



Université de Montréal

# **Augmentation de l'absorption intestinale à l'aide de promédicaments se liant aux gangliosides GM1**

par

Isabelle St-Jean

Axe formulation et analyse du médicament

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté de Pharmacie

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en sciences pharmaceutiques

option formulation et analyse du médicament

Août, 2015

© Isabelle St-Jean, 2015



## Résumé

Le but de ce projet est de développer une approche biomimétique pour augmenter l'absorption de molécules actives peu perméables. Cette approche réplique le mécanisme d'internalisation de la toxine du choléra par sa liaison au récepteur GM1 à la surface des cellules intestinales. La technologie proposée est de synthétiser des promédicaments composés d'une molécule active, d'un espaceur et d'un peptide ayant de l'affinité pour le GM1. Les hypothèses de ce projet sont que le peptide faisant partie du promédicament augmentera l'absorption intestinale de médicaments peu perméables et que le complexe sera métabolisé rapidement après son absorption. Des prototypes de promédicaments ont été synthétisés et des essais de stabilité, d'affinité et de perméabilité sur les peptides et les promédicaments ont été développés et réalisés.

Les résultats de cette étude ont démontré la possibilité de synthétiser des promédicaments à partir d'un peptide liant le GM1 et d'une molécule thérapeutique ayant une faible biodisponibilité. Les essais de stabilité, d'affinité et de perméabilité ont été optimisés et implémentés avec succès. Les études *in vitro* initiales ont rapporté des résultats prometteurs concernant les propriétés de liaison du peptide utilisé et d'un des promédicaments préparés. Par contre, les résultats des essais de stabilité ont montré un métabolisme partiel des promédicament dans le plasma ainsi qu'une instabilité des solutions mères. De plus, les essais de perméabilité se sont avérés non concluants. Les prochaines études porteront sur la préparation de nouveaux promédicaments par une approche similaire ainsi que sur l'investigation du mécanisme d'internalisation du peptide.

**Mots-clés :** Promédicament, toxine du choléra, ganglioside GM1, affinité, stabilité, perméabilité intestinale, biodisponibilité, absorption, endocytose

## **Abstract**

In order to increase the bioavailability of poorly permeable drugs, a biomimetic approach was investigated. This approach replicated the internalisation of the cholera toxin using GM1 ganglioside receptor on the intestinal cells. The proposed technology was to synthesize a prodrug consisting of a low permeability therapeutic molecule and a GM1-binding peptide. The hypothesis of this work was that the peptide part of the prodrug will enhance the intestinal absorption of the therapeutic molecule and that the complex will be metabolised rapidly after absorption. Prodrugs were synthesized and stability, affinity and permeability tests were developed and performed.

The results of this study demonstrated the possibility of synthesizing prodrugs from a GM1-binding peptide and a drug demonstrating poor bioavailability. Stability, affinity and permeability tests were successfully optimized and implemented. The initial *in vitro* study highlighted promising binding properties of the peptide and one of the prodrugs. However, stability tests showed partial metabolism of the prodrugs in plasma and instability of the stock solutions. Moreover, results of permeability tests were inconclusive. Future studies will involve the preparation of other prodrugs using the same approach and the investigation of the peptide's internalisation mechanism.

**Keywords** : Prodrug, Cholera toxin, GM1 ganglioside, affinity, stability, intestinal permeability, bioavailability, absorption, endocytosis

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii
Chapitre 1. Introduction.....	13
1.1 Biodisponibilité orale.....	13
1.1.1 Définition.....	13
1.1.2 Absorption intestinale.....	14
1.1.3 Métabolisme.....	21
1.1.4 Système de classification biopharmaceutique (BCS).....	22
1.1.5 Comment augmenter la biodisponibilité.....	23
1.2 Toxine du choléra.....	24
1.2.1 Synthèse et sécrétion par la bactérie Vibrio Cholerae.....	25
1.2.2 Internalisation dans les entérocytes.....	26
1.2.3 Mécanisme d'action.....	27
1.3 Les gangliosides.....	28
1.3.1 Famille de gangliosides.....	29
1.3.2 Synthèse et localisation des gangliosides.....	31
1.3.3 Le ganglioside GM1.....	31
1.4 Hypothèses.....	32
1.5 Objectifs.....	33
Chapitre 2. Résumé de la synthèse des promédicaments.....	35
2.1 Choix des molécules modèles.....	35
2.2 Choix des peptides.....	36
2.3 Survol de la synthèse des promédicaments.....	37

Chapitre 3. Évaluation de la stabilité des promédicaments .....	39
3.1 Introduction.....	39
3.2 Matériel et méthodes.....	42
3.2.1 Développement des méthodes de quantification.....	42
3.2.2 Validation des méthodes de quantification .....	44
3.2.3 Développement de l'essai de stabilité .....	44
3.2.4 Réalisation des essais de stabilité .....	46
3.3 Résultats.....	47
3.3.1 Développement des méthodes de quantification.....	47
3.3.2 Validation des méthodes de quantification .....	53
3.3.3 Essais de stabilité .....	54
3.4 Discussion.....	59
Chapitre 4. Évaluation de l'affinité des promédicaments .....	61
4.1 Introduction.....	61
4.1.1 Microcalorimétrie (ITC) .....	61
4.1.2 Méthode immuno-enzymatique ÉLISA.....	65
4.1.3 Résonance plasmonique de surface (SPR).....	66
4.2 Matériel et méthodes.....	68
4.2.1 Essais microcalorimétriques (ITC) .....	68
4.2.2 Essais immuno-enzymatique ÉLISA .....	70
4.2.3 Essais de résonance plasmonique de surface (SPR) .....	73
4.3 Résultats.....	76
4.3.1 Essais microcalorimétriques (ITC) .....	76
4.3.2 Essais immuno-enzymatique ÉLISA .....	82
4.3.3 Essais de résonance plasmonique de surface (SPR) .....	83
4.4 Discussion.....	86
Chapitre 5. Évaluation de la perméabilité des promédicaments .....	88
5.1 Introduction.....	88
5.2 Matériel et méthodes.....	89
5.2.1 Développement des lignées cellulaires et du test de perméabilité.....	89
5.2.2 Réalisation d'essais de perméabilité.....	90

5.3 Résultats.....	91
5.4 Discussion.....	92
Conclusion et perspectives.....	93
Bibliographie.....	96



## Liste des tableaux

Tableau I. Méthode HPLC-UV pour la quantification du méropénem. ....	47
Tableau II. Paramètres MS/MS pour la quantification du méropénem. ....	48
Tableau III. Méthode chromatographique par HPLC-MS/MS pour la quantification du méropénem. ....	48
Tableau IV. Paramètres MS/MS pour la quantification du méropénem - espaceur #1. ....	49
Tableau V. Méthode chromatographique par HPLC-MS/MS pour la quantification du méropénem - espaceur #1. ....	49
Tableau VI. Paramètres MS/MS pour la quantification de la vancomycine et de la vancomycine - espaceur #1. ....	50
Tableau VII. Méthode chromatographique par HPLC-MS/MS pour la quantification de la vancomycine et de la vancomycine - espaceur #1. ....	50
Tableau IIX. Paramètres MS/MS pour la quantification de la pipéracilline et de la pipéracilline - espaceur #1. ....	51
Tableau IX. Méthode chromatographique par HPLC-MS/MS pour la quantification de la pipéracilline et de la pipéracilline - espaceur #1. ....	51
Tableau X. Paramètres MS/MS finaux pour la quantification de la pipéracilline et de ses dérivés. ....	52
Tableau XI. Méthode chromatographique finale par HPLC-MS/MS pour la quantification de la pipéracilline et de ses dérivés. ....	52
Tableau XII. Validation des méthodes de quantification par HPLC-MS/MS. ....	53
Tableau XIIV. Paramètres optimisés de la méthode microcalorimétrique. ....	70
Tableau XIV. Constante d'affinité et de dissociation moyenne entre le peptide G23 et le GM1. ....	77
Tableau XV. Résumé des essais microcalorimétriques. ....	81

## Liste des figures

Figure 1.1 Les composantes de la paroi intestinale. Tiré de Chevrier G. (3) avec permissions. .....	15
Figure 1.2 Schématisation du processus de dissolution.....	16
Figure 1.3 Mécanismes d'absorption intestinale.....	18
Figure 1.4 Système de classification biopharmaceutique.....	22
Figure 1.5 (a) Représentation cristallographique de la toxine du choléra tirée de Sanchez et al. (12) (b) Représentation simplifiée de la toxine du choléra utilisée tout au long de ce manuscrit. .....	25
Figure 1.6 Représentation du transport et du mécanisme d'action de la toxine du choléra. ....	28
Figure 1.7 Structure générale des gangliosides.....	29
Figure 1.8 Arbre représentant la nomenclature des gangliosides. Tiré de Christie W. (26) avec permission.....	30
Figure 1.9 (a) Structure chimique du ganglioside GM1. (b) Représentation simplifiée utilisée dans ce mémoire. ....	32
Figure 1.10 Hypothèses du projet de recherche.....	33
Figure 2.1 Structure chimique des antibiotiques sélectionnés.....	36
Figure 2.2 Synthèse des intermédiaires de pipéracilline - espaceur #1 (court) et #2 (long).....	38
Figure 2.3 Synthèse des promédicaments de pipéracilline - espaceur #1 et #2 - G23.....	38
Figure 3.1 Principe général de la chromatographie liquide.....	40
Figure 3.2 Principe général du HPLC-MS/MS.....	41
Figure 3.3 Stabilité pipéracilline - espaceur #1.....	55
Figure 3.4 Stabilité pipéracilline - espaceur #1 - G23 lors du premier essai.....	56
Figure 3.5 Stabilité pipéracilline - espaceur #1 - G23 lors du deuxième essai.....	57
Figure 3.6 Stabilité pipéracilline - espaceur #2 - G23.....	58
Figure 3.7 Stabilité du peptide G23.....	59
Figure 4.1 Représentation de l'appareil de microcalorimétrie adaptée de Milev S. (36).....	63
Figure 4.2 Exemple de titrage microcalorimétrique.....	64
Figure 4.3 Exemple d'analyse des résultats de titrage microcalorimétrique.....	64

Figure 4.4 Les principaux types d'essais ÉLISA. ....	65
Figure 4.5 Représentation d'un appareil SPR. Image traduite de Cooper MA. (44) avec permissions. ....	68
Figure 4.6 ÉLISA compétitif entre la CTB-HRP et le peptide pour le GM1. ....	71
Figure 4.7 Représentation de la surface développée pour les essais SPR. ....	74
Figure 4.8 Résultats ITC du peptide G23 (100 $\mu$ M) titré dans le GM1 (25 $\mu$ M), soustrait par la dilution du G23 dans le tampon HBSS pH 6,5. ....	77
Figure 4.9 Résultats ITC de la pipéracilline - espaceur #2 - G23 (100 $\mu$ M) titré dans le GM1 (25 $\mu$ M). ....	78
Figure 4.10 Résultats ITC de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 (100 $\mu$ M) titré dans le GM1 (25 $\mu$ M). ....	79
Figure 4.11 ÉLISA compétitif entre les peptides ou la CTB et la CTB-HRP. ....	82
Figure 4.12 ÉLISA compétitif entre les peptides ou la CTB et la CTB-HRP. ....	83
Figure 4.13 ÉLISA compétitif entre les peptides ou la CTB et la CTB-HRP. ....	83
Figure 4.14 Signaux SPR obtenus avec le peptide G23. ....	84
Figure 4.15 Shift SPR obtenus avec le peptide G23. ....	84
Figure 4.16 Signaux SPR obtenus avec la CTB. ....	85
Figure 4.17 Shift SPR obtenus avec la CTB. ....	85
Figure 5.1 Perméabilité de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 dans les cellules Caco-2. ....	91
Figure 5.2 Apparition de pipéracilline dans l'essai de perméabilité de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 dans les cellules Caco-2. ....	91

## Liste des abréviations

<b>ACN</b>	: Acétonitrile
<b>ADP</b>	: Adénosine diphosphate
<b>AMPc</b>	: Adénosine monophosphate cyclique
<b>ATP</b>	: Adénosine triphosphate
<b>AUC</b>	: Aire sous la courbe
<b>BCS</b>	: Système de classification biopharmaceutique
<b>BSA</b>	: Albumine de sérum bovin
<b>Cer</b>	: Céramide
<b>CT</b>	: Toxine du choléra
<b>CTA</b>	: Sous-unité A de la toxine du choléra
<b>CTA1</b>	: Sous-unité 1 de la CTA
<b>CTA2</b>	: Sous-unité 2 de la CTA
<b>CTB</b>	: Sous-unité B de la toxine du choléra
<b>CTB-HRP</b>	: Sous-unité B de la toxine du choléra liée à l'enzyme peroxydase de raifort
<b>CV%</b>	: Coefficient de variation
<b>DLS</b>	: Diffusion dynamique de la lumière
<b>DMEM</b>	: Milieu Eagle modifié de Dulbecco
<b>DMF</b>	: Diméthylformamide
<b>DMSO</b>	: Diméthylsulfoxyde
<b>ÉLISA</b>	: Essai immuno-enzymatique
<b>ESI</b>	: Ionisation par électronébuliseur
<b>F</b>	: Biodisponibilité
<b>FACS</b>	: Cytométrie en flux (Fluorescence-activated cell sorting)
<b>FBS</b>	: Sérum de fœtus bovin
<b>Gal</b>	: Galactose
<b>GalNAc</b>	: N-acétylgalactosamine
<b>Glc</b>	: Glucose
<b>GlcNAc</b>	: N-acétylglucosamine

**GM1** : Monosialotetrahexosylganglioside  
**HBSS** : Solution saline équilibrée de Hank  
**HPLC-MS QTOF** : Appareil de chromatographie liquide haute performance à détection par spectrométrie de masse à temps de vol  
**HPLC-MS/MS** : Appareil de chromatographie liquide haute performance à détection par spectrométrie de masse en tandem  
**HPLC-UV** : Appareil de chromatographie liquide haute performance à détection en ultraviolet  
**IC50** : Concentration inhibitrice à 50 %  
**ITC** : Titration calorimétrique isotherme  
**iv** : Intreveineux  
**Ka** : Constante d'affinité  
**Kd** : Constante de dissociation  
**LDé** : Limite de détection  
**LDo** : Limite de dosage  
**m/z** : Rapport de masse sur charge  
**N** : Stoechiométrie  
**NANA** : Acide N-acétylneuraminique  
**NGNA** : Acide N-glycolyl-neuraminique  
**ODM** : Octadécyl mercaptan  
**PAMPA** : Essai de perméabilité sur membranes artificielles parallèles  
**PBS** : Tampon phosphate salin  
**P-GP** : Glycoprotéine P  
**po** : Oral (per os)  
**POPC** : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine  
**SA** : Acide sialique  
**SGF** : Milieu gastrique simulé  
**SPR** : Résonance des plasmons de surface  
**TIR** : Réflexion interne totale  
**TMB** : 3,3',5,5' tetramethylbenzidine  
 **$\Delta H$**  : Variation d'enthalpie  
 **$\Delta S$**  : Variation d'entropie

*À mes parents, Jeanne et Richard, qui m'ont énormément  
soutenue, encouragée et démontré leur fierté et à ma sista  
Caro qui lit dans ma tête comme dans un livre de Patrick  
Sénécal (Mind Five) et qui est toujours là pour sa petite sœur.  
Nous formons un magnifique «Faminal 4»!*

## Remerciements

Mon premier remerciement va à un excellent directeur de recherche, Pr Grégoire Leclair. Merci de m'avoir offert plusieurs opportunités académiques et professionnelles qui m'ont permis entre autres de développer ma confiance en moi. Merci pour ta proximité, ce n'est pas tous les étudiants qui peuvent dîner avec leur professeur et parler de tout plein de choses autres que la science. Enfin, merci d'avoir à cœur la réussite de tes étudiants!

**Merci** à Alex d'avoir suivi de près mes manip en me demandant «Pis, ça marche tu?».

**Merci** à Kevin, collègue et ami depuis le cégep, pour avoir partagé une dangereuse folie avec moi, je suis très heureuse que nos parcours se soient suivis jusqu'ici et même après,  
«To infinity... and beyond!».

**Merci** à Marie-Ève de m'avoir montré tout ce qu'il y avait à savoir sur le 4e étage et sur les rouages de la Fac.

**Merci** à l'équipe de la Plateforme de biopharmacie de m'avoir accueillie pendant plus de 2 ans.

**Merci** au 4e étage et aux amis du 4e étage pour toutes ces activités sociales, sportives et gourmandes... Surtout sociales et gourmandes!

**Merci** à mon coco pour son amour et sa complicité.

**Merci** à mes amis et ma famille qui m'ont tous demandé: «Mais là... Vas-tu être Pharmacienne?».

Sans oublier un merci spécial à Trivium, FFDP, Avenged Sevenfold, BFMV, Metallica, Slipknot, Veil of Maya, All that remains, Godsmack, In this moment, KSE, Rise against, SOAD et à la musique métal/rock/punk en général qui m'a permis de me concentrer, me détendre ou me défouler (selon mes humeurs) tout au long de mon parcours académique!

# Chapitre 1. Introduction

L'objectif de ce projet est de développer une approche pour augmenter la biodisponibilité orale de molécules actives peu perméables. Cette approche est basée sur le mécanisme d'internalisation de la toxine du choléra par sa liaison au récepteur GM1 à la surface des cellules intestinales. La technologie proposée est de synthétiser des promédicaments composés d'une molécule active, d'un espaceur et d'un peptide ayant de l'affinité pour le GM1.

## 1.1 Biodisponibilité orale

### 1.1.1 Définition

La biodisponibilité orale (F) représente la fraction de la dose totale d'un médicament donné par voie orale atteignant la circulation sanguine. Elle varie selon l'absorption intestinale, l'effet du premier passage hépatique et du métabolisme présystémique. Elle est souvent déterminée par un dosage oral (po) et un dosage intraveineux (iv) tous deux suivis de prélèvements sanguins dans le temps. Les deux dosages sont réalisés à un intervalle assez grand pour éliminer le médicament du corps. Un ratio des aires sous la courbe (AUC) est effectué en fonction des doses administrées (1).

Équation du calcul de la biodisponibilité orale:

$$F = \left( \frac{AUC_{po}}{AUC_{iv}} \right) \times \left( \frac{Dose_{iv}}{Dose_{po}} \right) \times 100 \% \quad (1.1)$$

Une biodisponibilité élevée (près de 100 %) indique que le médicament a été fortement absorbé et peu affecté par le métabolisme présystémique. À l'inverse, une faible biodisponibilité peut révéler que le médicament a été faiblement absorbé ou fortement métabolisé de façon présystémique. Dans tous les cas, lorsqu'un médicament à administration orale visant une action systémique est développé, une grande biodisponibilité est optimale pour être en mesure de réduire les doses à administrer et les coûts par le fait même.



Finalement, pour bien comprendre la biodisponibilité d'un médicament, il faut analyser les facteurs qui peuvent l'influencer.

### **1.1.2 Absorption intestinale**

L'absorption intestinale est définie comme l'ensemble des mécanismes par lesquels une substance pénètre naturellement dans l'organisme à travers la paroi de l'intestin (2). Physiologiquement, le tractus gastro-intestinal débute à la bouche et se termine à l'anus. Il est la voie d'entrée de tous les nutriments présents dans l'alimentation et aussi des médicaments administrés par la voie orale. Il est divisé en plusieurs segments soit l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (petit intestin), et le côlon (gros intestin). Tous ces segments sont physiologiquement différents et c'est au niveau de l'intestin grêle que se produit la majorité de l'absorption.

La paroi intestinale est formée de plusieurs couches soit la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse. Cette dernière est directement en contact avec la lumière intestinale. La muqueuse est constituée de villosités, soit des replis du tissu conjonctif sous-jacent d'environ 1 mm, augmentant considérablement la surface de contact entre la lumière intestinale et les cellules. À l'intérieur des villosités se trouvent les réseaux de capillaires sanguin et chylifère. Le réseau sanguin sert d'une part à apporter l'oxygène et les nutriments aux cellules et d'une autre part à transporter les molécules absorbées jusque dans la veine porte menant au foie.

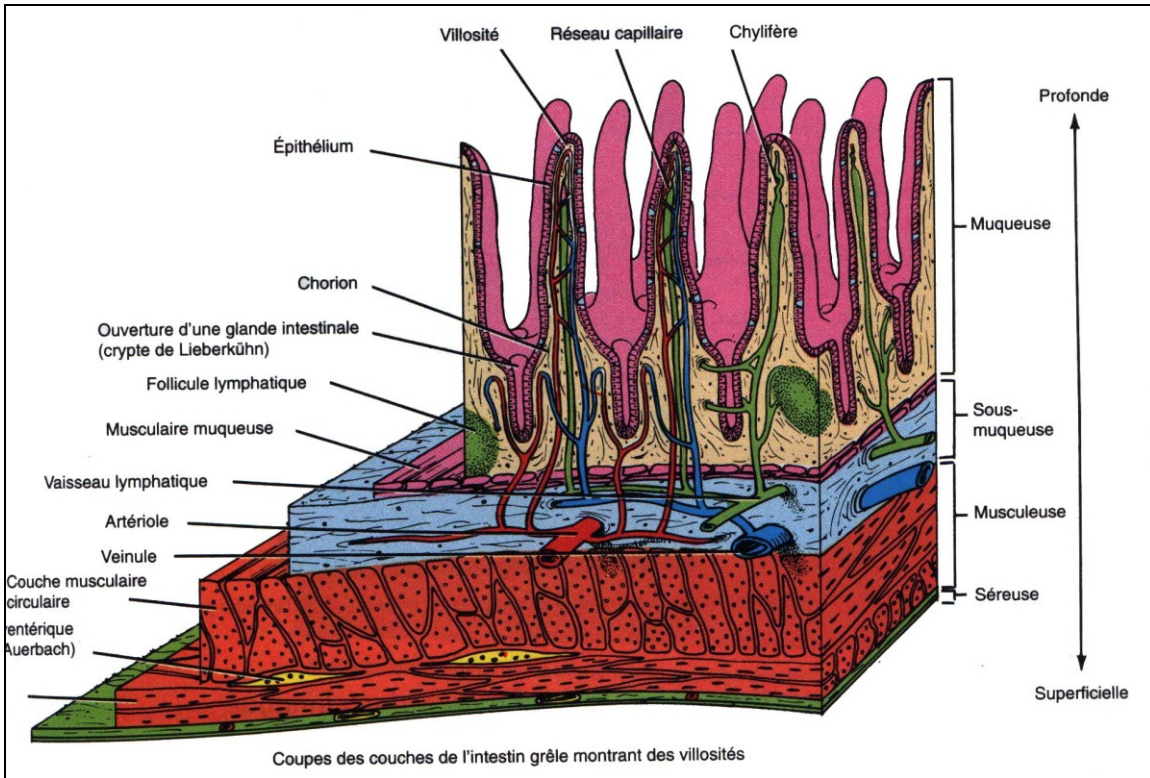


Figure 1.1 Les composantes de la paroi intestinale. Tiré de Chevrier G. (3) avec permissions.

