.* 2010;48(5):367-70. Epub 2010/06/03.

79. Sajewicz M, Gontarska M, Kronenbach D, Berry E, Kowalska T. An HPLC-DAD and LC-MS study of condensation oscillations with S(+)-ketoprofen dissolved in acetonitrile. *J Chromatogr Sci*. 2012;50(3):237-44. Epub 2012/02/18.
80. Tanaka Y, Ohkawa T, Yasui H. Development of a novel high-throughput analytical methodology, multiple injection method, for quantitative analysis in drug metabolism and pharmacokinetic studies using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(8):1187-93. Epub 2011/08/02.
81. Zhang Y, Zhou L, Zeng C, Wang Q, Wang Z, Gao S, et al. Photoreactivity of hydroxylated multi-walled carbon nanotubes and its effects on the photodegradation of atenolol in water. *Chemosphere*. 2013;93(9):1747-54. Epub 2013/07/03.
82. Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcao AC. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;774(2):215-22.
83. Avdeef A, Bendels S, Di L, Faller B, Kansy M, Sugano K, et al. PAMPA--critical factors for better predictions of absorption. *J Pharm Sci*. 2007;96(11):2893-909. Epub 2007/09/07.
84. Velicky M, Bradley DF, Tam KY, Dryfe RA. In situ artificial membrane permeation assay under hydrodynamic control: permeability-pH profiles of warfarin and verapamil. *Pharm Res*. 2010;27(8):1644-58. Epub 2010/05/08.
85. Anderson TH, Min Y, Weirich KL, Zeng H, Fygenon D, Israelachvili JN. Formation of supported bilayers on silica substrates. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2009;25(12):6997-7005.
86. Attwood SJ, Choi Y, Leonenko Z. Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. *Int J Mol Sci*. 2013;14(2):3514-39.
87. Benes M, Billy D, Benda A, Speijer H, Hof M, Hermens WT. Surface-dependent transitions during self-assembly of phospholipid membranes on mica, silica, and glass. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2004;20(23):10129-37.
88. Bernsmann F, Ball V, Addiego F, Ponche A, Michel M, Gracio JJ, et al. Dopamine-melanin film deposition depends on the used oxidant and buffer solution. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2011;27(6):2819-25.
89. Jiang J, Zhu L, Zhu L, Zhu B, Xu Y. Surface characteristics of a self-polymerized dopamine coating deposited on hydrophobic polymer films. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2011;27(23):14180-7.
90. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*. 2007;318(5849):426-30.
91. ParticleScience. Franz diffusion cell. Repéré à <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/in-vitro-release-testing-methods.html>. 2009.
92. ScientificDail. Side by side diffusion cell. Repéré à <http://cfile221.uf.daum.net/image/1541A0174BF104EF048D1E>.
93. BioTek. Cross-section of PAMPA Explorer™ sandwich plate. Repéré à http://www.biotek.com/resources/articles/pampa_assays_epoch.html. 2011.
94. LifeScience. BRAND Plates Insert system. Repéré à <http://www.brand.de/fr/produits/produits-life-science/brandplatesr-insert-system/>. 2014.

95. Li YL, Liu ML, Xiang CH, Xie QJ, Yao SZ. Electrochemical quartz crystal microbalance study on growth and property of the polymer deposit at gold electrodes during oxidation of dopamine in aqueous solutions. *Thin Solid Films*. 2006;497(1-2):270-8.
96. Ho CC, Ding SJ. The pH-controlled nanoparticles size of polydopamine for anti-cancer drug delivery. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(10):2381-90.
97. Zhang Y, Li HM, Sun J, Gao J, Liu W, Li BH, et al. DC-Chol/DOPE cationic liposomes: A comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and siRNA gene delivery. *Int J Pharm*. 2010;390(2):198-207.
98. Alwarawrah M, Dai J, Huang J. A molecular view of the cholesterol condensing effect in DOPC lipid bilayers. *J Phys Chem B*. 2010;114(22):7516-23.
99. Zhang L, Spurlin TA, Gewirth AA, Granick S. Electrostatic stitching in gel-phase supported phospholipid bilayers. *J Phys Chem B*. 2006;110(1):33-5.
100. Cremer PS, Boxer SG. Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *Journal of Physical Chemistry B*. 1999;103(13):2554-9.
101. Moura SP, Carmona-Ribeiro AM. Biomimetic particles: optimization of phospholipid bilayer coverage on silica and colloid stabilization. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2005;21(22):10160-4.
102. Cho NJ, Frank CW. Fabrication of a planar zwitterionic lipid bilayer on titanium oxide. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2010;26(20):15706-10.
103. Harvey RD, Barlow DJ, Brain AP, Heenan RK, Zuberi S, Zuberi T, et al. Structure of vesicles formed from non-ionic dialkylglycerol poly(oxyethylene) ether surfactants: effect of electrolyte and cholesterol. *Chem Phys Lipids*. 2011;164(5):341-50. Epub 2011/04/12.
104. Lodish H, Darnell JE, François C. *Biologie moléculaire de la cellule: De Boeck Université*; 1997.
105. Bucak S, Wang C, Laibinis PE, Hatton TA. Dynamics of supported lipid bilayer deposition from vesicle suspensions. *J Colloid Interface Sci*. 2010;348(2):608-14.
106. Argemi A, Domingo C, de Sousa AR, Duarte CM, Garcia-Gonzalez CA, Saurina J. Characterization of new topical ketoprofen formulations prepared by drug entrapment in solid lipid matrices. *J Pharm Sci*. 2011;100(11):4783-9. Epub 2011/06/29.
107. Mendes C, Costa AP, Oliveira PR, Tagliari MP, Silva MA. Physicochemical and microbiological stability studies of extemporaneous antihypertensive pediatric suspensions for hospital use. *Pharm Dev Technol*. 2013;18(4):813-20. Epub 2012/06/08.
108. Barthe L, Woodley JF, Kenworthy S, Houin G. An improved everted gut sac as a simple and accurate technique to measure paracellular transport across the small intestine. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1998;23(2):313-23.
109. Adson A, Burton PS, Raub TJ, Barsuhn CL, Audus KL, Ho NF. Passive diffusion of weak organic electrolytes across Caco-2 cell monolayers: uncoupling the contributions of hydrodynamic, transcellular, and paracellular barriers. *J Pharm Sci*. 1995;84(10):1197-204.
110. Pade V, Stavchansky S. Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture model. *Pharm Res*. 1997;14(9):1210-5.

111. Nagahara N, Tavelin S, Artursson P. Contribution of the paracellular route to the pH-dependent epithelial permeability to cationic drugs. *J Pharm Sci.* 2004;93(12):2972-84.