Les cellules recouvrant les villosités sont principalement des cellules épithéliales possédant elles-mêmes des microvillosités d'environ  $1 \mu\text{m}$  à leur surface apicale, augmentant davantage la surface de contact. En effet, grâce à ces villosités et microvillosités, la surface intestinale est estimée à plus de  $250 \text{ m}^2$  (4). Malgré la grande surface de contact qui favorise l'absorption, un autre facteur existe plutôt pour la freiner. En effet, les cellules sont étroitement rapprochées grâce aux jonctions serrées qu'elles développent entre elles, formant ainsi une barrière étanche et continue à l'absorption. Les molécules possédant de bonnes propriétés physicochimiques comme la solubilité et la perméabilité sont capables de traverser la paroi cellulaire intestinale pour rejoindre la circulation sanguine. En effet, une molécule doit absolument être soluble et perméable pour être absorbée.

### 1.1.2.1 Solubilité

La solubilité représente la concentration maximale dissoute qu'une molécule peut atteindre dans un solvant donné. Elle varie selon la structure du composé, le solvant, le pH et la température (1). Par contre la solubilité ne dépend pas de la vitesse de dissolution. Plus les particules ont une grande surface de contact avec le solvant, plus sa dissolution sera rapide, puisque ce sont les couches en contact direct avec le solvant qui peuvent se solubiliser, mais la concentration dissoute totale ne dépassera pas la solubilité. Donc, un médicament sous forme de comprimé donné oralement peut se solubiliser couche par couche, mais le processus est très long. Il est souvent préférable qu'il se désintègre d'abord sous forme de granules ayant une surface de contact beaucoup plus grande avec les fluides intestinaux. Ces granules peuvent également se désagréger pour former des particules encore plus fines, augmentant davantage la surface de contact et facilitant la dissolution.

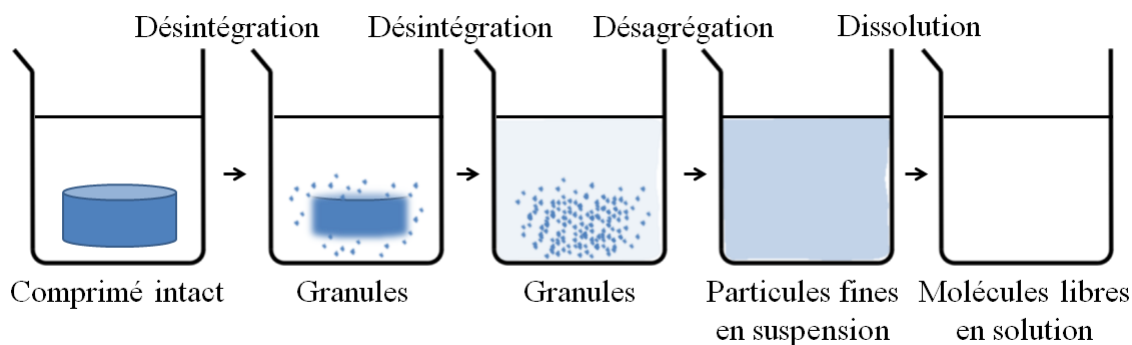


Figure 1.2 Schématisation du processus de dissolution.

Pour se dissoudre, une molécule doit avoir de l'affinité avec le solvant. Donc, dans un solvant polaire, l'eau par exemple, une molécule polaire ou chargée a beaucoup plus de facilité à se dissoudre qu'une molécule non chargée. Pour qu'une particule parvienne à se dissoudre, son réseau cristallin doit se briser pour libérer les molécules et le solvant doit se réarranger pour interagir avec ces molécules. Un composé doit obligatoirement être dissout, donc sous forme de molécule libre dans le solvant, pour être absorbé par les cellules intestinales. La solubilité des médicaments dans le milieu intestinal est donc un facteur très important dans le développement pharmaceutique, puisque les molécules peu solubles risquent d'avoir une

biodisponibilité orale très faible. Il faut donc évaluer la capacité de la molécule en développement à former des liens hydrogènes et déterminer si elle possède des groupements ionisables et des groupements polaires.

L'évaluation de la solubilité doit être réalisée en perspectives du milieu physiologique de l'humain. Une personne adulte possède environ 250 mL de fluide dans les intestins (1). De plus, le pH du fluide varie selon les parties du tractus gastro-intestinal ce qui peut affecter l'état de charge des composés possédant des groupements ionisables. Au niveau de l'estomac, le pH est très acide, autour de 1,4 à 2,1, augmentant la solubilité des bases faibles. Au niveau de l'intestin grêle, où se produit la majorité de l'absorption, le pH est environ 4,4 à 6,8 et au niveau du côlon il est autour de 5,0 à 8,0 augmentant la solubilité des acides faibles (1).

### **1.1.2.2 Perméabilité**

La perméabilité représente la vitesse à laquelle les molécules vont traverser une membrane biologique, qu'elle soit cellulaire ou autre (1). Les composés doivent obligatoirement être perméables pour être absorbés par les cellules intestinales et les capillaires pour ainsi rejoindre la circulation sanguine, mais aussi pour entrer dans les cellules lorsque la cible est intracellulaire. Les molécules les plus perméables sont des molécules lipophiles, avec un Log P (coefficient de partage entre l'octanol et l'eau) élevé, une faible polarité et une petite taille (faible poids moléculaire). En effet, ces caractéristiques facilitent leur pénétration dans la bicouche de phospholipides composant la membrane cellulaire des entérocytes de la barrière intestinale.

Une règle a été établie en 1997 par Christopher A. Lipinski (5), nommée règle de 5 de Lipinski, pour aider à déceler les molécules faiblement perméables. Si un point de cette règle est respecté, la molécule a moins de chance d'être biodisponible. Par contre, si deux des points suivants sont respectés, la molécule est presque certainement non-biodisponible.

- > 5 groupements donneur d'hydrogène (somme de tous les OH et NH)
- Poids moléculaire > 500
- Log P > 5
- > 10 groupements accepteur d'hydrogène (somme de tous les O et N)

- Les substrats de transporteurs sont exclus de cette règle.

Il existe également d'autres outils et règles pour prédire la perméabilité et la biodisponibilité des molécules pharmaceutiques, comme la règle de Veber et la règle de 3 d'Oprea (1).

### 1.1.2.3 Mécanismes d'absorption

L'absorption des médicaments par les cellules épithéliales intestinales peut être réalisée par différents mécanismes passifs ou actifs selon la structure des composés.

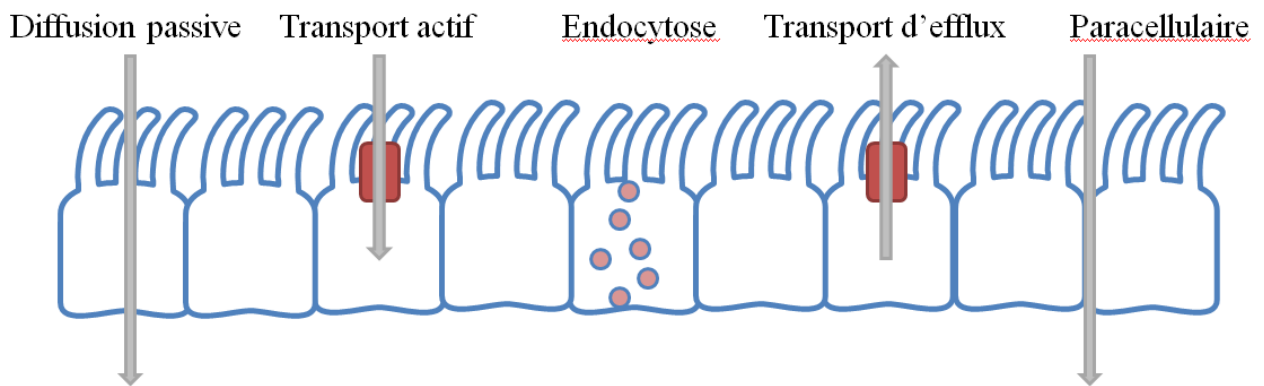


Figure 1.3 Mécanismes d'absorption intestinale.

#### 1.1.2.3.1 Diffusion passive

La diffusion passive est le mécanisme d'absorption prédominant pour les médicaments oraux. La molécule passe directement à travers la bicouche lipidique de la membrane cellulaire pour entrer dans la cellule du côté apical et peut ressortir du côté basolatéral de la même façon. Ce mécanisme n'entraîne aucune demande en énergie de la cellule, par contre c'est le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane qui régit la diffusion. Les composés se déplaceront donc de l'endroit le plus concentré, au moins concentré, soit de la lumière intestinale à la circulation sanguine. En effet, la circulation sanguine effectue une sorte de drainage des molécules, puisqu'une fois absorbées, elles suivent la circulation et il n'y a pas d'accumulation du côté basolatéral des cellules, ce qui conserve le gradient de concentration.

Les molécules absorbées de cette façon doivent généralement être assez petites pour passer entre les phospholipides de la membrane cellulaire sans déstabiliser celle-ci. De plus, elles doivent être relativement lipophiles et neutres ou peu chargées pour traverser le cœur de la membrane composée de chaînes lipophiles. Puisque la grande majorité des médicaments oraux (95 %) sont absorbés par diffusion passive il est important de considérer un équilibre entre l'hydrophilicité (solubilité) et la lipophilicité (perméabilité) dans le développement de molécules actives (1).

#### *1.1.2.3.2 Transport actif*

Ce type de transport est effectué par des protéines transmembranaires. Une molécule ayant de l'affinité pour une protéine de transport pourra donc s'y lier et être dirigée à l'intérieur de la cellule. Ce transport est dit actif puisqu'il utilise de l'énergie (ATP) de la cellule pour transloquer la protéine de transport et faire passer les molécules de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Contrairement à la diffusion passive, avec le transport actif, il est possible de faire entrer des composés contre le gradient de concentration. Ce transport est beaucoup utilisé dans l'absorption de nutriments, mais rarement pour l'absorption de médicaments puisqu'il est très sélectif (1).

#### *1.1.2.3.3 Endocytose*

L'endocytose est un processus par lequel un composé ou une particule entrant en contact avec une cellule est englouti par celle-ci dans une vésicule. Il en existe trois types, l'endocytose à récepteur, la pinocytose et la phagocytose. L'endocytose à récepteur est spécifique à certains couples molécule-récepteur. C'est donc un transport sélectif. Certaines régions de la membrane cellulaire sont spécifiques pour l'endocytose. Ces régions sont souvent riches en récepteurs et en clathrines, une protéine qui favorise le processus de formation de vésicule. Pour amorcer le processus, la molécule doit se lier avec le récepteur. Cette liaison entraîne une déformation de la membrane cellulaire par le cytosquelette. La membrane entoure la molécule et finit par se détacher du côté cytoplasmique. Les vésicules (endosomes) ainsi formées peuvent circuler dans la cellule pour soit atteindre des sites spécifiques (réticulum endoplasmique ou golgi par exemple) ou alors pour rejeter leur contenu du côté basolatéral cellulaire par la fusion de la membrane de l'endosome et de la membrane cellulaire (6).

Contrairement à l'endocytose à récepteur, la pinocytose est non spécifique. Elle a une façon d'absorber du milieu extracellulaire pour l'assimiler dans les cellules. Enfin, la phagocytose est présente dans les processus d'immunité. Elle est réalisée par les cellules phagocytaires comme les lymphocytes et consiste à l'ingestion et la digestion de larges particules solides notamment des microorganismes. Ces deux derniers types d'endocytose ne sont donc pas envisagés dans le développement du médicament.

#### *Exocytose*

L'exocytose est une variante de l'endocytose. Elle consiste à éjecter une vésicule de la cellule. Ce mécanisme est notamment présent lors de l'absorption des lipides. En effet, les lipides de l'alimentation sont digérés et émulsifiés avec la bile et les fluides pancréatiques pour former des micelles lipidiques. Ces micelles, par un mécanisme méconnu, sont dissociées préalablement à l'absorption des lipides. Les lipides sont alors absorbés par diffusion passive ou transport actif par des protéines spécifiques. Une fois dans la cellule, les lipides possédant des longues chaînes de carbones ( $C > 12$ ) sont dirigés au niveau du réticulum endoplasmique. Dans cette organelle, les chylomicrons sont créés. Ce sont des vésicules contenant des lipides, du cholestérol et des protéines. Les chylomicrons matures sont transférés au Golgi pour ensuite être éjectés de la cellule par exocytose du côté intercellulaire. Un point particulier du transport des lipides est qu'ils rejoignent la circulation chylifère plutôt que la circulation sanguine.

Ce transport a récemment suscité de l'intérêt dans le développement de médicament, puisqu'une molécule pouvant s'associer au chylomicrons est en mesure par son transport dans la lymphe d'éviter le premier passage hépatique et d'ultimement rejoindre la circulation sanguine. Les composés sujets à ce type de transport doivent être relativement lipophiles pour s'associer au chylomicrons.

#### *1.1.2.3.4 Transport d'efflux*

Le transport d'efflux est un transport actif qui par l'action de transporteurs, pompe les molécules hors de la cellule. Il existe différentes familles de transporteurs d'efflux, mais les plus étudiés sont les glycoprotéines-p (P-GP), présents en grande partie dans les cellules intestinales. L'efflux est l'une des causes d'une faible biodisponibilité orale, il est donc important de le prendre en considération lors du développement de médicament (1).

#### *1.1.2.3.5 Transport paracellulaire*

Malgré les jonctions serrées entre les cellules intestinales, certaines molécules sont capables de passer entre les cellules pour traverser la paroi. Les molécules pouvant utiliser ce mécanisme d'absorption doivent être assez polaires, puisqu'elles n'ont pas à traverser les chaînes lipidiques des phospholipides, mais au contraire, elles sont entourées par les têtes polaires de ceux-ci. De plus, elles doivent être très petites, un poids moléculaire maximal de 180 Da, puisque les pores où elles traversent ont un diamètre d'environ 8 Å. Ce mécanisme d'absorption est emprunté par moins de 5 % des composés pharmaceutiques (1).

### **1.1.3 Métabolisme**

Le métabolisme présystémique est l'un des facteurs les plus importants pouvant diminuer la biodisponibilité orale. Il consiste à transformer le composé par une action enzymatique pour en faciliter son excrétion. Une fois transformé, le composé perd son activité et n'est plus disponible pour agir au site d'action.

La majorité de l'activité métabolique du corps se retrouve au niveau du foie. Cet organe est riche en cytochromes P450, une famille d'enzyme de métabolisme de phase I, soit d'oxydation et de réduction, et en d'autres enzymes comme la UDP-glucuronosyl transférase, de phase II ajoutant un groupement polaire sur la molécule. Une fois la barrière intestinale traversée, toutes les molécules ayant rejoint la circulation sanguine sont transportées par la veine porte jusqu'au foie, c'est le premier passage hépatique. Toujours selon la structure des composés, certains y sont fortement métabolisés et d'autres demeurent intacts. Il existe également d'autres sites de métabolisme présystémique notamment les intestins et systémique comme le sang, avec des enzymes hydrolytiques comme les carboxylestérases. Le métabolisme systémique affecte autant les composés administrés par la voie orale que par la voie parentérale, il n'est donc pas pris en considération dans l'évaluation de la biodisponibilité.



### 1.1.4 Système de classification biopharmaceutique (BCS)

Un système a été développé par l'agence américaine du médicament (FDA) pour classer les médicaments selon leurs propriétés biopharmaceutiques, soit leur solubilité et leur perméabilité (7). Quatre classes existent, soit les BCS I, II, III et IV. Les BCS de classe I sont des médicaments très perméables et très solubles. Ce sont les molécules de prédilection dans le développement de formes orales puisqu'elles sont absorbées sans problème et ont généralement une biodisponibilité élevée, si elles ne sont pas substrat d'un transport d'efflux et si elles ne sont pas fortement métabolisées. Les BCS de classe II sont des médicaments de forte perméabilité, mais de faible solubilité. Les BCS classe III sont peu perméables et très solubles et les BCS IV sont peu perméables et peu solubles. Cette dernière classe de médicaments est celle à éviter lors du développement. Elle mène à une mauvaise biodisponibilité orale et souvent, ces molécules ne peuvent pas être alternativement administrées par la voie parentérale puisqu'ils ne sont pas assez solubles.

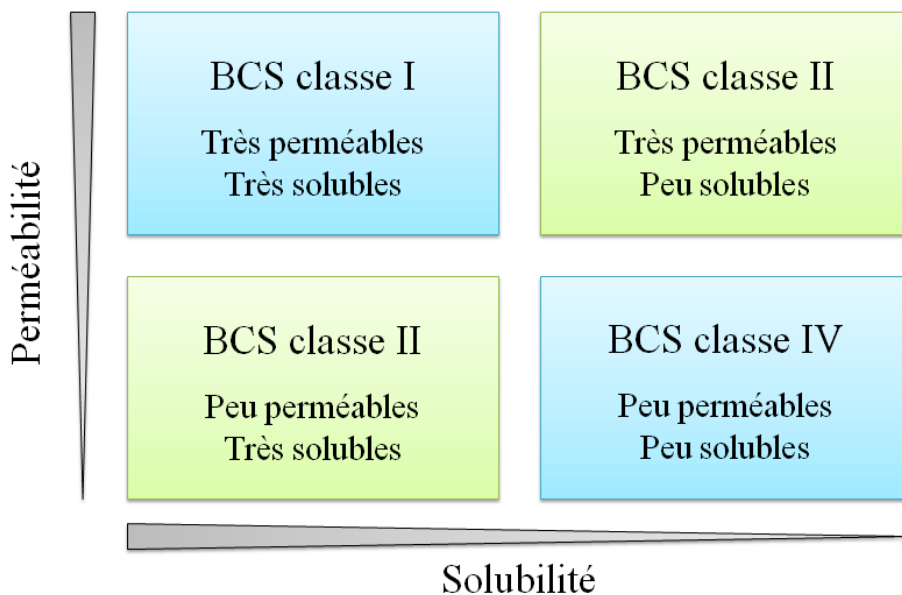


Figure 1.4 Système de classification biopharmaceutique.

Pour être considéré comme très soluble, un médicament doit se dissoudre complètement, à sa plus grande dose sujette à l'administration, dans 250 mL de milieu aqueux sur une gamme de pH de 1 à 6,8. D'un autre côté, la perméabilité doit être déterminée par des mesures de

fractions absorbées chez l'humain par balance de masse, mais des essais *in vitro* de perméabilité à travers des tissus intestinaux ou bien des membranes cellulaires représentatives de la paroi intestinale peuvent aussi être réalisés. Dans tous les cas, 85 % de la dose totale doit être absorbée pour représenter une perméabilité élevée (7).

### **1.1.5 Comment augmenter la biodisponibilité**

Il existe différentes techniques pour modifier la solubilité ainsi que la perméabilité des médicaments et ainsi augmenter la biodisponibilité. Ces techniques comptent entre autres la modification de la formulation, la modification chimique de la molécule active ainsi que le développement de promédicaments.

#### **1.1.5.1 Formulation**

La façon la plus simple d'améliorer la biodisponibilité d'un médicament est d'en modifier la formulation, par la forme, les procédés de fabrication ou les ingrédients du produit final. Ce type de modification peut être appliqué pour régler les problèmes de solubilité des BCS de classe II. Par contre, les modifications de formulation ne sont pas efficaces pour augmenter la perméabilité des composés de classe III. Effectivement, la perméabilité est principalement une propriété de la molécule, mis à part son état de charge dépendant du milieu, tandis que la solubilité est beaucoup plus affectée par le milieu. Au-delà de la solubilité, une dissolution plus rapide aide également à ce qu'un médicament puisse être entièrement absorbé dans le temps de son parcours au niveau du tractus gastro-intestinal (1, 8, 9).

Ainsi, une modification des excipients par l'ajout de surfactant peut augmenter la solubilité et faciliter la dissolution par altération de la composition du milieu. Une étape de nanobroyage du principe actif ou une modification de la forme par l'administration d'une solution au lieu d'un comprimé peuvent faciliter la dissolution de composés peu solubles par l'augmentation de la surface de contact et par la prédissolution dans un milieu plus favorable respectivement.

#### **1.1.5.2 Modifications chimiques**

La solubilité, la perméabilité et la stabilité peuvent être améliorées avec des modifications chimiques sur la molécule active. Par contre, en ayant recours à cette méthode, l'activité du

composé risque d'être affectée. Les modifications doivent alors être réalisées sur des sites non essentiels à l'activité de la molécule (1, 8, 9).

Pour augmenter la solubilité, il est possible d'ajouter des groupements ionisables ou polaires sur la molécule pour faciliter la dissolution, de réduire le poids moléculaire, d'éliminer les cycles de molécules planes ou d'éliminer certaines parties lipophiles de la molécule pour en réduire son LogP. D'un autre côté, pour augmenter la perméabilité, puisqu'il est d'intérêt d'augmenter le LogP, l'inverse des modifications suggérées pour la solubilité est conseillé, mis à part pour la réduction du poids moléculaire, qui fait bénéficier les deux parties. Pour augmenter la stabilité, les groupements labiles peuvent être modifiés, les sites de métabolisme bloqués, la lipophilicité réduite, de l'encombrement stérique ajouté ou la chiralité modifiée.

### **1.1.5.3 Promédicaments**

Un promédicament est une molécule active à laquelle est ajouté un groupement chimique qui est métabolisé dans le corps par la suite. Le métabolisme libère la molécule active la rendant disponible pour effectuer son effet thérapeutique. Le promédicament peut servir à augmenter la biodisponibilité de par la solubilité, la perméabilité et la stabilité ainsi qu'à cibler des cellules ou des tissus spécifiques. Il existe différentes technologies de promédicament, mais la plus exploitée, dans 50 % des cas, est l'utilisation d'un lien ester entre le composé et le groupement ajouté. Les esters sont facilement clivables par hydrolyse au niveau du foie ou du sang, où les carboxylestérases catalysent la réaction (1, 10). De tous les médicaments, seulement 5 % sont des promédicaments (1). L'exemple d'un promédicament disponible sur le marché est le valacyclovir. Il est composé de la molécule active acyclovir et de la L-valine groupés par un lien ester. La biodisponibilité de ce médicament est augmentée d'environ 30 à 45 % grâce à l'administration du promédicament (10).

## **1.2 Toxine du choléra**

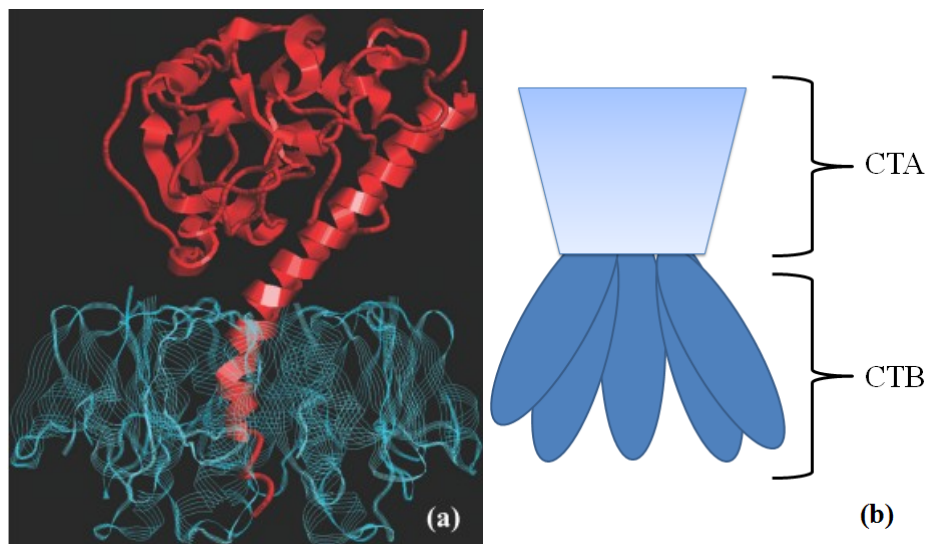
La bactérie *Vibrio Cholerae* est de la famille des *Vibrionaceae*. C'est une bactérie bacille incurvée de type Gram-négative très mobile vivant dans l'eau. Lorsqu'ingérée, elle produit les symptômes associés au Choléra, soit des diarrhées sécrétoires pouvant entraîner une perte de plus de 20 litres d'eau par jour, entraînant une intense déshydratation pouvant mener à la mort (11). En 1959, les symptômes associés à *Vibrio Cholerae* ont été imputés à une toxine

produite par cette bactérie, la toxine du choléra (12). Depuis, plus de 140 souches de *Vibrio Cholerae* ont été découvertes et seulement deux d'entre elles sont capables de produire la toxine du choléra. Il faut également noter que les souches non virulentes sont aptes à le devenir suite à la transmission de gènes par d'un phage nommé CTXΦ (11, 12).

### 1.2.1 Synthèse et sécrétion par la bactérie *Vibrio Cholerae*

Le mécanisme de synthèse de la toxine n'est pas entièrement élucidé. Par contre, il a été observé que la bactérie peut réguler sa production en toxine par la détection du quorum, signifiant qu'en présence d'une densité faible en bactérie, elle est capable d'augmenter sa production en toxine. De plus, des facteurs environnementaux comme la présence de bile, d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et le pH peuvent aussi réguler la synthèse de la toxine. Il est prouvé également que cette bactérie est en mesure de produire la toxine dans le temps de son parcours au niveau intestinal (12).

La toxine du Choléra possède deux sous-unités, A et B. La sous-unité A (CTA) est constituée de 240 acides aminés et pèse près de 28 kDa. Elle est responsable de l'effet néfaste de la toxine. La sous-unité B (CTB) est un pentamère avec des unités de 103 acides aminés et 11,6 kDa chacune et elle est responsable de l'internalisation de la toxine dans les cellules intestinales de l'hôte.



La sous-unité A est synthétisée en entier sous forme d'une chaîne polypeptidique. Ensuite, elle subit une modification post-traductionnelle par l'action d'une protéase la séparant en deux chaînes CTA1 et CTA2. Les deux chaînes restent toutefois liées par un pont disulfure. La CTA1 conserve l'effet toxique tandis que la CTA2 sert à la liaison entre la CTA et la CTB. Les 5 sous-unités de la CTB sont liées entre elles par une multitude de ponts hydrogènes et salins, leur conférant une grande stabilité (12). La formation de pont disulfures entre la CTA2 et la CTB est catalysé par la protéine disulfure isomérase et la toxine du choléra est complétée (13). Enfin, la bactérie utilise plusieurs protéines pour sécréter la toxine dans la lumière intestinale via un pilus formant un pore situé à la membrane externe (12).

### **1.2.2 Internalisation dans les entérocytes**

Il ne suffit pas à la toxine d'être sécrétée dans la lumière intestinale par la bactérie pour produire les symptômes associés au Choléra. La toxine doit se solubiliser dans les liquides intestinaux, entrer dans les entérocytes et rejoindre son site d'action. Pour ce faire, elle lie un récepteur nommé ganglioside GM1 présent à la surface des entérocytes, particulièrement en grande quantité au niveau des radeaux lipidiques riches en cholestérol. Plus exactement, chaque sous-unité de la CTB lie un récepteur GM1 pour un total de 5 liaisons. Par un mécanisme méconnu, la liaison d'une sous-unité au GM1 entraîne le recrutement des récepteurs à proximité pour faciliter la liaison des quatre autres sous-unités. Il semble que cette agglomération de récepteurs favorise la courbure de la membrane cellulaire créant ainsi une invagination amorçant le processus d'internalisation par endocytose. En revanche, une étude a démontré qu'un seul site de liaison sur la CTB et donc qu'une seule liaison au récepteur GM1 est suffisante pour l'internalisation du complexe, mais diminue la toxicité globale (14). Il a été avancé par un autre laboratoire que la liaison entre la CTB et le GM1 doit obligatoirement avoir lieu au niveau du radeau lipidique pour qu'il y ait internalisation et transport au site d'action. Le cholestérol au niveau des radeaux lipidiques interagirait avec le réseau d'actine et c'est cette interaction qui rendrait possible le transport de la vésicule de la membrane cellulaire jusqu'au Golgi et au réticulum endoplasmique (15). Une toxine qui lirait

le ganglioside GM1 à un autre niveau qu'aux radeaux lipidiques ne produirait pas son effet toxique (16).

Le reste du transport de la toxine du choléra est très peu connu. Ce qui est prouvé, c'est que suite à l'endocytose, la vésicule contenant le complexe GM1-CT se dirige vers l'appareil de Golgi. Elle fusionne alors avec la membrane du Golgi et traverse le réseau trans-golgien. Ensuite, la CT encore liée au GM1 est transportée au réticulum endoplasmique par vésicule et c'est à ce niveau que la CTA est séparée de la CTB et dépliée par l'action de l'enzyme protéine disulfure isomérase. Elle est alors transférée dans le cytosol par le canal Sec61 et c'est à ce moment qu'elle peut réaliser son action toxique (16).

Différentes études ont porté sur la question du transport rétrograde de la toxine du Golgi vers le réticulum endoplasmique, puisque les protéines empruntent le chemin inverse naturellement. Les résultats ont réfuté l'hypothèse qui stipulait que la CTA était reconnue au niveau du Golgi et qu'elle devait absolument être présente pour le transfert de la toxine au réticulum endoplasmique (17). De plus, il semble que la CTB une fois séparée de la CTA, pourrait retourner au Golgi et à la membrane plasmique (17).

### **1.2.3 Mécanisme d'action**

Une fois dans le cytosol, la CTA catalyse l'ADP-rosylation de la protéine Gas faisant en sorte que cette protéine demeure active. La protéine Gas à son tour active constitutivement l'adénylate cyclase, une protéine membranaire se trouvant vers l'intérieur de la cellule. L'adénylate cyclase transforme l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui à son tour produit un débalancement des mouvements électrolytiques de part et d'autre de la membrane apicale des entérocytes. Notamment, l'AMPc bloque l'entrée de sodium ( $\text{Na}^+$ ) dans la cellule et augmente la sortie de chlore ( $\text{Cl}^-$ ). La sortie d'anion favorise à son tour la sortie de cation par gradient de charges. Finalement, ces perturbations en électrolytes engendrent une sécrétion importante en eau par osmose (12, 16, 18).

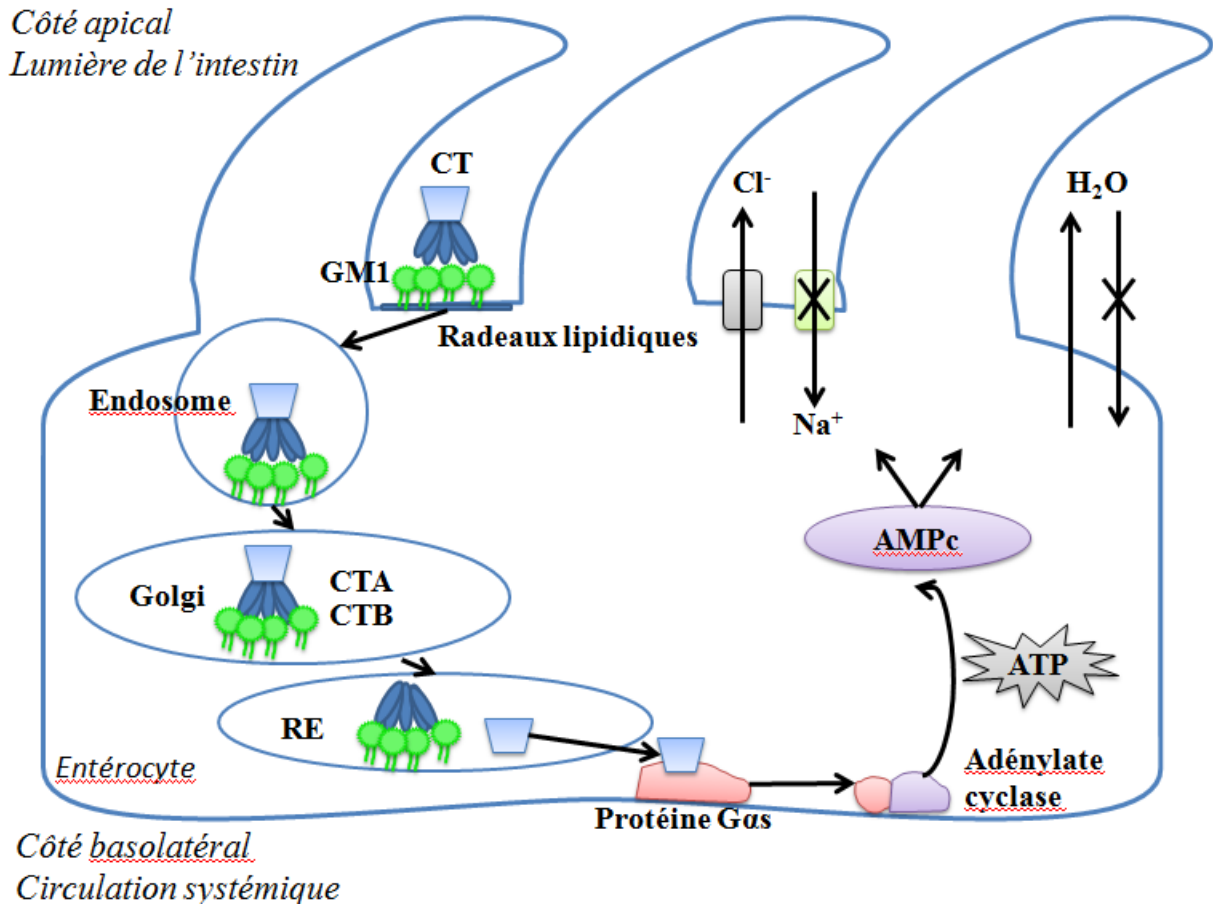


Figure 1.6 Représentation du transport et du mécanisme d'action de la toxine du choléra.

### 1.3 Les gangliosides

Le ganglioside GM1 utilisé dans le transport de la toxine du choléra fait partie d'une grande famille de glycosphingolipides répandus dans tout le corps et servant à de multiples fonctions. Les glycosphingolipides sont des oligosaccharides liés à des lipides, plus exactement à la céramide (Cer), un sphingolipide. Les gangliosides sont des glycosphingolipides dotés d'un ou de plusieurs acides sialiques. L'acide sialique le plus courant chez l'humain est l'acide N-acétylneuraminique (NANA), mais les gangliosides peuvent aussi être composés de l'acide N-glycolyl-neuraminique (NGNA) (19-21). Du fait qu'il existe plus de 90 gangliosides différents, ils ont été classés en familles.

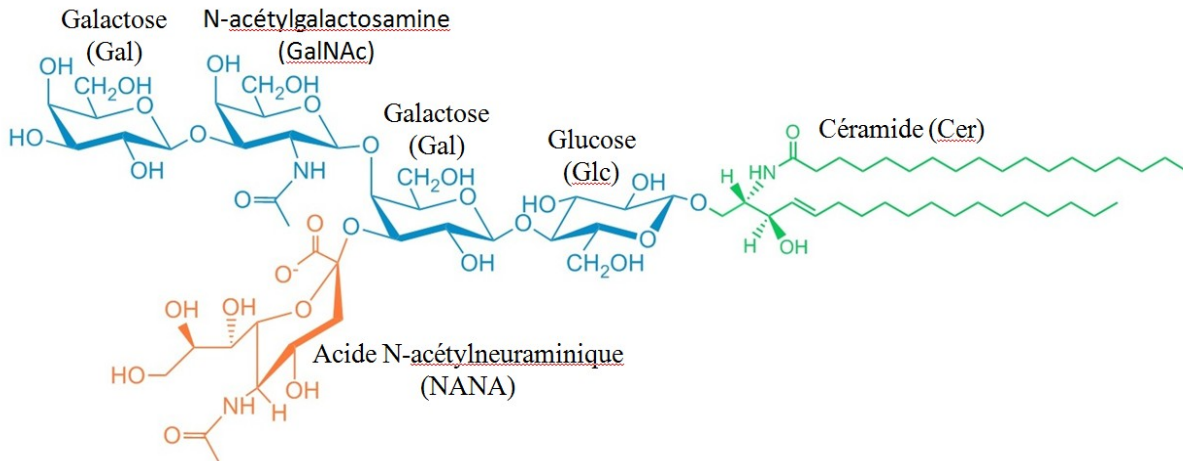


Figure 1.7 Structure générale des gangliosides.

### 1.3.1 Famille de gangliosides

Les gangliosides sont classés en 5 catégories selon le type d'oligosaccharide lié à la céramide, soit les ganglio, les hémato, les gala, les lacto et les globo. La famille ganglio est la plus courante et la plus étudiée. Une caractéristique principale de cette famille est que les gangliosides qui y sont inclus possèdent tous un groupement N-acétylgalactosamine (GalNAc) lié sur le même galactose (Gal) que l'acide sialique (SA). Par conséquent, la structure générale de ces gangliosides est GalNAc-Gal-Glc-Cer, avec l'ajout d'acide sialique et la possibilité d'ajouter un autre galactose côté terminal (côté GalNAc). La famille hémato est semblable à la famille ganglio, mais ne possédant pas la N-acétylgalactosamine, donc sa structure générale est Gal-Glc-Cer. La famille gala ne possède pas le glucose séparant le galactose de la céramide, sa structure est Gal-Cer. La famille lacto possède un groupement N-acétylglucosamine (GlcNAc), donc GlcNAc-Gal-Glc-Cer. La famille globo possède deux galactoses entre le glucose et la N-acétylglucosamine, donc GlcNAc-Gal-Gal-Glc-Cer (19, 21-23).

Une nomenclature a été élaborée dans les années 60 par Lars Svennerholm (24, 25) pour différencier les gangliosides. D'abord, tous les gangliosides sont représentés par la lettre G. Ensuite, selon le nombre d'acides sialiques liés au galactose la lettre G est suivie de M, D, T ou Q, pour monosialo (1), disialo (2), trisialo (3) et tétrasialo (4) respectivement. Un chiffre suit alors, il représente le nombre de monosaccharides liés à la céramide, soit tétraose, triose



ou biose. Par contre, les chiffres ne correspondent pas directement au nombre de monosaccharides, mais plutôt à l'ordre de migration en chromatographie sur couche mince en comparaison avec d'autres gangliosides possédant le même nombre d'acides sialiques. Le chiffre 1 représente la plus faible migration et est associé au tétraose, soit une chaîne de 4 monosaccharides. Le chiffre 2, représente une migration intermédiaire. Les gangliosides notés 2 ne possèdent pas le galactose terminal, donc ce sont des triose. Le chiffre 3, représente la plus grande migration, il correspond à des gangliosides qui ne possèdent pas le galactose terminal et le N-acétylgalactosamine (GalNAc) le précédant, résultant en un biose. Dans ce dernier cas, la perte de GalNAc fait en sorte que le ganglioside n'est plus classé dans la famille des ganglio.

Enfin, une le terme asialo ou les lettres a, b ou c sont ajoutés à la fin pour identifier le nombre d'acides sialiques liés au galactose central, soit 0, 1, 2 et 3 respectivement. Le terme  $\alpha$  est ajouté quand des acides sialiques sont liés au niveau du N-galactosamine (GalNAc ou GlcNAc).

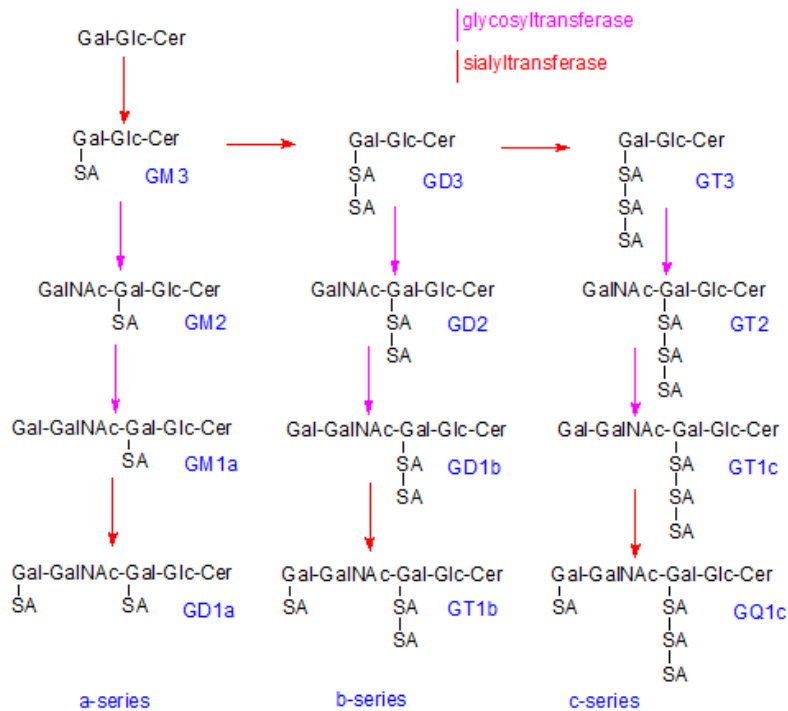


Figure 1.8 Arbre représentant la nomenclature des gangliosides. Tiré de Christie W. (26) avec permission.

### **1.3.2 Synthèse et localisation des gangliosides**

Les gangliosides ne sont pas stables dans le temps. Ils subissent un cycle de synthèse et de catabolisme selon les stimulus du corps comme la croissance ou la différenciation. De façon simplifiée, la partie céramide des ganglioside est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique tandis que les différents oligosaccharides sont constitués au niveau du Golgi. Des enzymes de type glycosyltransférase ainsi que sialyltransférase sont liées à la membrane du Golgi en une séquence qui correspond à l'ordre d'ajout des monosaccharides et des acides sialiques selon le type de ganglioside désiré. Des gangliosides simples ou plus complexes peuvent donc être synthétisés selon la séquence enzymatique présente au Golgi (23).

Une fois synthétisés, les gangliosides sont dirigés à la membrane cellulaire. La majorité des gangliosides du corps se retrouve au niveau du cerveau. Par contre, des concentrations relativement élevées ont été retrouvées au niveau de la moelle osseuse, des intestins, des érythrocytes, de la rate, du foie et des testicules (22). Les gangliosides servent à de multiples fonctions cellulaires comme la reconnaissance, l'adhésion, le signalement, la prolifération et la différenciation. Selon le type de stimuli, les gangliosides peuvent agir comme récepteur hormonal de facteur de croissance ou encore pour réguler les transports calciques. En résumé, leurs fonctions sont très vastes et dépendent de leur localisation dans le corps.

### **1.3.3 Le ganglioside GM1**

Le monosialotetrahexosylganglioside, connu sous le nom de ganglioside GM1, est de la famille des ganglio. Sa nomenclature indique qu'il possède un seul acide sialique «M» et quatre monosaccharides «1» dont un GalNAc. Il est présent en majorité au niveau neuronal, mais aussi en importance au niveau des radeaux lipidiques des cellules intestinales et cela, dans de multiples espèces de mammifère. Il est le premier ganglioside à avoir été étudié et la découverte de son association à la toxine du choléra en 1970 a initié de nombreuses études (27).

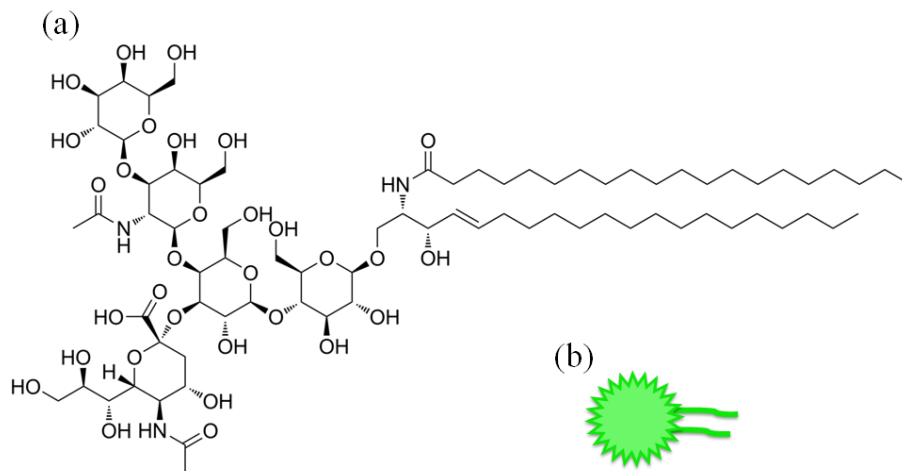


Figure 1.9 (a) Structure chimique du ganglioside GM1. (b) Représentation simplifiée utilisée dans ce mémoire.

Une étude a avancé que le GM1 présent au niveau des radeaux lipidiques pouvait par lui même être transporté jusqu'au réticulum endoplasmique et donc que la toxine du choléra emprunterait son mécanisme d'internalisation (16). D'un autre côté, une récente étude a démontré que selon la structure de la partie céramide du GM1 (chaînes saturées ou insaturées), il était possible que la toxine du choléra ne parcoure pas son chemin vers le Golgi et le réticulum endoplasmique. Elle traverserait plutôt la cellule par transcytose, soit une endocytose apicale et une exocytose basolatérale, évitant ainsi son activité sur l'équilibre électrolytique (28).

Toutefois, cette méthode d'absorption a été répertoriée par la suite pour différents complexes de gangliosides et de toxine comme la toxine du tétanos, internalisée par le ganglioside GT1b (29).

## 1.4 Hypothèses

La problématique soutenant ce projet de recherche est liée au fait que les différentes nouvelles entités moléculaires sont de moins en moins perméables (BCS III et IV) (30). Cela fait en sorte qu'elles ne sont pas absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal et donc qu'elles ne peuvent réaliser leur activité pharmacologique. Le but de ce projet est donc de développer une

technologie pour favoriser l'entrée de principes actifs dans les cellules intestinales pour qu'ils puissent ensuite atteindre la circulation sanguine.

La technologie développée dans ce projet est fondée sur le principe du promédicament. Il est composé d'une molécule active, d'un espaceur et d'un peptide ayant de l'affinité pour le ganglioside GM1, dans le but de promouvoir l'absorption en mimant le mécanisme d'internalisation de la toxine du choléra. Deux hypothèses soutiennent ce projet. La première est qu'un promédicament se liant au GM1 peut améliorer l'absorption intestinale de médicaments peu perméables. La deuxième est que ce promédicament peut être métabolisé en molécule active seule une fois absorbé.

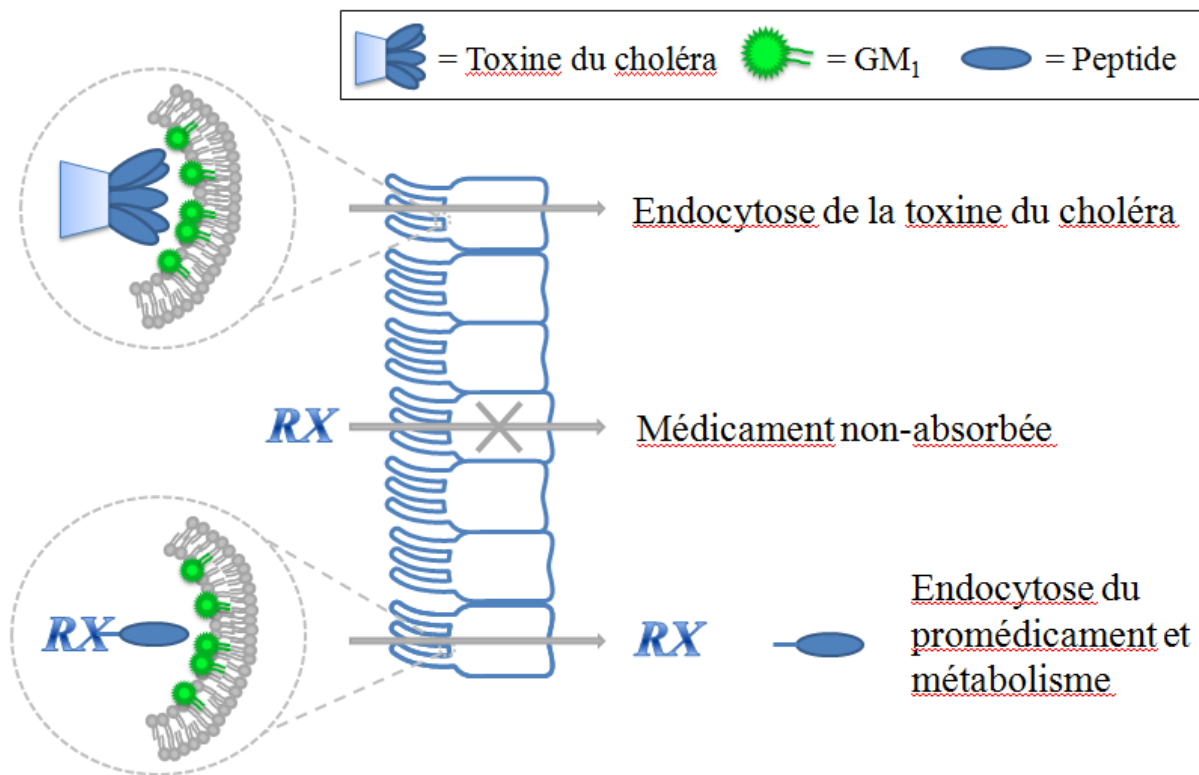


Figure 1.10 Hypothèses du projet de recherche.

## 1.5 Objectifs

L'objectif général de ce projet est de préparer des promédicaments à partir d'une molécule active et d'un peptide ayant de l'affinité pour le GM1 et d'évaluer leur capacité à être absorbé

dans les cellules intestinales. Plus spécifiquement, les trois volets de ce projet abordés dans ce mémoire sont 1) l'évaluation de la cinétique de conversion des promédicaments en molécules actives seules, 2) le développement d'une méthode d'évaluation de l'affinité de liaison du peptide et des promédicaments avec le ganglioside GM1 et enfin 3) l'évaluation de l'endocytose *in vitro* des promédicaments.

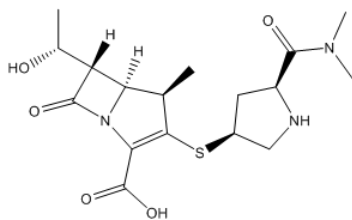
## **Chapitre 2. Résumé de la synthèse des promédicaments**

### **2.1 Choix des molécules modèles**

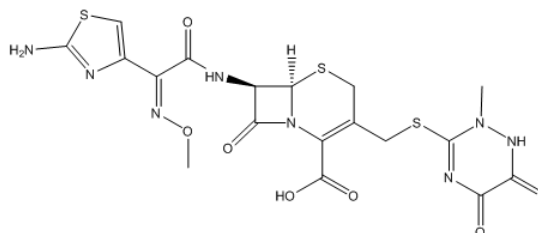
Dans le but de valider ou de réfuter la preuve de concept de ce projet, un critère a été primordial pour le choix des molécules modèles. Elles devaient être très peu perméables. De plus, pour mettre l'emphase sur l'utilité de cette technologie de promédicaments, le choix a été arrêté sur des molécules thérapeutiques déjà existantes administrées uniquement par voie intraveineuse. Une administration par voie orale serait alors très bénéfique. Un autre critère majeur a été considéré, soit que les molécules modèles devaient toutes posséder un groupement acide carboxylique pour réaliser la synthèse des promédicaments. Un seul acide carboxylique était préférable pour simplifier la synthèse dans le but d'éviter le greffage multiple ou d'éviter de devoir protéger des groupements.

Les molécules ayant été sélectionnées selon les critères mentionnés ci-haut sont le méropémen, la ceftriaxone, la vancomycine et la pipéracilline. Les propriétés physicochimiques de ces quatre antibiotiques à large spectre faisant partie de la classe BCS III font en sorte qu'ils sont tellement solubles qu'ils ne sont pas perméables à la paroi intestinale. En effet, ils possèdent tous un LogP négatif, soit: -0,6, -1,7, -3,1 et -0,26 pour le méropémen, la ceftriaxone, la vancomycine et la pipéracilline respectivement.

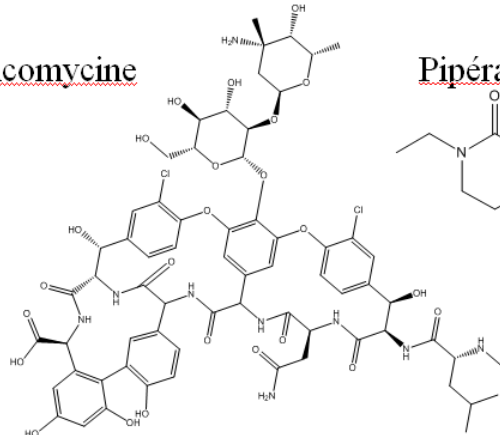
Méropénem



Ceftriaxone



Vancomycine



Pipéracilline

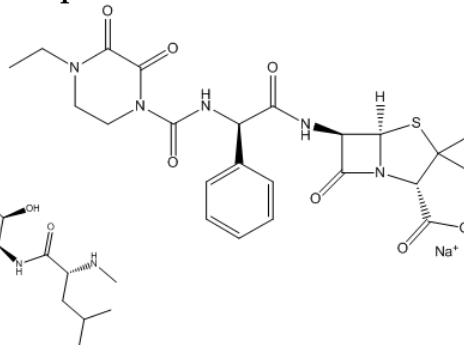


Figure 2.1 Structure chimique des antibiotiques sélectionnés.

## 2.2 Choix des peptides

Le peptide est la composante majeure du promédicament, puisque l'internalisation du complexe dépend de l'affinité entre le peptide et le récepteur GM1. Une revue de la littérature a été faite pour rechercher des peptides ayant démontré leur capacité à lier le récepteur en question.

Dans un article de Matsubara et al. (31) trois peptides ont été isolés à partir d'un essai de «phage display» entre une bibliothèque de phages de 15-mer randomisé et le récepteur ganglioside GM1. Un essai d'affinité par ÉLISA a également été réalisé pour classer les peptides en ordre de puissance de liaison au GM1. Le peptide reconnu comme ayant l'affinité la plus forte des trois, soit le peptide P3 (séquence d'acides aminés: VWRLAPPFSNRLLP) a été retenu dans ce projet pour les essais d'affinité. Il était important également pour faciliter la synthèse des promédicaments que le peptide soit doté d'une cystéine terminale. Le peptide P3 a donc été testé tel quel et à la suite de l'ajout d'une cystéine en c-terminale (P3C, séquence d'acides aminés: VWRLAPPFSNRLIPC).

Dans un article de Georgieva et al. (29) un nouveau peptide a été identifié également par «phage display», soit le G23 (séquence d'acides aminés: HLNILSTLWKYRC). Dans cet article, ce peptide servait de ligand placé à la surface de polymerosomes pour faciliter le transport à travers la barrière hématoencéphalique.

## 2.3 Survol de la synthèse des promédicaments

Les détails chimiques de la synthèse et de la caractérisation des promédicaments ne sont pas abordés en détail dans ce mémoire. Par contre, un résumé est présenté pour illustrer les structures utilisées pour les différents essais et ainsi faciliter la compréhension des résultats.

Avant tout, la synthèse des promédicaments a été réalisée en parallèle aux différents essais de stabilité et d'affinité présentés dans ce mémoire. En perspectives des résultats obtenus, la pipéracilline, a été sélectionnée pour la preuve de concept puisqu'en comparaison au méropénem, elle était stable, à la ceftriaxone elle facile à quantifier et à la vancomycine elle était peu complexe pour la synthèse. Le peptide G23 a également été sélectionné puisqu'il a démontré de l'affinité avec le récepteur GM1. De plus, deux espaceurs, un court (#1) et un long (#2), ont été préalablement synthétisés.

La synthèse a été réalisée en deux étapes globales. D'abord, la molécule thérapeutique a été liée aux espaceurs par une première réaction entre l'acide carboxylique de la pipéracilline sodium et l'iode de l'espaceur #1 ou de l'espaceur #2 (voir figure 2.2 pour les structures). Ensuite, cet intermédiaire a été conjugué au peptide liant le GM1 (G23: *HLNILSTLWKYRC*) par une réaction de chimie «click» thiol-ène entre la double liaison terminale de l'espaceur et la cystéine en bout de chaîne du peptide, formant un promédicament clivable au niveau du lien ester entre la pipéracilline et l'espaceur.



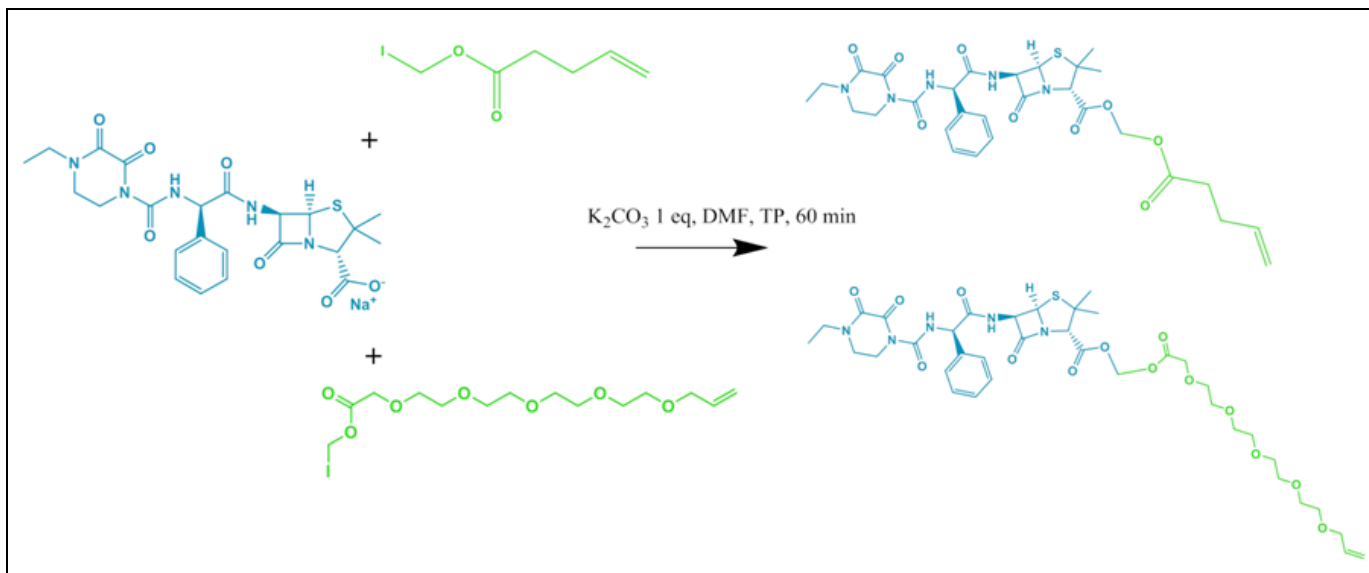


Figure 2.2 Synthèse des intermédiaires de piperacilline - espaceur #1 (court) et #2 (long).

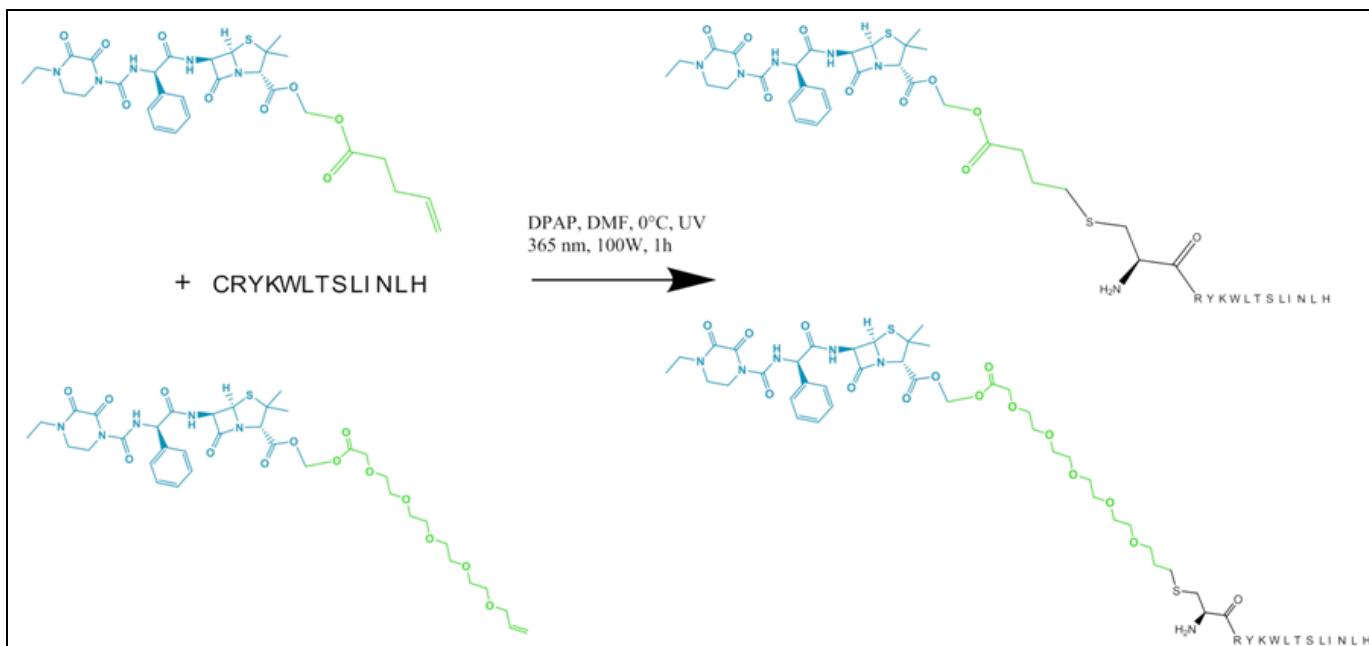


Figure 2.3 Synthèse des promédicaments de piperacilline - espaceur #1 et #2 - G23.

## Chapitre 3. Évaluation de la stabilité des promédicaments

### 3.1 Introduction

Pour répondre à la deuxième hypothèse de ce projet, soit que le promédicament, une fois absorbé, sera métabolisé pour libérer la molécule active seule, des essais de stabilité doivent être réalisés. Pour ce faire, un essai d'incubation des composés a été développé. Typiquement, les essais de stabilité sont réalisés en solubilisant la molécule à l'étude dans différents milieux pertinents. Les solutions sont agitées à une température représentative, soit 37 °C pour le corps humain, et des prélèvements sont effectués à des temps prédéterminés. Par la suite les échantillons sont quantifiés.

Les outils de quantification principalement utilisés sont l'appareil de chromatographie liquide haute performance à détection en ultraviolet (HPLC-UV) et à détection par spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS). Dans ces deux systèmes, la chromatographie sert à séparer les composés présents dans les échantillons. Le principe général est que les échantillons qui sont injectés dans l'appareil sont emportés par un courant de solvant (appelé phase mobile) jusque dans une colonne. Cette colonne est recouverte à l'intérieur par des groupements chimiques pouvant être hydrophiles, comme de la silice, ou lipophiles, comme des chaînes de carbones. Cette surface est appelée phase stationnaire. La phase stationnaire retient les composés selon leur polarité. Une colonne dotée d'une phase stationnaire hydrophile (aussi appelée phase normale) retient plus longtemps les composés polaires et inversement, une colonne possédant une phase stationnaire lipophile (phase inverse) retient les composés apolaires. Le solvant (phase mobile) d'un autre côté sert de transporteur pour les composés. Les composés ayant plus d'affinité pour la phase mobile que pour la phase stationnaire sont élués plus rapidement. Il est possible de faire varier la composition de la phase mobile dans le temps pour retenir davantage certains composés et ensuite les faire sortir plus ou moins rapidement (32).

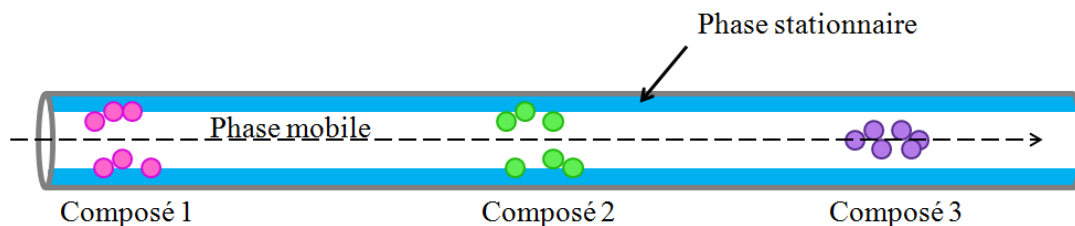


Figure 3.1 Principe général de la chromatographie liquide.

Les composés arrivent ensuite au système de détection. Dans le cas d'une détection par ultraviolet, le détecteur est composé d'une source de lumière UV-visible projetant vers une cellule recevant les composés dans la phase mobile sortante de la colonne. Enfin un détecteur à diode capte la lumière qui traverse l'échantillon. L'absorbance (capacité à absorber la lumière) est évaluée à une longueur d'onde fixe ou à de multiples longueurs d'onde selon le type de détecteur (mono- ou poly-chromatique). La longueur d'onde optimale diffère d'un composé à l'autre et l'absorbance est proportionnelle à la concentration en composé selon la loi de Beer Lambert.

Équation de Beer Lambert:

$$A = \varepsilon_{\lambda} l C \quad (3.1)$$

Où  $\varepsilon_{\lambda}$  est le coefficient d'absorption molaire, « $l$ » le trajet optique et « $C$ » la concentration du composé (32).

Pour une détection par spectrométrie de masse en tandem, le système est un peu plus complexe. De façon simplifiée, l'appareil comprend une source, un premier quadripôle (Q1), une chambre de collision (deuxième quadripôle, Q2), un troisième quadripôle (Q3) et un détecteur. La source ionise les composés, positivement ou négativement selon le mode choisi. Dans cet appareil, la masse perçue d'un composé dépend de sa charge selon la relation  $m/z$ , soit « $m$ » la masse et « $z$ » la charge (33, 34). Un composé de 500 g/mol chargé une fois présente une masse de 501, puisqu'un atome d'hydrogène lui est ajouté pour le charger positivement. Par contre, ce même composé chargé 2 fois présente une masse de 251, soit la masse totale additionnée de 2 atomes d'hydrogène et divisée par 2 charges.

Une fois ionisés, les composés entrent dans le premier quadripôle. Le Q1 sert de filtre de masse. En d'autres mots, il permet de trier les molécules selon leurs masses pour conserver seulement celles désirées. Donc, seulement les molécules possédant la masse exacte recherchée peuvent poursuivre leur chemin et les autres sont déviées. Ensuite, le Q2 sert de chambre de collision où les molécules sont fragmentées par des impacts entre elles. Les fragments résultants sont caractéristiques de chaque molécule. Au niveau du Q3, un deuxième filtre sélectionne la masse du fragment à conserver qui est spécifique à la molécule d'intérêt. Enfin, le détecteur capte la charge ou le courant induit lorsque le fragment ionisé frappe sa surface et calcule ensuite l'abondance d'ions présents. Avant de quantifier des échantillons, il est primordial d'optimiser la méthode avec un standard pur du composé à étudier, pour connaître son degré d'ionisation (charge simple ou multiple), sa masse et ses fragments spécifiques (33, 34).

La figure 3.2 dépeint un exemple où trois composés sont élués simultanément. Deux d'entre eux possèdent la masse recherchée. Le premier quadripôle conserve ces deux composés. Au niveau du deuxième quadripôle, les fragments spécifiques aux deux composés sont créés et au troisième quadripôle, seuls les fragments de masse identifiée comme appartenant à l'ion précurseur recherché sont conservés et détectés.

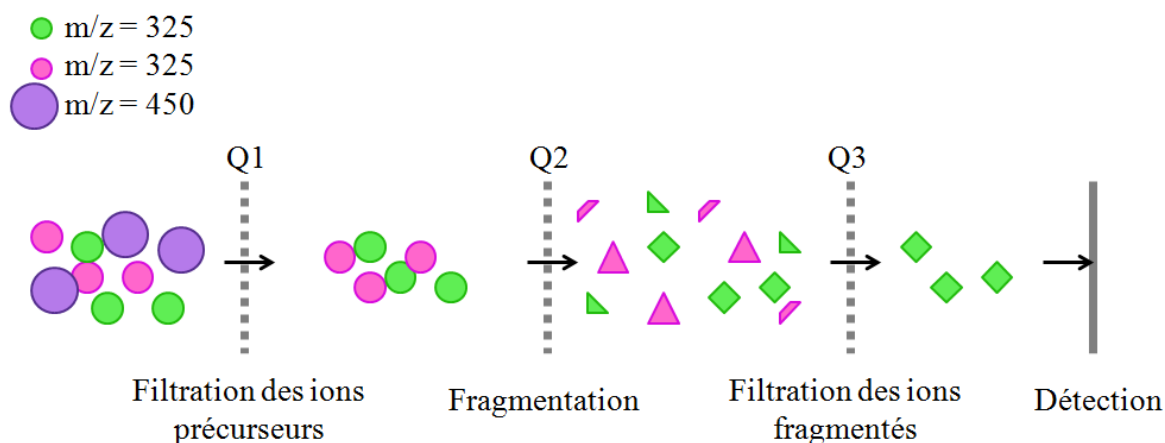


Figure 3.2 Principe général du HPLC-MS/MS.

Le HPLC-MS/MS présente certains avantages en comparaison au HPLC-UV. D'abord, il est plus sensible, il permet donc de quantifier des concentrations beaucoup plus faibles. Il est aussi très spécifique grâce au tri par masse et fragments de masse. De par ce fait, la matrice de

laquelle les échantillons proviennent (plasma par exemple) a souvent moins d'effet sur le signal obtenu en HPLC-MS/MS comparé à une détection en ultraviolet.

## **3.2 Matériel et méthodes**

L'évaluation de la stabilité des promédicaments a été réalisée en plusieurs étapes. D'abord, il a fallu développer et valider des méthodes de quantification pour chaque molécule étudiée. Ensuite, il a fallu développer l'essai de stabilité en choisissant les paramètres optimaux et enfin réaliser les essais. Toutes ces étapes sont décrites dans cette section.

### **3.2.1 Développement des méthodes de quantification**

Des méthodes de quantifications par chromatographie liquide haute performance à détection en ultraviolet (HPLC-UV) et à détection par spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) ont été développées pour les différents antibiotiques intraveineux ciblés pour entrer dans la composition des promédicaments.

Le méropénem (Lot: 0021D2, Exp: 12/2015, Sandoz Canada Inc., Boucherville, Canada), la ceftriaxone (Lot: 4CN1325CA, Exp: 06/2016, SteriMax Inc, Mississauga, Canada), la pipéracilline (Lot: 1P301MC2R, Exp: 03/2015, Hospira, Montréal, Canada) et la vancomycine (Lot: 6108338, Exp: 04/2015, Partenaires pharmaceutiques du Canada Inc., Richmond Hill, Canada) en poudre lyophilisée pour injection ont été achetés chez McKesson (Montréal, Canada) et ont été fournis par le CHU Sainte-Justine. Le sel sodique de pipéracilline (Lot: 1K2QM-SG) utilisée comme standard a été acheté chez Tokyo Chemical Industry (Chuo, Tokyo). Le labétalol hydrochloride et le doripénem monohydrate ont été achetés chez Sigma Aldrich (Oakville, Canada).

L'appareil HPLC-UV Shimadzu (Columbia, États-Unis) est composé d'une pompe binaire (LC-20AD), d'un échantillonneur automatique réfrigéré (SIL-20AC HT), d'un four à colonnes (CTO-20AC) et d'un détecteur UV PDA (SPD-M20A).

L'Appareil HPLC-MS/MS est composé d'un HPLC série 1100 d'Agilent Technologies (Mississauga, ON, Canada) regroupant un dégazeur (G1379A), une pompe binaire (G1312A), un échantillonneur automatique réfrigéré (G1367A) et un four à colonnes (G1316A). Le système HPLC est couplé à un API4000 QTRAP triple quadripôle de Sciex (Framingham,

USA) avec une source d'ionisation par électronébuliseur (ESI). Le tout est contrôlé par le logiciel Analyst 1.6.1.

Les colonnes utilisées ont été achetées chez Phenomenex (Torrance, États-Unis). Les solvants utilisés (acétonitrile et méthanol) ainsi que les acides acétique et formique de grade HPLC proviennent tous de Fisher scientifique (Burlington, Canada).

Le développement des méthodes de quantification a été réalisé en plusieurs étapes, en commençant par les antibiotiques choisis. D'abord, chaque molécule sous forme de standard pur ou sous forme de poudre lyophilisée pour injection a été diluée à 50  $\mu\text{M}$  dans une phase mobile typique, soit un mélange équivalent d'acétonitrile et d'eau et de 0,1% d'acide acétique ou formique. Pour le développement par HPLC-UV, les solutions ont d'abord été injectées sur une colonne C18, avec l'eau + 0,1 % acide acétique ou formique et l'ACN + 0,1 % acide acétique ou formique comme phase mobile ainsi qu'un gradient de 95 % à 5 % d'eau sur 10 minutes. Le spectre d'absorbance du composé a été observé et la longueur d'onde optimale a été sélectionnée. La composition et le gradient des phases mobiles ainsi que la colonne ont été optimisés jusqu'à l'obtention un pic adéquat (assez mince et assez retenu).

Le développement des méthodes par HPLC-MS/MS a été réalisé d'abord en infusant la solution standard directement dans le spectromètre de masse. De cette façon, le signal demeure continu puisque les composés ne sont pas retenus par la colonne. Donc, les composés ont été infusés et un mode de détection par ion précurseur a premièrement été utilisé. Ce mode fait fonctionner seulement le Q1 de l'appareil, il est donc possible d'aller chercher la masse exacte du composé recherché ainsi que son nombre de charges. Deuxièmement, un mode de détection des ions fragmentés a été utilisé. Ce mode détecte les masses de tous les fragments provenant des ions sélectionnés par le Q1. Les fragments les plus intenses sont retenus. Troisièmement, les intensités de chaque couple de masse d'ion précurseur et d'ion fragmenté ont été comparées et le couple présentant la plus forte intensité a été conservé. Quatrièmement, les paramètres du spectromètre de masse soit l'énergie de collision (CE), le «declustering potential» (DP), le potentiel d'entrée (EP) et le potentiel de sortie (CXP) ont été optimisés et ceux offrant la sensibilité la plus élevée, ont été retenus. Cinquièmement, la solution standard a été injectée au niveau du HPLC avec les mêmes paramètres de base que pour l'optimisation par HPLC-UV, mis à part un temps d'analyse de 5 minutes. Également, les paramètres chromatographiques ont été optimisés pour obtenir un pic adéquat.

### **3.2.2 Validation des méthodes de quantification**

Les méthodes quantitatives développées pour les essais de stabilité ont été validées selon les critères de Santé Canada (35). Les contrôles suivants sont requis pour la validation d'une méthode analytique. Il faut démontrer la linéarité sur l'écart d'utilisation prévu avec au moins 5 échantillons standards de concentrations différentes. Ensuite, il faut démontrer l'exactitude et la précision de la méthode en injectant 3 standards de concentration faible, moyenne et élevée puis évaluer la différence entre la concentration obtenue et la valeur théorique puis évaluer l'écart entre les valeurs par le coefficient de variation (CV %). La différence entre la valeur obtenue et la valeur théorique doit être plus petite que 15 % sauf à la limite de dosage (LDo) où 20% est accepté. L'écart entre les valeurs doit aussi être plus petit que 15 % et 20% à la LDo. La limite de dosage est la concentration minimale à laquelle la substance peut être détectée de façon fiable. Elle peut être calculée par l'approche du signal face au bruit, où un rapport de 10 pour 1 du standard de faible concentration comparé au blanc est acceptable, ou par l'approche de l'écart type où elle est égale à 10 fois l'écart type de plusieurs blancs ou de l'ordonnée à l'origine de plusieurs courbes de calibration divisé par la pente de la courbe de calibration. La limite de détection (LDé) peut également être calculée par la même formule, mais avec un facteur de 3,3 au lieu de 10.

### **3.2.3 Développement de l'essai de stabilité**

L'essai de stabilité consiste en une incubation de la molécule d'intérêt dans différents milieux et un suivi cinétique de la concentration de cette molécule. La concentration de départ a été établie à 10  $\mu\text{M}$  puisque c'est la concentration standard lors des essais de perméabilité, alors il est facile de mettre les résultats en perspective. De plus, cette concentration n'est pas trop élevée, favorisant la solubilité des molécules. Des essais préliminaires avaient été réalisés à 100  $\mu\text{M}$  et une précipitation des échantillons avait été observée dans le temps.

Les incubations ont été réalisées dans des plaques 96 puits à puits profonds de 2 mL (VWR international ltée, Montréal, Canada). Les milieux ont été ajoutés à la plaque (990  $\mu\text{L}$ ) en triplicata et la plaque a été placée au ThermoMixer (Eppendorf Canada Ltd, Mississauga, Canada) à 37 °C et 300 rpm. Ensuite, 10  $\mu\text{L}$  d'une solution à 1 mM dans le diméthylformamide (DMF) (Fisher scientifique, Burlington, Canada) ont été ajoutés à tous les

puits et les solutions ont été mélangées à l'aide d'une pipette de 1000  $\mu\text{L}$ . Un prélèvement de 50  $\mu\text{L}$ , pour les échantillons en phase aqueuse, et de 100 $\mu\text{L}$ , pour les échantillons dans le plasma, a immédiatement été effectué (temps zéro) et la plaque a été replacée au ThermoMixer à 37 °C sous agitation à 300 rpm. Le mélange des solutions a été optimisé de sorte que chaque solution soit prélevée immédiatement après son mélange à l'aide de la pipette, donnant un réel temps zéro pour chaque échantillon. Le temps de mélange de chaque solution a été pris en compte pour les prélèvements subséquents à 5, 10, 30, 60, 120 et 180 minutes. Les temps de prélèvements ont aussi été optimisés pour couvrir la durée de l'essai de perméabilité et couvrir également la dégradation rapide de certaines molécules dans des conditions particulières.

Les prélèvements ont été dilués avec de l'acétonitrile et de l'eau MilliQ (50 $\mu\text{L}$  d'eau + 0,1 % acide acétique et 100 $\mu\text{L}$  d'ACN + 0,1 % acide acétique pour les échantillons dans les tampons ou la phase mobile et 100  $\mu\text{L}$  d'eau + 0,1 % acide acétique et 200  $\mu\text{L}$  d'ACN + 0,1 % acide acétique pour les échantillons dans le plasma) et gardés sur glace pour la durée du test. Les échantillons dans le plasma ont été gardés dans une plaque 96 puits à puits profonds de 0,5 mL (VWR international Ltée, Montréal, Canada) et la plaque a été centrifugée pour faire précipiter les protéines du plasma 30 minutes à 4000 rpm (centrifugeuse Thermo IEC Multi RF, Thermo scientifique instruments, Burlington Canada), tandis que les échantillons des autres milieux ont été placés dans une plaque 96 puits de 300 $\mu\text{L}$  (VWR international Ltée, Montréal, Canada) prête pour injecter au HPLC-MS/MS.

La concentration en acétonitrile utilisée pour faire précipiter les prélèvements de plasma a été optimisée ainsi que le temps et la vitesse de centrifugation pour éviter qu'il reste des protéines précipitées en suspension et aussi éviter le soulèvement du culot lors du transfert dans une plaque pour injection. Par contre, le temps de centrifugation est très long. Il serait possible d'optimiser encore cette étape en ajoutant seulement l'ACN avant la centrifugation et en diluant par la suite avec l'eau lors du transfert de plaque.

Une fois prêts pour l'injection, les échantillons ont une concentration maximale de 2,5  $\mu\text{M}$  puisqu'une dilution d'un facteur de 4 a été effectuée. Des courbes de calibrations ont été produites en conséquence pour couvrir du maximum jusqu'aux concentrations les plus basses restantes dans la zone de linéarité. Deux courbes ont été nécessaires, une dans la phase mobile et une autre contenant du plasma qui subira la même centrifugation que les prélèvements réalisés dans le plasma. Pour s'assurer que les courbes de calibration subissent le même



traitement que les échantillons, les échantillons standards ont été dilués dans l'ACN en série à une concentration 4 fois plus élevée que la concentration désirée. Ensuite, 50 µL de chaque standard ont été prélevés et mélangés à 50 µL d'ACN + 0,1% acide acétique et 100 µL d'eau + 0,1 % acide acétique, formant ainsi la courbe pour les prélèvements dans les différents tampons ou dans la phase mobile. Pour la courbe des échantillons plasmatiques, 100 µL de chaque standard ont été prélevés et dilués avec 100 µL de plasma blanc, 100 µL d'ACN + 0,1 % acide acétique et 100 µL d'eau + 0,1 % acide acétique dans la même plaque que les échantillons pour que la centrifugation soit faite simultanément.

### **3.2.4 Réalisation des essais de stabilité**

La stabilité du méropénem a d'abord été investiguée, puisque la molécule une fois en solution semblait se dégrader rapidement. Des solutions mères ont été créées dans l'eau et le diméthylsulfoxyde (DMSO) puis gardées à température ambiante ou au congélateur à -20 °C. La quantité restante de méropénem a été quantifiée à différents temps sur un total de 14 heures.

Ultérieurement, des essais de stabilité ont été réalisés avec la pipéracilline - espaceur #1, la pipéracilline - espaceur #1 - G23, la pipéracilline - espaceur #2 - G23 et le peptide G23 seul. Dans tous les cas, sauf avec le peptide seul, la molécule complète a été quantifiée ainsi que la pipéracilline seule pour être en mesure d'observer si le métabolisme menait à la libération de la molécule active intacte. Les incubations de pipéracilline - espaceur #1 ont été faites dans 4 milieux, soit la phase mobile (1:1 ANC:Eau + 0,1 % acide acétique), le HBSS pH 6,5, le PBS pH 7,4 et le plasma avec des prélèvements à 0, 5, 10, 30, 60, et 120 minutes. Deux essais de stabilité ont été effectués avec la pipéracilline - espaceur #1 - G23. Dans le premier, les incubations ont été faites dans la phase mobile, le HBSS pH 6,5, le SGF pH 1,2 et le plasma, puis dans le deuxième, dans la phase mobile, le HBSS pH 6,5, le PBS pH 7,4 et le plasma avec dans les deux cas des prélèvements typiquement à 0, 5, 10, 30, 60, 120 et 180 minutes. La pipéracilline - espaceur #2 - G23 a été testée dans la phase mobile, le HBSS pH 6,5, le PBS pH 7,4 et le SGF 1,2 avec des prélèvements à 0, 5, 10, 30, 60, 120 et 180 minutes. Enfin, le peptide G23 a été testé dans la phase mobile, le HBSS pH 6,5, le PBS pH 7,4 et le SGF 1,2 avec des prélèvements aussi à 0, 5, 15, 45, 105 et 165 minutes. Les évaluations de la stabilité

dans le plasma des deux dernières molécules devront être faites ultérieurement par manque de stock de plasma.

### 3.3 Résultats

#### 3.3.1 Développement des méthodes de quantification

##### 3.3.1.1 Développement de méthode pour le méropénem

Une méthode de quantification du méropénem a d'abord été développée par HPLC-UV (voir tableau I). Par contre, un effet important de la matrice a été observé lorsque les échantillons étaient prélevés du plasma. Cette méthode a alors été abandonnée pour être remplacée par une quantification par HPLC-MS/MS, plus spécifique à la molécule recherchée et donc moins affectée par la matrice.

Tableau I. Méthode HPLC-UV pour la quantification du méropénem.

<b>Colonne</b>	C18, 5 $\mu$ M, 15 cm
<b>Phases mobiles</b>	A: 20 mM tampon phosphate pH 3 B: ACN
<b>Gradient</b>	Aucun
<b>Débit</b>	0,8 mL/min
<b>Temps de rétention</b>	5 min
<b>Volume d'injection</b>	10 $\mu$ L
<b>Température colonne</b>	40 °C
<b>Température injecteur</b>	5°C
<b>Détection</b>	298 nm

La méthode de quantification par HPLC-MS/MS a été développée avec une possibilité de deux standards internes, soit le doripénem, une molécule ressemblant beaucoup au méropénem, ou le labétalol, une molécule souvent utilisée comme standard interne pour sa stabilité. Les paramètres chromatographiques ont été modifiés pour passer d'une méthode à détection par ultraviolets à une méthode par spectrométrie de masse. Ainsi, puisque les

solvants doivent être volatils en HPLC-MS/MS, le tampon phosphate a été remplacé par de l'eau MilliQ acidifiée avec l'acide formique (voir tableau II et III).

Tableau II. Paramètres MS/MS pour la quantification du méropénem.

Molécule	Q1 <sup>1</sup>	Q3 <sup>2</sup>	DP <sup>3</sup>	EP <sup>4</sup>	CE <sup>5</sup>	CXP <sup>6</sup>
Méropénem	384,0	68,2	76	10	75	10
Doripénem (SI 1)	421,0	342,3	60	10	20	10
Labetalol (SI 2)	329,1	91,0	65	10	61	10

<sup>1</sup> Le terme Q1 représente la masse de l'ion parent sélectionnée par le premier quadripôle, <sup>2</sup> tandis que le Q3 est la masse de l'ion produit par la fragmentation du parent au niveau de la chambre de collision et sélectionnée par le troisième quadripôle. <sup>3</sup> Le «de-clustering potential» (DP) est la différence de potentiel entre la plaque métallique dotée d'un orifice pour faire entrer les ions au premier quadripôle et la mise à la terre. <sup>4</sup> Le potentiel d'entrée (EP) concentre les ions à l'entrée de l'appareil. <sup>5</sup> L'énergie de collision (CE) est l'énergie apportée à l'ion parent pour qu'il se fragmente. <sup>6</sup> Le terme CXP correspond au potentiel à la sortie de la chambre de collision.

Tableau III. Méthode chromatographique par HPLC-MS/MS pour la quantification du méropénem.

<b>Colonne</b>	C18 Luna 5µm 50x4.6 mm Phenomenex
<b>Phases mobiles</b>	A: Eau + 0,2% acide formique B: ACN + 0,1% acide formique
<b>Gradient</b>	0 min - 95 % A 1 min - 95 % A 3 min - 80 % A 3.5 min - 80 % A 4 min - 95 % A 5 min - 95 % A
<b>Débit</b>	0,7 mL/min
<b>Temps de rétention</b>	Méropénem: 3,0 min Labetalol: 3,1 min
<b>Volume d'injection</b>	10 µL
<b>Température colonne</b>	24 °C

<b>Température injecteur</b>	5°C
<b>Diluant</b>	80% eau 20% ACN

Suite à la synthèse du méropénem - espaceur #1, cette nouvelle molécule a dû être infusée pour obtenir les paramètres de spectrométrie de masse optimaux et la méthode chromatographique a été modifiée quelque peu pour séparer les pics des deux composantes et pour raffiner la largeur des pics (voir tableau IV et V).

Tableau IV. Paramètres MS/MS pour la quantification du méropénem - espaceur #1.

<b>Molécule</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
Méropénem	384,059	68,209	76	10	75	10
Méropénem - espaceur #1	496,9	141,2	120	10	25	10

Tableau V. Méthode chromatographique par HPLC-MS/MS pour la quantification du méropénem - espaceur #1.

<b>Colonne</b>	C18 Luna 5 $\mu$
<b>Phases mobiles</b>	A: Eau + 0,1% acide formique B: ACN + 0,1% acide formique
<b>Gradient</b>	0 min - 95 % A 0.5 min - 95 % A 2 min - 5 % A 4 min - 5 % A 4.1 min - 95 % A 5 min - 95 % A
<b>Débit</b>	0,8 mL/min
<b>Temps de rétention</b>	Méropénem: 2,3 min Méropénem - espaceur #1: 2,5 min
<b>Volume d'injection</b>	10 $\mu$ L
<b>Température colonne</b>	24 °C
<b>Température injecteur</b>	5°C

### 3.3.1.2 Développement de méthode pour la vancomycine

Une méthode de quantification pour la vancomycine et la vancomycine liée à l'espaceur #1 a aussi été développée en HPLC-MS/MS (voir tableau VI et VII).

Tableau VI. Paramètres MS/MS pour la quantification de la vancomycine et de la vancomycine - espaceur #1.

Molécule	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
Vancomycine	725,7	144,2	66	10	25	8
Vancomycine - espaceur #1	781,5	100,0	66	10	111	8

Tableau VII. Méthode chromatographique par HPLC-MS/MS pour la quantification de la vancomycine et de la vancomycine - espaceur #1.

<b>Colonne</b>	C18 Luna 5 $\mu$
<b>Phases mobiles</b>	A: Eau + 0,1% acide acétique B: ACN + 0,1% acide acétique
<b>Gradient</b>	0 min - 95 % A 1 min - 95 % A 3 min - 10 % A 4 min - 10 % A 4.5 min - 95 % A 5.5 min - 95 % A
<b>Débit</b>	0,8 mL/min
<b>Temps de rétention</b>	Vancomycine: 2,8 min Vancomycine - espaceur 1: 3 min
<b>Volume d'injection</b>	10 $\mu$ L
<b>Température colonne</b>	24 °C
<b>Température injecteur</b>	5°C

### 3.3.1.3 Développement de méthode pour la ceftriaxone

L'optimisation de la ceftriaxone en HPLC-MS/MS a été difficile due au fait que la molécule semblait être présente sous plusieurs formes de sel (sans Na, avec 1Na et 2Na). En effet, trois masses étaient détectées, soit 554, 576 et 598. La sensibilité était alors très faible. De plus, la

méthode chromatographique a été complexe à optimiser, puisque le composé n'était pas bien retenu sur les colonnes C8, C18 et Hilic avec différents solvants et gradients, puis le pic était souvent très large ou dédoublé. Cette molécule a donc été mise de côté pour concentrer les efforts sur une autre plus facile à quantifier.

### 3.3.1.4 Développement de méthode pour la pipéracilline

Une première méthode de quantification par HPLC-MS/MS a été développée pour la pipéracilline et la pipéracilline - espaceur #1 (voir tableau IIX et IX).

Tableau IIX. Paramètres MS/MS pour la quantification de la pipéracilline et de la pipéracilline - espaceur #1.

Molécule	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
Pipéracilline	518,178	143,4	91	10	30	10
Pipéracilline - espaceur #1	631,219	272,2	91	10	20	10

Tableau IX. Méthode chromatographique par HPLC-MS/MS pour la quantification de la pipéracilline et de la pipéracilline - espaceur #1.

<b>Colonne</b>	C18 Luna 5 $\mu$
<b>Phases mobiles</b>	A: Eau + 0,1 % acide acétique B: MeOH + 0,1 % acide acétique
<b>Gradient</b>	0 min - 40 % A 2 min - 10 % A 4 min - 10 % A 4.1 min - 40 % A 5 min - 40 % A
<b>Débit</b>	0,7 mL/min
<b>Temps de rétention</b>	Pipéracilline: 2,4 min Pipéracilline - espaceur #1: 3,6 min
<b>Volume d'injection</b>	10 $\mu$ L
<b>Température colonne</b>	24 °C
<b>Température injecteur</b>	5°C

Ensuite, la méthode a été modifiée pour une plus générique permettant d'utiliser les solvants présents en tout temps sur l'appareil, facilitant ainsi l'utilisation commune du HPLC-MS/MS (voir tableau X et XI). Cette nouvelle méthode s'est avérée adéquate pour toutes les molécules dérivées de la pipéracilline ainsi que pour le peptide G23. Elle a donc été utilisée pour tous les essais de stabilité avec ces molécules.

Tableau X. Paramètres MS/MS finaux pour la quantification de la pipéracilline et de ses dérivés

<b>Molécule</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
Peptide G23	550,3	347,5	90	10	50	8
Pipéracilline	518,2	143,4	91	10	30	10
Pipéracilline - espaceur #1	631,2	272,2	91	10	20	10
Pipéracilline - espaceur #1 - G23	760,4	713,0	93	10	28	20
Pipéracilline - espaceur #2	822,3	464,5	46	10	18	12
Pipéracilline - espaceur #2 - G23	830,0	143,0	86	10	70	10

Tableau XI. Méthode chromatographique finale par HPLC-MS/MS pour la quantification de la pipéracilline et de ses dérivés

<b>Colonne</b>	C8 Luna 5µm 30x20mm
<b>Phases mobiles</b>	A: Eau + 0,1 % acide formique B: 80% ACN 20% IPA + 0,1 % acide formique
<b>Gradient</b>	0 min - 98 % A 1 min - 98 % A 3 min - 10 % A 4 min - 10 % A 4.1 min - 98 % A 5 min - 98 % A
<b>Débit</b>	0,8 mL/min
<b>Temps de rétention</b>	Peptide G23: 2,3 min Pipéracilline: 2,8 min Pipéracilline - espaceur #1: 3,6 min Pipéracilline - espaceur #1 - G23: 2,6 min Pipéracilline - espaceur #2: 3,1 min Pipéracilline - espaceur #2 - G23: 2,5

<b>Volume d'injection</b>	5 µL
<b>Température colonne</b>	24 °C
<b>Température injecteur</b>	5°C

### 3.3.2 Validation des méthodes de quantification

Les critères de Santé Canada ont tous été respectés pour valider les méthodes de quantification de la pipéracilline, de ces dérivés et du peptide G23 (voir tableau XII). La méthode de quantification de la pipéracilline - espaceur #2 - G23 n'a pas pu être validée puisque la solution mère était déjà en partie dégradée lors de l'essai de stabilité, alors une courbe de calibration n'aurait pas été fiable et il ne restait plus de matériel pour faire une nouvelle solution mère.

Tableau XII. Validation des méthodes de quantification par HPLC-MS/MS

Molécules	Pipéracilline	Pipéracilline - espaceur #1	Pipéracilline - espaceur #1 - G23	G23
LDé (nM)	6,02	7,55	1,13	180
LDo (nM)	18,2	22,9	25,0	548
Linéarité (µM)	0,025-0,25 et 0,5-5	0,025-2,5	0,025-2,5	0,55-5
R <sup>2</sup>	0,9999 et 0,9962	0,9971	0,9998	0,9938
Exactitude (%)				
-Faible	87	96	95	97
-Moyenne	100	88	103	96
-Élevée	99	99	99	102
Précision (%)				
-Faible	11	4	15	3
-Moyenne	9	1	13	1
-Élevée	7	1	11	5



### 3.3.3 Essais de stabilité

Il aurait été difficile de travailler avec le méropénem puisque les solutions dans l'eau ou le DMSO se dégradent à température ambiante (50% en 8 heures) et au congélateur (20% en 14 heures). De plus, lors de la synthèse et de la purification du méropénem - espaceur #1, une importante partie du méropénem se dégradait. Les efforts ont donc été portés sur la pipéracilline, une molécule beaucoup plus stable.

Les premiers essais de stabilité ont été réalisés avec la pipéracilline - espaceur #1. Les résultats de la quantification ont montré que le lien ester demeurait stable en condition quelque peu acide (pH 6,5, représentatif du pH intestinal) et qu'il était clivé, libérant la molécule active seule, au pH neutre. En outre, le métabolisme se produisait encore plus rapidement dans le plasma, probablement dû à l'action des carboxylestérases. La figure 3.3 représente un histogramme empilé du pourcentage de la concentration initiale en intermédiaire de pipéracilline - espaceur #1 et du pourcentage de la quantité possible maximale en pipéracilline issue du métabolisme. Les deux barres empilées doivent totaliser 100 % pour indiquer l'absence de métabolites inconnus et c'est ce qui a été observé pour cet intermédiaire après 120 minutes d'incubation.

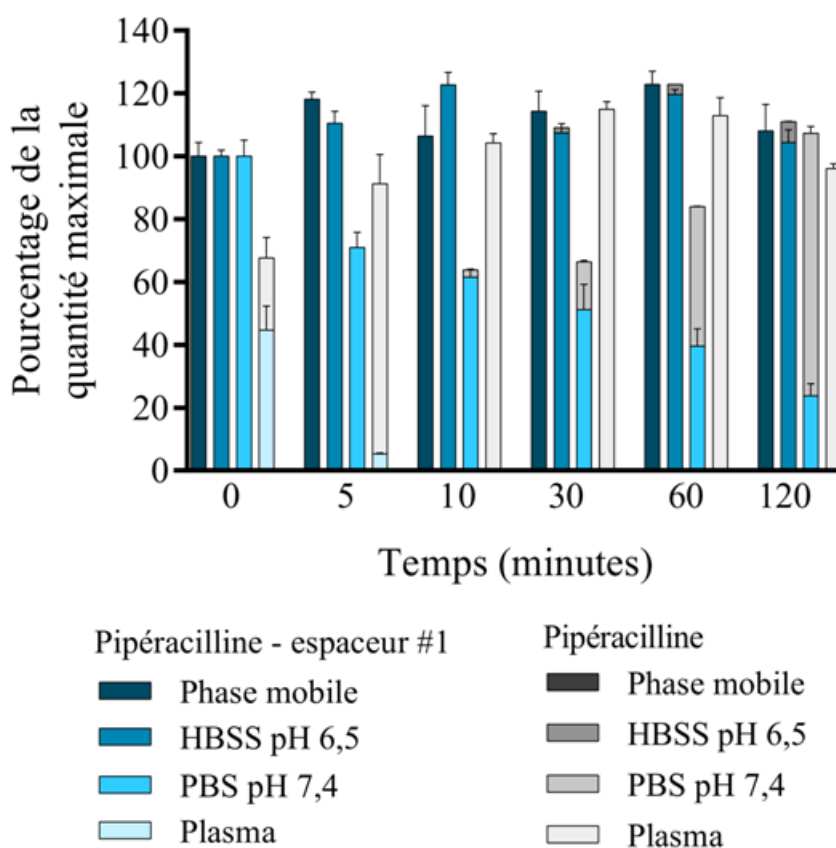


Figure 3.3 Stabilité pipéracilline - espaceur #1.

Subséquentement, la stabilité de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 a été évaluée. La figure 3.4 représente un histogramme empilé du pourcentage de la concentration initiale en pipéracilline - espaceur #1 - G23 et du pourcentage de la quantité possible maximale en pipéracilline issue du métabolisme. La liaison au peptide G23 semble avoir apporté une stabilisation puisque cette molécule demeure intacte beaucoup plus longtemps dans le plasma que l'intermédiaire. Par contre, le métabolisme de cette molécule semble plus complexe, puisqu'il ne libère pas totalement la pipéracilline, même après 3 heures dans le plasma, où il ne reste seulement qu'environ 5 % de pipéracilline - espaceur #1 - G23.

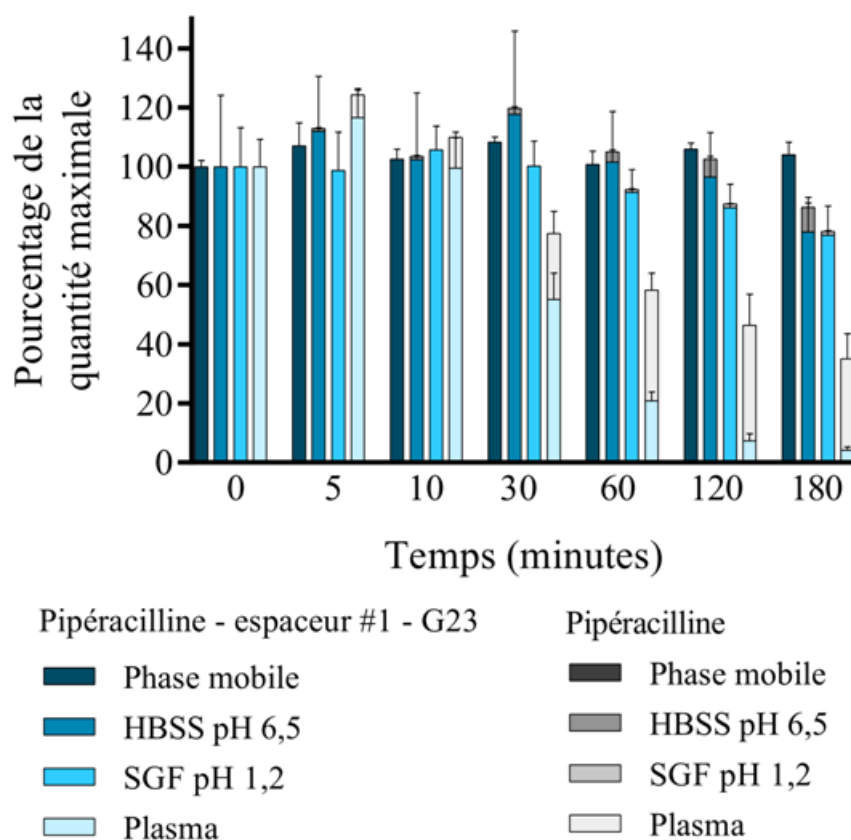


Figure 3.4 Stabilité pipéracilline - espaceur #1 - G23 lors du premier essai.

Un deuxième essai a été réalisé par la suite pour tester la stabilité de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 dans le PBS pH 7,4, en comparaison aux autres milieux. Par contre, dans cet essai, la molécule a subi un métabolisme beaucoup plus important dans le HBSS pH 6,5 (30% restant) que lors du premier essai (80% restant) (voir figure 3.5).

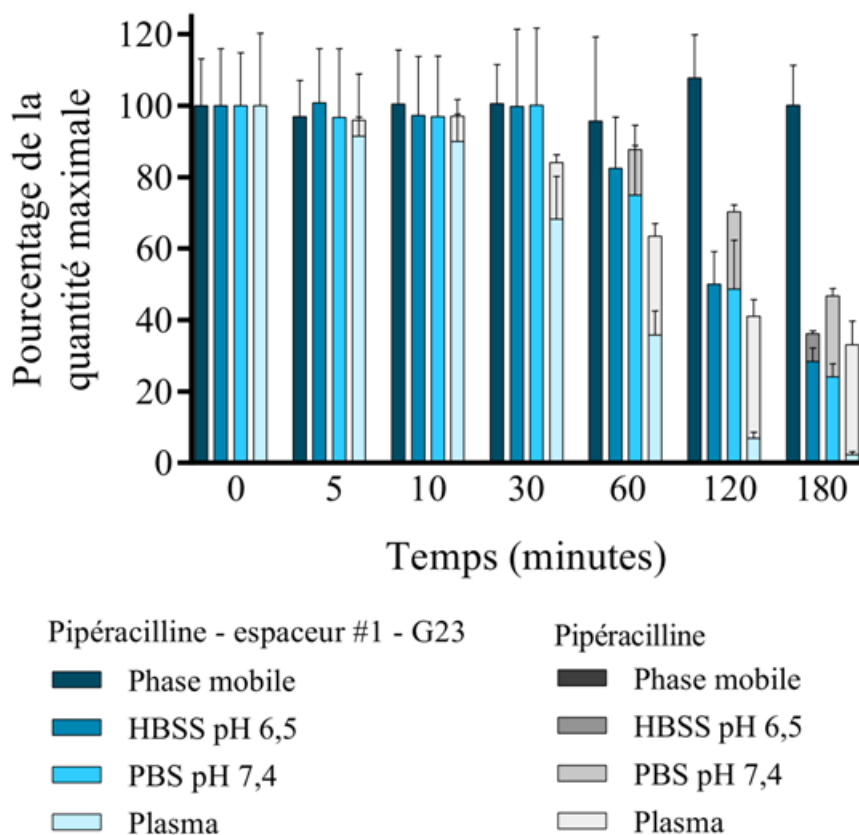


Figure 3.5 Stabilité pipéracilline - espaceur #1 - G23 lors du deuxième essai.

Comme avec l'espaceur #1, la pipéracilline - espaceur #2 - G23 présente une stabilité dépendante du pH (voir figure 3.6). Lors de la quantification, il a été observé que la solution mère était déjà en partie dégradée, puisqu'il y avait présence de pipéracilline dès le premier temps de prélèvement dans tous les milieux, incluant la phase mobile, indiquant une instabilité à l'entreposage rendant l'interprétation de ces résultats plus difficile. L'histogramme empilé montre également une perte de composé en métabolites inconnus puisque le 100 % de l'addition des deux molécules suivies n'est pas conservé.

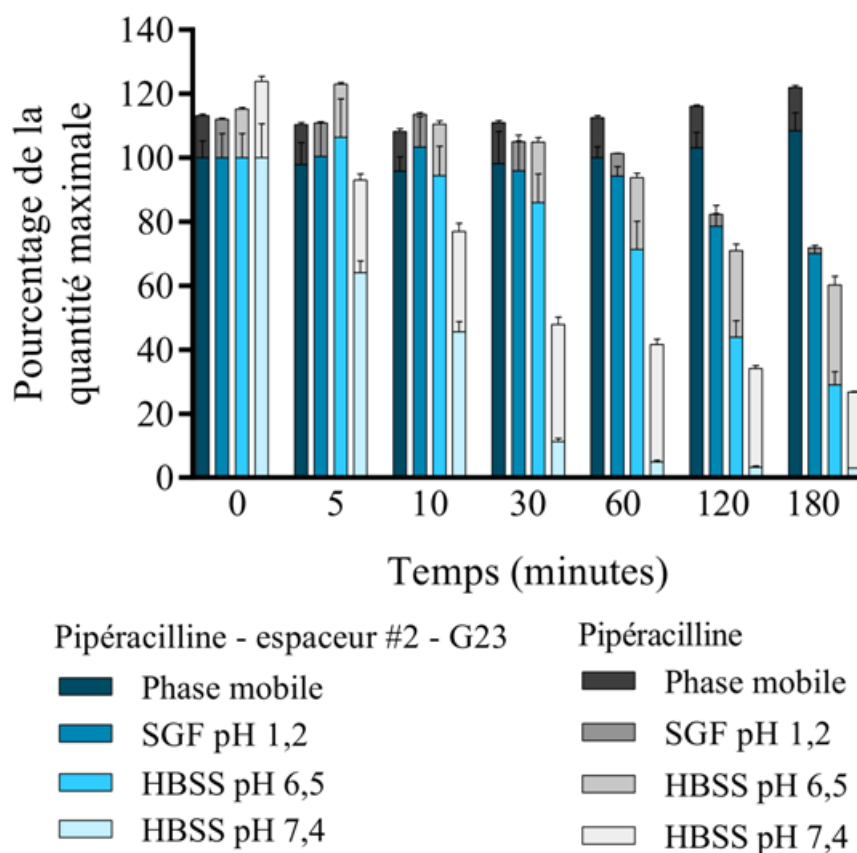


Figure 3.6 Stabilité pipéracilline - espaceur #2 - G23.

Lors des essais de stabilité du peptide G23 seul, une erreur de manipulation a entraîné un changement dans les temps de prélèvements de plus, un manque de plasma a empêché l'analyse dans ce milieu et l'essai sera réalisé ultérieurement. Par contre, il a été observé que le peptide se dégradait plus rapidement à pH neutre (50 % restant) qu'à pH acide (85% restant) (voir figure 3.7).

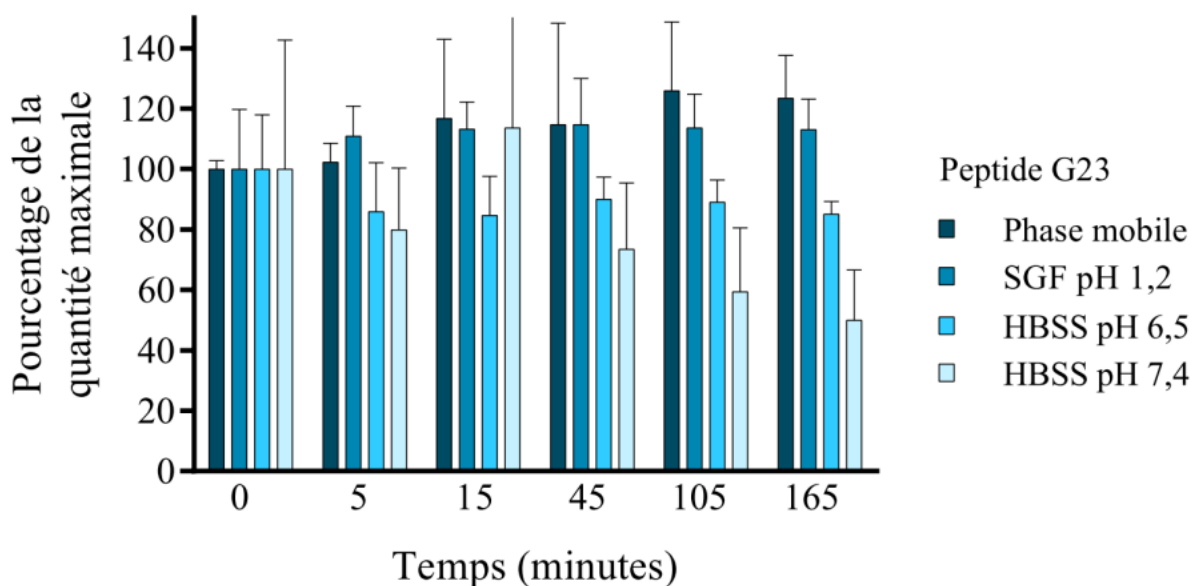


Figure 3.7 Stabilité du peptide G23.

### 3.4 Discussion

Des méthodes analytiques ont été développées pour différents antibiotiques injectables pouvant entrer dans la composition du promédicament. La pipéracilline a été retenue pour la preuve de concept puisque cette molécule est relativement stable, peu complexe et facile à quantifier en comparaison au méropénem, à la vencomycine et à la ceftriaxone respectivement. Les essais de stabilité ont donc été réalisés sur les dérivés intermédiaires et finaux de la pipéracilline soit la pipéracilline - espaceur #1 et la pipéracilline - espaceur #1 et #2 - G23.

Les résultats obtenus avec l'intermédiaire pipéracilline - espaceur #1 allaient dans le sens de la deuxième hypothèse, soit que le promédicament une fois absorbé pourrait être métabolisé pour relâcher la molécule active seule. Par contre, la molécule complète incluant le peptide ne s'est pas métabolisée entièrement en pipéracilline, créant ainsi des métabolites inconnus. L'instabilité du peptide seul pourrait être en cause et pour vérifier cette hypothèse, des essais de stabilité sur le peptide G23 ont été réalisés. Les résultats ont montré une dégradation importante à pH 7,4 pouvant expliquer la disparition de la pipéracilline - espaceur #1 - G23

sans l'apparition de pipéracilline. Par contre, pour confirmer cela, il faudrait réaliser des études de métabolisme plus poussées pour chercher les produits de dégradation et une recherche par HPLC-MS QTOF serait plus appropriée. En effet, cet appareil permet de trouver la masse exacte de tous les composés présents dans les échantillons, ce qui n'est pas possible avec l'appareil HPLC-MS/MS utilisé. Alors, suite aux essais de stabilité, les masses des différents métabolites seront recueillies et ainsi, par une analyse des structures, il sera possible d'établir l'endroit du clivage et de modifier la structure des composés synthétisés en conséquence.

De autre côté, la stabilité de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 a été testée à deux reprises puis les résultats ont montré une bonne stabilité dans le HBSS pH 6,5 lors du premier test, mais une dégradation dans ce même milieu lors du deuxième. Cela pourrait être dû à une fragilisation de la molécule, soit une augmentation de sa vitesse de dégradation, causée par le vieillissement de la solution mère et par le gel et le dégel de la solution. Un problème semblable a été observé avec la molécule composée de l'espaceur #2, une partie de la solution mère était déjà métabolisée en pipéracilline avant l'essai de stabilité, compliquant par conséquent l'analyse des résultats.

L'instabilité des solutions mères cause un problème du point de vue analytique que ce soit pour les essais de stabilité, pour l'évaluation de l'affinité ou de la perméabilité. Les solutions mères étant souvent réalisées avec tout le matériel disponible suite à la purification, il était alors difficile de compléter les essais avant leur dégradation, même conservées à -80 °C. Un effort sera donc apporté pour synthétiser de nouveaux promédicaments avec des espaceurs différents pour augmenter le volume de produit et être en mesure de réaliser les essais avec des échantillons frais. Par contre, d'un point de vue pratique, la molécule serait gardée sous forme sèche en tout temps avant l'utilisation, il faudrait donc éventuellement évaluer la stabilité des lots de promédicaments développés et conservés dans cette condition.

## Chapitre 4. Évaluation de l'affinité des promédicaments

### 4.1 Introduction

Dans le but d'évaluer le potentiel de liaison des promédicaments au GM1, trois méthodes ont été développées, soit la microcalorimétrie (ITC), l'essai immuno-enzymatique ÉLISA et la résonance plasmonique de surface (SPR). Ces trois méthodes ont servi à discriminer les peptides et les promédicaments liant le GM1 de ceux qui ne le lient pas et ce, rapidement, afin d'effectuer une présélection des molécules candidates et d'éviter de perdre du temps et des ressources dans les études de perméabilité cellulaire.

#### 4.1.1 Microcalorimétrie (ITC)

La microcalorimétrie ou titrage calorimétrique isotherme (ITC) est une méthode servant à mesurer directement l'énergie absorbée ou dégagée lors d'une interaction entre molécules (36-38). Cette méthode est largement utilisée, entre autres pour évaluer l'interaction entre deux molécules, comme entre un ligand et un récepteur ou entre une enzyme et un inhibiteur et pour observer la formation ou déformation d'assemblage complexe, comme la micellisation. Pour mesurer l'affinité de liaison, le principe de cette méthode est de titrer une solution contenant un ligand dans une solution contenant un récepteur et de mesurer les changements thermiques. Un seul titrage fournit à la fois la constante d'affinité ( $K_a$ ), la variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ), l'entropie ( $\Delta S$ ) et la stœchiométrie ( $N$ ).

La constante d'affinité ( $K_a$ ) représente la liaison à l'état d'équilibre, elle est égale à la concentration de ligands non liés lorsque la moitié des récepteurs sont occupés par le ligand. La variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) est la quantité de chaleur dégagée par mole de ligand lié au récepteur. Une variation d'enthalpie négative représente une réaction favorisant la liaison (36). L'entropie correspond au degré de désordre d'un système. Une entropie positive en microcalorimétrie caractérise souvent une réaction dirigée par une dispersion des molécules, soit une solvatation ou des réactions hydrophobes. La stœchiométrie ( $N$ ) représente le nombre de sites de liaison sur le récepteur (36).



Cette méthode d'évaluation de l'affinité est simple et pratique, puisqu'elle ne nécessite pas de dénaturation des composantes à l'étude que ce soit par l'ajout de marqueurs fluorescent ou radioactif par exemple. De plus, elle est assez sensible pour mesurer des affinités dans l'ordre du millimolaire au nanomolaire (36-38).

Cette méthode nécessite un appareil appelé microcalorimètre. Cet appareil est composé d'une chambre comprenant deux cellules. La première est une cellule test qui contient la molécule à l'essai (récepteur) et l'autre est une cellule de référence qui contient le tampon de dilution seulement. Des senseurs thermiques sont placés sur chacune de ces cellules pour enregistrer les variations de température. Des contrôleurs thermiques sont également placés sur les cellules pour les chauffer au besoin et ainsi moduler la température en réponse aux senseurs. La chambre est isolée de sorte que les changements de température d'une cellule n'affectent pas l'autre et que la température de l'environnement autour de l'appareil n'ait également aucun impact sur les mesures. Pour effectuer le titrage, l'appareil est muni d'une seringue équipée d'une canule assez longue pour plonger dans la solution de récepteurs. La canule se termine par une tête en hélice servant à agiter la solution dans la cellule test. À l'aide d'un logiciel, il est possible de contrôler le nombre d'injections désirées, le volume des injections, la durée des injections, le temps entre les injections, la vitesse de rotation de la canule, la température visée dans les deux cellules et d'autres paramètres utiles à l'analyse des résultats. De plus, lors du titrage, le logiciel enregistre la différence entre l'énergie apportée à la cellule test et celle apportée à la cellule référence nécessaire pour maintenir l'écart entre leur température le plus près possible de zéro (36-38).

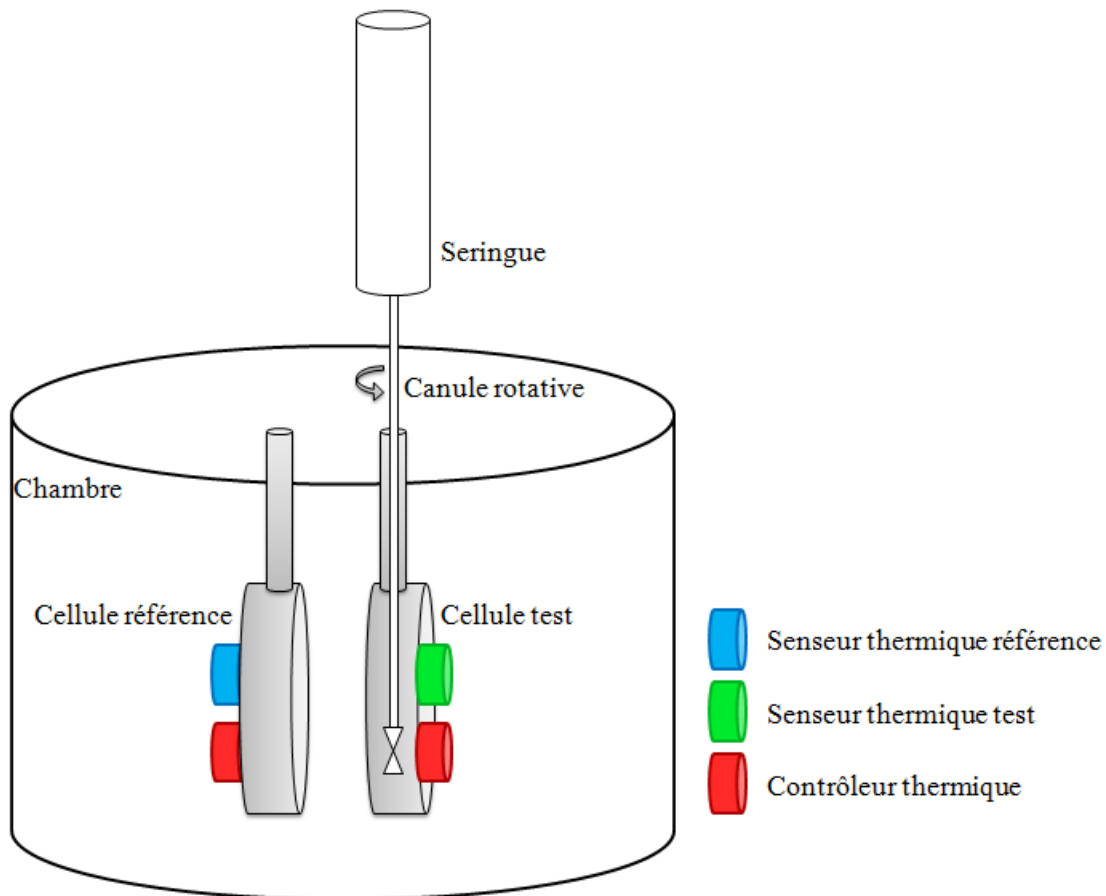


Figure 4.1 Représentation de l'appareil de microcalorimétrie adaptée de Milev S. (36).

Le test se déroule de la façon suivante. Une solution de récepteur est placée dans la cellule test, le tampon de dilution dans la cellule référence et une solution de ligand dans la seringue. Lors de la première injection, tous les ligands se lient aux récepteurs créant ainsi un dégagement ou une absorption de chaleur (selon la nature de l'interaction) qui modifie la température de la cellule test. Les senseurs captent une différence entre la température des deux cellules et le système ajuste l'énergie apportée à la cellule test pour rétablir un écart près de zéro. Un pic de forte intensité apparaît sur le graphique, puis il y a un retour à la ligne de base. Ensuite, une série d'injections sont réalisées jusqu'à ce qu'il y ait une saturation des récepteurs. Cette saturation est observable par la diminution des changements thermiques et donc la diminution de l'intensité des pics jusqu'à l'atteinte d'un plateau qui ne montre plus que les changements thermiques apportés par la dilution du ligand dans la solution de récepteur.

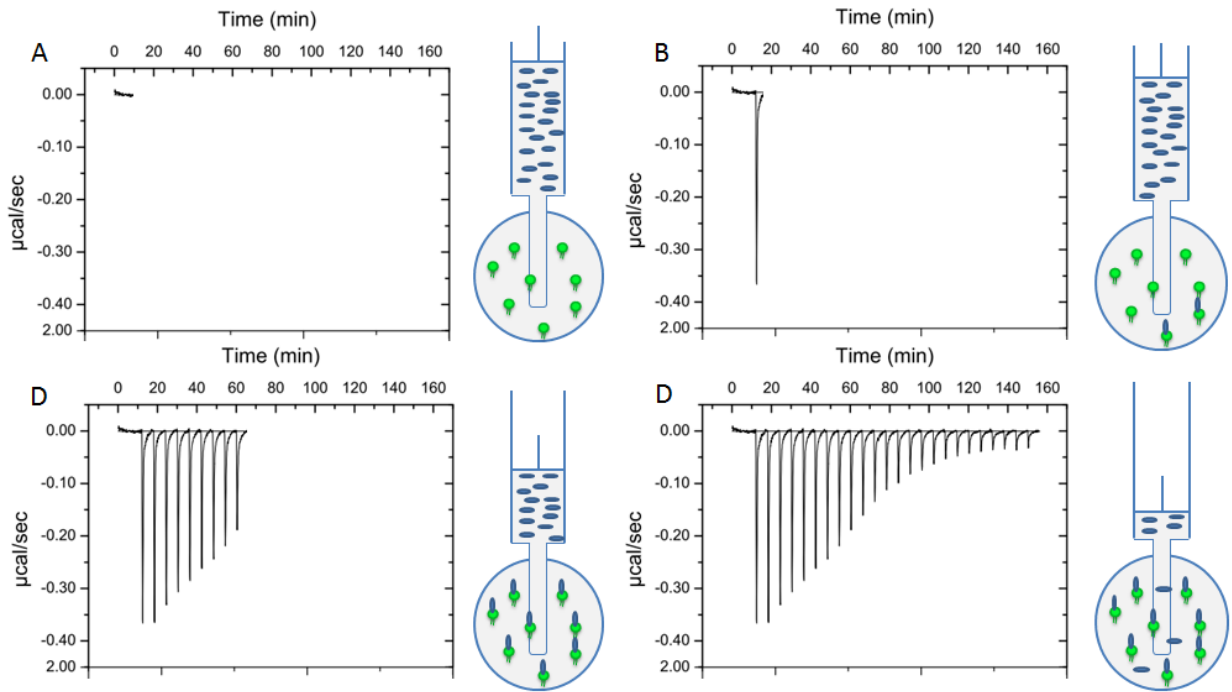


Figure 4.2 Exemple de titrage microcalorimétrique.

À partir du tracé final des changements thermiques dans le temps, il est possible d'intégrer chacun des pics. L'aire de ceux-ci est rapportée sur un nouveau graphique présentant l'énergie absorbée ou dégagée par quantité de ligands (en kcal/mole de ligand) en fonction du ratio molaire ligand-récepteur.

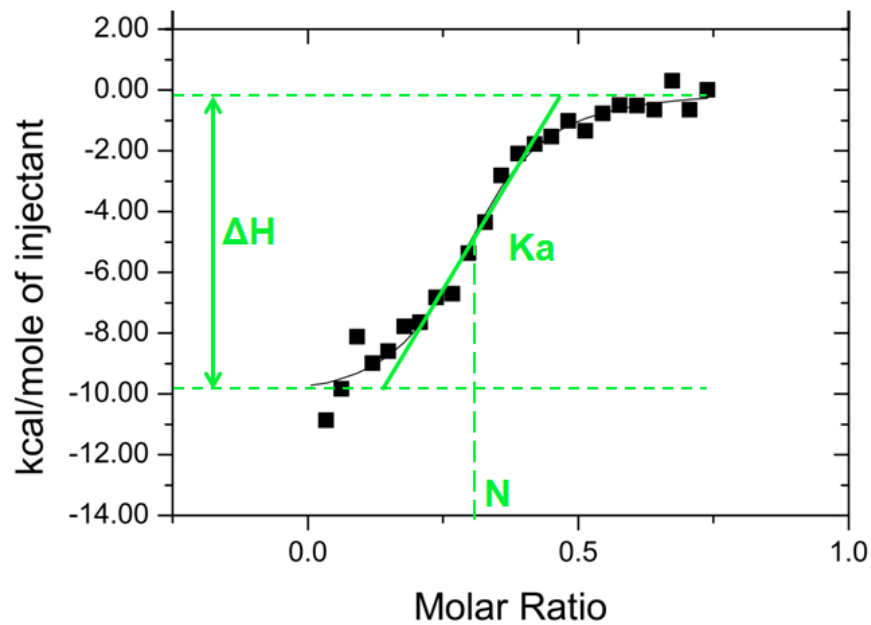


Figure 4.3 Exemple d'analyse des résultats de titrage microcalorimétrique.

Il est possible de transformer l'analyse dans le temps en analyse par la quantité, puisque les concentrations de ligand et de récepteurs, les temps et les volumes d'injections ainsi que les volumes totaux sont connus. Ensuite, un modèle de liaison peut être appliqué à la courbe en fonction du nombre de sites de liaison prévus. La pente au point d'inflexion de la courbe sigmoïde représente la constante d'affinité ( $K_a$ ). Le ratio molaire à ce point représente la stœchiométrie ( $N$ ) et la différence entre le plateau inférieur et le plateau supérieur de la courbe représente la variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ).

#### 4.1.2 Méthode immuno-enzymatique ÉLISA

La méthode ÉLISA (de l'anglais enzyme-linked immunosorbent assay) est une technique biochimique largement utilisée pour la détection d'anticorps ou d'antigènes. Elle est souvent appliquée pour les diagnostics médicaux, pour l'industrie alimentaire ainsi que pour la recherche. Cette méthode peut également servir à évaluer l'affinité entre un ligand et un récepteur.

Les quatre principaux types d'essais sont l'ÉLISA direct, indirect, compétitif et sandwich.

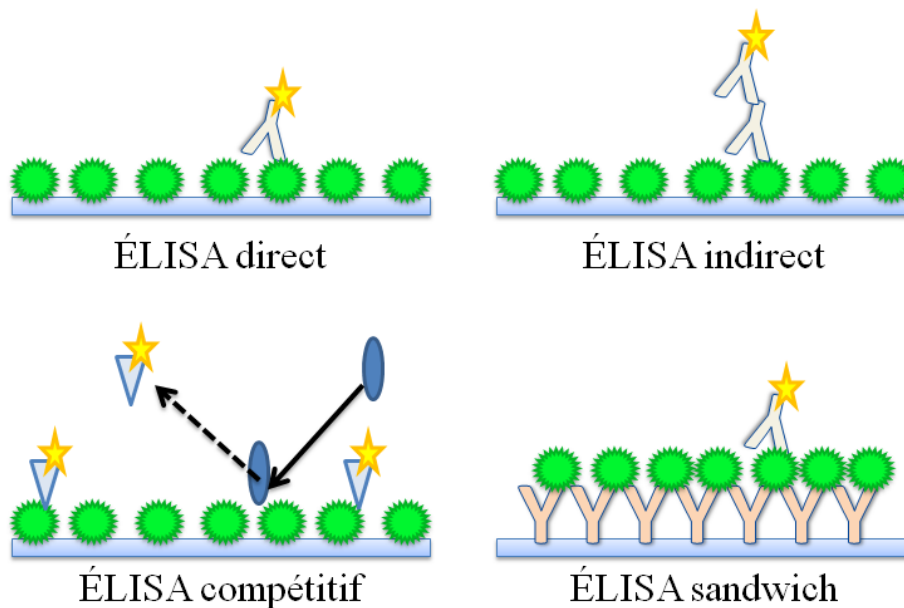


Figure 4.4 Les principaux types d'essais ÉLISA.

Le test ÉLISA direct consiste à attacher un antigène sur une phase solide, au fond d'un puits par exemple, et d'y ajouter un anticorps possédant un marqueur enzymatique pour la détection. Le principe de l'ÉLISA indirect est le même, sauf que deux anticorps sont ajoutés. Le premier

est spécifique à l'antigène et ne possède pas de marqueur enzymatique et le deuxième est spécifique au premier anticorps et est marqué. Ces essais peuvent servir à détecter la présence d'un antigène dans un prélèvement biologique, plus il y en aura, plus le signal sera intense. Ils peuvent aussi servir à évaluer l'affinité entre un ligand et un antigène, plus l'affinité est forte plus il y a de ligands liés et plus le signal est intense. L'ÉLISA compétitif est différent. Il sert à évaluer la capacité d'un ligand à en déplacer un autre sur l'antigène. Le ligand à l'étude n'est pas marqué et il est en compétition avec un autre ligand qui lui possède un marquage enzymatique. Alors, plus le ligand à l'étude a une forte affinité avec l'antigène, plus le signal diminue. Enfin, l'ÉLISA en sandwich est comme l'ÉLISA direct, mais avec une maximisation de la liaison de l'antigène sur la surface solide. Pour ce faire, un anticorps est préalablement lié à la surface et ensuite l'antigène est ajouté. L'antigène lie le premier anticorps et un second anticorps de détection est ajouté (39).

La détection se fait souvent par l'ajout d'une solution contenant un substrat spécifique à l'enzyme marquant l'anticorps utilisé. La réaction chimique entre les deux parties entraîne une coloration du milieu et la détection peut être faite par absorbance.

### **4.1.3 Résonance plasmonique de surface (SPR)**

La résonance plasmonique de surface est une méthode basée sur des principes physiques d'ondes et de réflexion. Cette méthode consiste à faire passer une solution contenant un ligand à la surface d'une puce de verre recouverte d'une mince couche d'or, elle-même recouverte du récepteur à l'étude. La liaison du ligand au récepteur est observée en temps réel puisque le signal obtenu est proportionnel à la masse à la surface de la puce. Cette méthode est très sensible et peut détecter des modifications de masses dans l'ordre du picogramme (40).

De façon simplifiée, le système est d'abord composé d'une source lumineuse monochromatique et d'un polariseur. La lumière qui n'est pas polarisée dans le plan de la surface ne contribue pas au signal SPR et ne fait qu'augmenter le bruit de fond. La lumière polarisée projetée sur la puce est réfléchiée et un détecteur à photodiode capte le rayonnement et le transforme en signal électrique.

Les principes physiques derrière cette méthode sont les suivants. Une lumière polarisée traversant une surface de verre est d'une part réfractée et d'autre part réfléchi. Selon l'angle de contact de la lumière incidente et selon les propriétés de la surface et des milieux de part et d'autre de la surface, la lumière peut être totalement réfléchi. Ce phénomène est appelé réflexion interne totale (TIR). Lorsqu'il y a TIR, les photons réfléchis créent un champ électrique à la face opposée de la surface appelé onde évanescente. Cette onde possède la même longueur d'onde que la lumière incidente (41).

Pour les essais SPR, une couche d'or (riche en électron libre) est déposée sur la face externe du verre. En conditions de TIR, il se produit une excitation des plasmons de surface où l'énergie des photons de la lumière incidente est transférée aux électrons libres de la surface d'or entraînant une diminution de l'intensité de la lumière réfléchi. Dans ce cas, l'angle auquel la TIR se produit est appelé angle de résonance ou angle SPR. Il varie selon les propriétés optiques du système utilisé, entre autres selon la longueur d'onde de la lumière incidente et aussi selon l'indice de réfraction d'une part et d'autre de la surface d'or. L'indice de réfraction est propre aux différents milieux et varie avec lorsqu'une masse est ajoutée à la surface externe (40, 42). Cet indice peut aussi être affecté par la température(43).

Certains appareils fonctionnent par angle de résonance et d'autres par longueur d'onde de résonance. Les appareils fonctionnant par angle de résonance possèdent une source de lumière incidente à angles multiples, mais à longueur d'onde fixe. Pour ces appareils, l'ajout de masse sur la surface augmente l'angle incident nécessaire pour qu'il y ait TIR. Les appareils fonctionnant par longueur d'onde de résonance possèdent un angle fixe, mais de multiples longueurs d'onde de lumière incidente. Un ajout de masse à la surface entraîne une augmentation de la longueur d'onde nécessaire pour qu'il y ait TIR (41).

En résumé, ce qui est recherché c'est l'angle ou la longueur d'onde à laquelle l'intensité de la lumière réfléchi est la plus faible. Cette valeur d'angle ou de longueur d'onde varie de façon proportionnelle à la masse à la surface d'or. Donc, l'analyse se fait en injectant d'abord une solution tampon seule, pour établir l'angle ou la longueur d'onde de base. Ensuite, une série de ligands à concentrations croissantes est injectée sur la surface, puis l'augmentation de l'angle

ou de la longueur d'onde nécessaire est observée, jusqu'à ce qu'il y ait atteinte d'un plateau, signifiant que la surface est saturée.

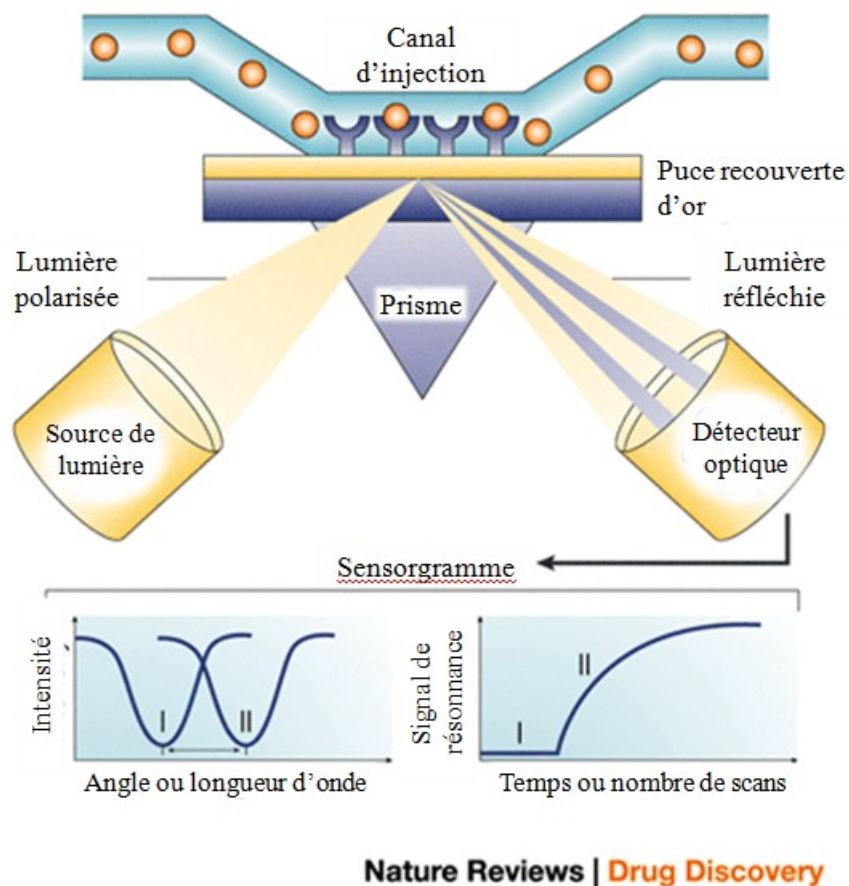


Figure 4.5 Représentation d'un appareil SPR. Image traduite de Cooper MA. (44) avec permissions.

## 4.2 Matériel et méthodes

### 4.2.1 Essais microcalorimétriques (ITC)

#### 4.2.1.1 Matériel

Le microcalorimètre utilisé pour les essais ITC est le Microcal VP-ITC muni de la pompe ThermoVac (Malvern Instruments Limited, Malvern, Royaume-Uni). Le pH-mètre utilisé est le Accumet AP61 avec une électrode Orion de Fisher Scientific (Burlington, Canada). Les peptides testés sont les suivants: KP3 (séquence: *KVWRLAPPFSNRLLP*) (Université McGill,

Montréal, Canada), P3 (séquence: *VWRLAPPFSNRLLP*) et P3C (séquence: *VWRLAPPFSNRLIPC*, Lot: CY-770) (ChinaPeptides Co.,Ltd., Shanghai, China), G23 (séquence: *HLNILSTLWKYRC*, Lot: P150128-ML286977) et G23R (randomisé) (séquence: *HISHLNRYRTWLC*, Lot: P150326-LC444958) (Biomatik, Cambridge, Canada). Le ganglioside GM1 sodique lyophilisé provenant de cerveau bovin a été acheté chez Santa Cruz (Dallas, États-Unis).

Quatre tampons ont été utilisés pour réaliser les essais d'affinité, d'abord le PBS 1x pH 7,4 (dilution du PBS 10x dans l'eau MilliQ) et ensuite le HBSS 1x pH 7.4, 6.5 et 5.5. Celui à pH neutre est la solution directement achetée par le fournisseur et les deux à pH plus acide ont été obtenus en ajoutant 25 mM de MES et en ajustant le pH avec du NaOH 1N. Les tampons de dilution, PBS 10 x et HBSS 1 x proviennent de Life technologies Inc. (Burlington, Canada). Le MES (acide morpholineéthanesulfonique) a été acheté chez Sigma-Aldrich (Oakville, Canada) et l'hydroxyde de sodium 1N chez Thermo Fisher scientifique (Burlington, Canada).

#### **4.2.1.2 Protocole**

Différentes études ont rapporté l'affinité entre la toxine du choléra et le ganglioside GM1 par microcalorimétrie (45, 46). Dans l'une d'elles, les chaînes lipidiques du GM1 ont été retirées grâce à une enzyme (céramide glycanase) et dans l'autre, le GM1 a été intégré dans des liposomes. L'enzyme en question n'étant plus disponible et les essais avec les liposomes entraînant un bruit de fond trop intense, les essais ont été réalisés avec le GM1 complet qui de par ses chaînes hydrophobes, forme des micelles en solution. Ceci complique l'analyse des résultats est l'une des raisons pourquoi d'autres essais, où le GM1 est immobilisé sur un support solide, ont été développés.

Le protocole typique pour chaque essai ITC est le suivant, par contre, pour les différents peptides ou promédicaments testés, une optimisation des concentrations a été nécessaire dans le but d'obtenir une courbe sigmoïde couvrant la liaison jusqu'à la saturation des récepteurs. D'abord, le peptide ou le promédicament et le GM1 ont été mis en solution dans le tampon, à 100  $\mu$ M et 25  $\mu$ M respectivement. Ensuite, les échantillons ont été chauffés à 25°C et dégazés à l'aide de la pompe ThermoVac. La chambre référence a été remplie avec le tampon seul et la chambre test avec la solution de GM1. La seringue a été à son tour remplie avec la solution de



peptide ou de promédicament et la canule a été insérée dans la chambre test. Les paramètres relatifs aux injections sont demeurés constants pour toutes les études après le développement initial de la méthode, ils sont listés dans le tableau XIIV. Préalablement, un autre essai a dû être réalisé, soit le titrage du peptide ou du promédicament dans le tampon seul. Cet essai a servi de ligne de base pour tenir compte de tout changement thermique pouvant provenir de la dilution. Les résultats de la dilution ont été soustraits du test d'affinité. De plus, des essais où le tampon seul a été titré dans le GM1 ont également été réalisés, pour évaluer l'impact de la dilution des micelles.

Tableau XIIV. Paramètres optimisés de la méthode microcalorimétrique.

<b>Température de la chambre</b>	25 °C
<b>Nombre d'injections</b>	25
<b>Volume d'injection</b>	10 µL
<b>Temps d'injection</b>	20 sec
<b>Délais entre les injections</b>	360 sec
<b>Vitesse d'agitation</b>	351 rpm
<b>Énergie de référence</b>	15 µcal/sec

## 4.2.2 Essais immuno-enzymatique ÉLISA

### 4.2.2.1 Matériel

Les essais ÉLISA ont été réalisés sur des plaques 96 puits EIA/RIA (forte liaison) (Fisher scientifique, Burlington, Canada) pour augmenter la liaison du GM1 à la surface. La solution de révélation Ultra-TMB ÉLISA (200 mL) et le Tween 20 ont été achetés chez Fisher scientifique (Burlington, Canada). La sous-unité B de la toxine du choléra (CTB) ainsi que l'albumine de sérum bovin (BSA) ont été achetées chez Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). La CTB liée avec la peroxydase de raifort (CTB-HRP) a été achetée chez deux fournisseurs (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada et Life technologies, Burlington, Canada). L'éthanol provient d'Alcool de commerce (Boucherville, Canada). Les tampons, les peptides et le GM1

utilisés sont les mêmes que pour les essais ITC. Le lecteur de plaque utilisé est le Safire (Tecan, Morrisville, États-Unis).

#### 4.2.2.2 Protocole

Le type d'essai ÉLISA réalisé pour définir l'affinité entre le GM1 et les peptides ou promédicaments est un ÉLISA compétitif. Le GM1 étant fixé au support solide, la compétition a lieu entre le peptide ou le promédicament et la sous-unité B de la toxine du choléra fonctionnalisée avec une peroxydase de raifort (Horseradish peroxidase, HRP) (CTB-HRP). Cet essai a été rapporté dans plusieurs articles (31, 47-49), entre autres, dans l'étude de Matsubara, FEBS letter, 1999 (31) pour l'évaluation de l'affinité entre le peptide P3 et le GM1.

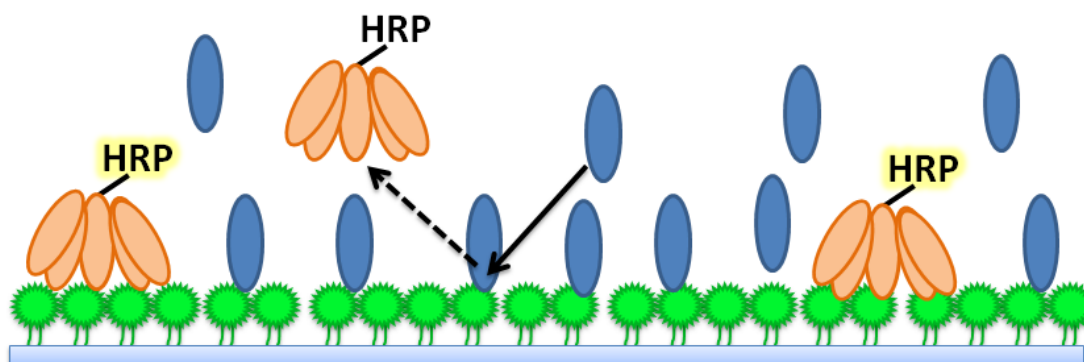


Figure 4.6 ÉLISA compétitif entre la CTB-HRP et le peptide pour le GM1.

Les essais ÉLISA ont été réalisés en 8 étapes typiques. Étape 1: adhésion du GM1. Le GM1 a été dilué dans de l'éthanol à typiquement 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et 100  $\mu\text{L}$  de cette solution ont été déposés dans tous les puits tests. Dans les puits contrôles, 100  $\mu\text{L}$  d'éthanol seul ont été déposés. Les plaques ont ensuite été laissées à température pièce pour la nuit dans le but d'évaporer l'alcool et de faire adhérer le GM1 à la surface des puits. Étape 2: blocage des sites non spécifiques. 300  $\mu\text{L}$  d'une solution de BSA (3 %) dans le tampon (PBS 1x ou HBSS 1x) ont été ajoutés aux puits pour bloquer les sites non spécifiques de liaison sur le plastique. Cette solution a été typiquement laissée durant 3 heures dans les puits. Étape 3: rinçage. Les puits ont été rincés 3 fois avec une solution de tampon + 0,5 % Tween 20. Étape 4: compétition. Des solutions de concentrations croissantes en peptide (0,1 - 100000 nM) ou en CTB (0,002155 - 21,55 nM)

mélangées à la CTB-HRP à concentration fixe (0,776 nM) ont été ajoutées dans les différents puits en triplicata et ont été incubées 3h à température ambiante. La CTB-HRP a également été incubée seule à la même concentration dans d'autres puits pour servir de référence (concentration en peptide nulle). Étape 5: rinçage. Les puits ont été rincés 3 fois avec une solution de tampon + 0,5 % Tween 20. Étape 6: révélation. La solution révélatrice Ultra-TMB ÉLISA (100 µL) a été ajoutée à tous les puits et incubée 10 minutes. À cette étape, les puits ont été colorés en bleu grâce à l'oxydation de la 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) par la peroxydase. Étape 7: arrêt. La réaction a été arrêtée en ajoutant 100µL d'une solution d'acide sulfurique (0,5 M). Les puits ont alors pris une coloration jaune. Étape 8: lecture des plaques. L'absorbance des puits a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque.

Plusieurs paramètres ont été modifiés lors de l'optimisation de ce test afin d'obtenir un déplacement de la CTB-HRP par les peptides. Plusieurs concentrations de la solution de GM1 ont été testées, soit entre 0,1 ng/mL et 100000 ng/mL. Deux concentrations en BSA (3 et 5%) ainsi que deux temps d'incubations (3heures et une nuit) ont été testés pour optimiser le blocage des sites non spécifiques. La concentration en CTB-HRP a aussi été optimisée (0,0776 - 1,552 nM). Enfin, les temps d'incubations lors de la compétition ont été variés (1h - une nuit) et des essais ont également été réalisés en incubant le peptide d'abord et la CTB-HRP ensuite et inversement au lieu de simultanément.

Les contrôles négatifs utilisés sont d'abord les puits non recouverts de GM1 et également les puits incubés avec la CTB-HRP à concentration fixe et avec des concentrations croissantes de peptide randomisé, donc n'ayant pas d'affinité pour le GM1. Les contrôles positifs sont les puits incubés avec la CTB-HRP à concentration fixe et avec des concentrations croissantes en CTB sans marqueur. Lors de tous les essais, la CTB devait arriver à déplacer la CTB-HRP, sinon l'essai était considéré invalide.

Pour l'analyse des résultats, les absorbances des puits incubés avec les différentes concentrations en peptide ou en promédicament ont été rapportées en pourcentage du contrôle, soit le puits incubé seulement avec la CTB-HRP, donc possédant l'absorbance la plus élevée (100 %). Ensuite, la moyenne et l'écart type des pourcentages ont été calculés à partir du

triplicata et un graphique a été généré. Ce graphique montre le pourcentage moyen d'absorbance en ordonnée et la concentration de peptide (nM) en abscisse. Pour faciliter l'évaluation visuelle du déplacement de la CTB-HRP par le peptide ou le promédicament l'abscisse du graphique a été transformée en logarithme de base 10. Par la suite, un modèle de liaison compétitive à un site de liaison a été appliqué pour tracer la courbe et l'IC50 a été calculé. Il est à noter qu'une courbe visuellement sigmoïde montre un déplacement de la toxine, d'où la perte de l'intensité de l'absorbance avec l'accroissement de la concentration en peptide. De plus, l'IC50 est la concentration au point d'inflexion de la courbe sigmoïde, elle représente la concentration nécessaire pour déplacer 50 % du substrat.

Puisque le but recherché avec les peptides et les promédicaments étudiés n'est pas de déplacer la toxine du choléra, mais plutôt de lier le GM1 pour être internalisé, les résultats obtenus sont plus qualitatifs que quantitatifs. Les IC50 obtenus peuvent être comparés entre les différents peptides et les promédicaments pour les classer selon l'intensité de leur affinité, mais ce chiffre ne correspond pas à une constante d'affinité en comparaison aux essais ITC et SPR.

### **4.2.3 Essais de résonance plasmonique de surface (SPR)**

#### **4.2.3.1 Matériel**

Les essais SPR ont été réalisés dans le laboratoire du professeur Jean-François Masson avec l'aide d'un étudiant à la maîtrise en chimie, Jérémie Labrecque Carbonneau. L'appareil SPR utilisé a été conçu au sein de ce laboratoire et les détails de la confection sont listés dans la publication de Zhao S. et al. (50). Les prismes ont été recouverts d'or, également dans le laboratoire. Les logiciels utilisés pour l'analyse des résultats sont MatLab (Version R2015a) de MathWorks (Massachusetts, États-Unis) et son application Toolbox Curve fitting pour modéliser les données avec l'équation de Langmuir. L'ODM a été acheté chez Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Les lipides POPC ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, États-Unis). Le chloroforme et le méthanol proviennent de Fisher scientifique (Burlington, Canada). Le peptide G23, le GM1, le HBSS et l'éthanol sont les mêmes qu'utilisé pour les essais ITC et ÉLISA.

#### 4.2.3.2 Protocole

Plusieurs articles ont porté sur l'évaluation de l'affinité entre la toxine du choléra et le ganglioside GM1 par SPR (51-56). La technique de fonctionnalisation des surfaces d'or est ce qui varie majoritairement d'une étude à l'autre. Les essais d'affinité entre les peptides et les promédicaments et le GM1 ont été réalisés en se basant sur l'article de Kuziemko dans *Biochemistry*, 1996 (52), en fonctionnalisant la surface d'or avec des liposomes incorporant le GM1.

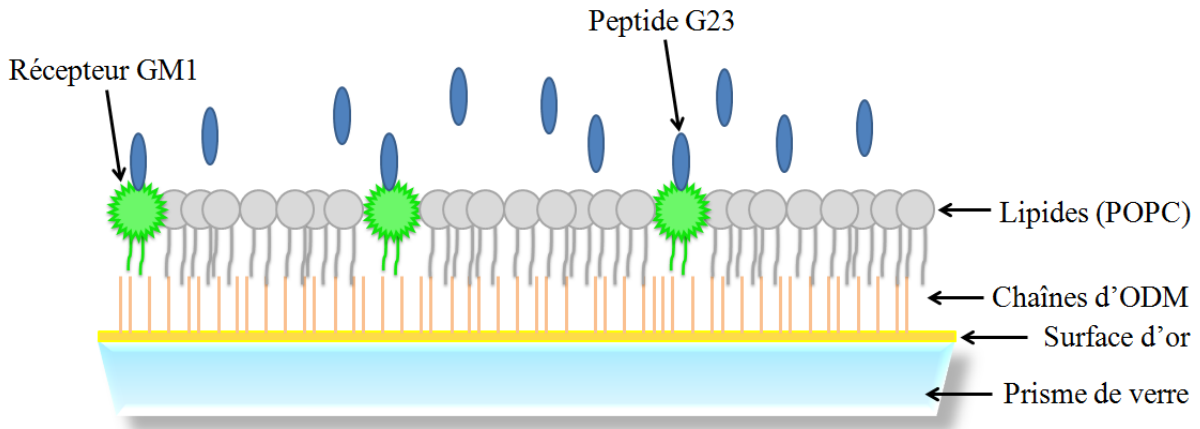


Figure 4.7 Représentation de la surface développée pour les essais SPR.

Les liposomes, composés de 95% POPC et 5% GM1 ont été formulés par la méthode Bangham (57). En résumé, une solution de POPC dans le chloroforme et une solution de GM1 dans le méthanol ont été mélangées dans un ballon et le solvant a été évaporé durant 1h à l'aide d'un évaporateur rotatif (50°C, 200 rpm, pression réduite). L'évaporation des solvants a formé un film lipidique à la surface interne du ballon. Ce film a été réhydraté avec le tampon (HBSS pH 6,5) (température ambiante, 15 minutes, 60 rpm) et la suspension a été agitée sur vortex 1 minute pour bien décoller les lipides. La taille des liposomes a ensuite été raffinée par une extrusion à travers un filtre de 400 nm. Il est à noter que la taille n'a pas été trop diminuée puisque des liposomes plus petits (100 nm) sont plus difficiles à ouvrir pour être déposés sur une surface solide. Les liposomes ont été dilués pour obtenir la concentration désirée en GM1 pour les essais SPR, soit de 25  $\mu$ M. Enfin, la taille des liposomes a été mesurée par diffusion

dynamique de la lumière (DLS) avec l'appareil Malvern Zetasizer NS. Les liposomes blancs servant de contrôle aux essais de liaison ont été préparés de la même façon, mais avec 100 % POPC.

La surface d'or des puces a préalablement été recouverte d'octadecyl mercaptan (ODM), avec une solution à 0,1% dans l'éthanol. L'ODM est une molécule possédant une chaîne hydrophobe et d'un groupement thiol. Le groupement thiol se lie à l'or laissant une couche de chaînes hydrophobe à la surface. La suspension de liposomes (300 µL) a été ajoutée et par interaction hydrophobe il y a eu réarrangement des lipides pour former une monocouche de POPC et de GM1 sur l'ODM. Cette étape a été réalisée dans l'appareil, alors il a été possible de suivre dans le temps la déposition de la couche lipidique. Lorsque la surface a été stabilisée (environ après 30 minutes), le surplus de matériel n'ayant pas adhéré à la surface a été rincé avec le tampon (800 µL). Ensuite, les solutions de peptide ou de sous-unité B de la toxine du choléra (300µL) à concentration croissante (100 - 100000 nM et 0,0431 - 431 nM respectivement) ont été injectées en série sur la surface, à 5 minutes d'intervalle, et la saturation de la liaison a été observée.

L'appareil a été conçu pour que les lectures soient faites en triplicata dans trois canaux différents recouvrant le prisme et la surface, donc les résultats obtenus sont la moyenne de ces trois lectures. L'analyse a été réalisée en rapportant d'abord les différences de longueurs d'onde d'un scan à l'autre, cette différence est appelée signal SPR et un premier graphique a été tracé avec en ordonnée les signaux SPR et en abscisse les nombres de scans. Ce graphique permet de visualiser en direct les phénomènes liés à l'ajout de poids sur la surface d'or lors de l'incubation avec le récepteur et aussi lors des injections de ligand. Les écarts entre les signaux SPR initiaux (avant une injection de peptide) et finaux (une fois le système stabilisé) sont appelés «Shift SPR». Ils ont été ramenés en fonction de la concentration en peptide injecté et une courbe isotherme de Langmuir a été tracée. Ensuite, la constante de dissociation du peptide a été calculée grâce aux équations suivantes:

Équation de Langmuir.

$$SPR Shift = \frac{k_a [G23]}{1 + (k_a [G23])} SPR Shift_{max} \quad (4.1)$$

Où SPR Shift représente l'écart entre le signal SPR du système au repos et celui après l'ajout de peptide G23 à une certaine concentration, [G23] est la concentration en peptide G23 ajoutée,  $K_a$  est la constante d'affinité et  $\text{SPR Shift}_{\text{max}}$  est l'écart maximal possible du signal SPR (saturation).

Équation de la relation entre  $K_d$  et  $K_a$ .

$$k_d = \frac{1}{k_a} \quad (4.2)$$

Où  $K_d$  représente la constante de dissociation et  $K_a$  la constante d'affinité.

## 4.3 Résultats

### 4.3.1 Essais microcalorimétriques (ITC)

Les molécules principales ayant été testées sont les peptides P3 et G23 seuls, les deux prototypes de promédicaments, pipéracilline - espaceur #1 ou #2 - G23 ou la sous-unité B de la toxine du choléra. Suite aux essais microcalorimétriques, ces composés ont été classés en deux groupes, soit ayant de l'affinité pour le GM1 ou n'ayant pas d'affinité pour le GM1.

Le peptide G23 ainsi que la pipéracilline - espaceur #2 - G23 ont démontré de l'affinité pour le GM1. En effet, le peptide G23 (100  $\mu\text{M}$ ) titré dans le GM1 (25  $\mu\text{M}$ ) a démontré des résultats reproductibles qui ont mené à une constante de dissociation moyenne de 448 nM (voir figure 4.8 et tableau XIV). De plus, ces essais ont rapporté une stoechiométrie moyenne de 0,243 et les variations d'enthalpie et d'entropie obtenues ont montré que le système était dans un état favorisant la liaison et que les changements thermiques n'étaient pas principalement dus à la dispersion des molécules.

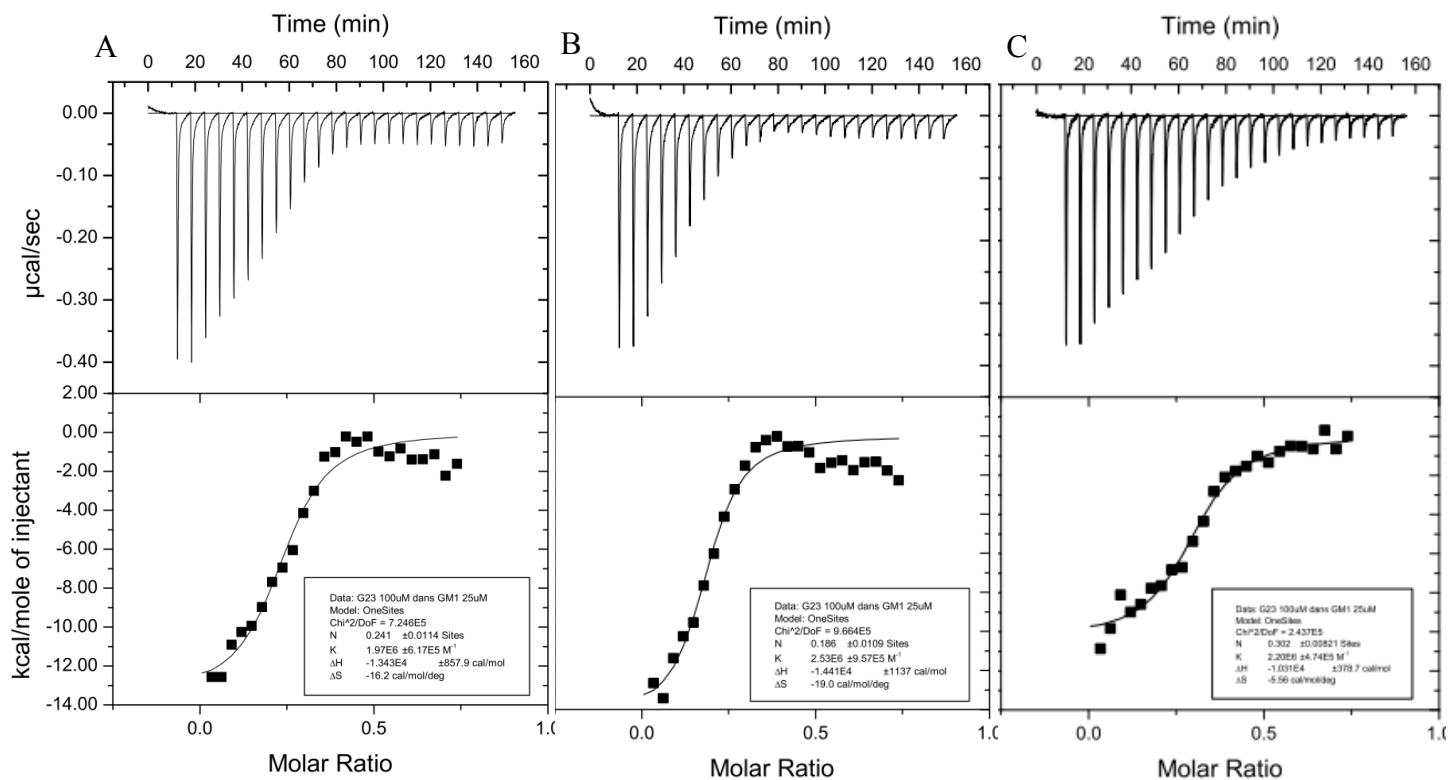


Figure 4.8 Résultats ITC du peptide G23 (100  $\mu\text{M}$ ) titré dans le GM1 (25  $\mu\text{M}$ ), soustrait par la dilution du G23 dans le tampon HBSS pH 6,5.

Tableau XIV. Constante d'affinité et de dissociation moyenne entre le peptide G23 et le GM1.

	Ka	Ka		Kd	Kd	
	Ka ( $\text{M}^{-1}$ )	Moyenne ( $\text{M}^{-1}$ )	Écart type ( $\text{M}^{-1}$ )	CV (%)	Moyenne (nM)	Écart type (nM)
1	$1.97 \times 10^6$					
2	$2.53 \times 10^6$	$2.23 \times 10^6$	$2.81 \times 10^5$	12.6	448	56.4
3	$2.20 \times 10^6$					



Les essais réalisés avec la pipéracilline - espaceur #2 - G23 ont mené à des graphiques confirmant une liaison avec le GM1 (voir figure 4.9), par contre, les essais ont rapportés des résultats moins reproductibles. En effet, l'intensité du signal diminuait d'une analyse à l'autre, ceci étant probablement causé par l'instabilité de cette molécule comme mentionnée plus tôt.

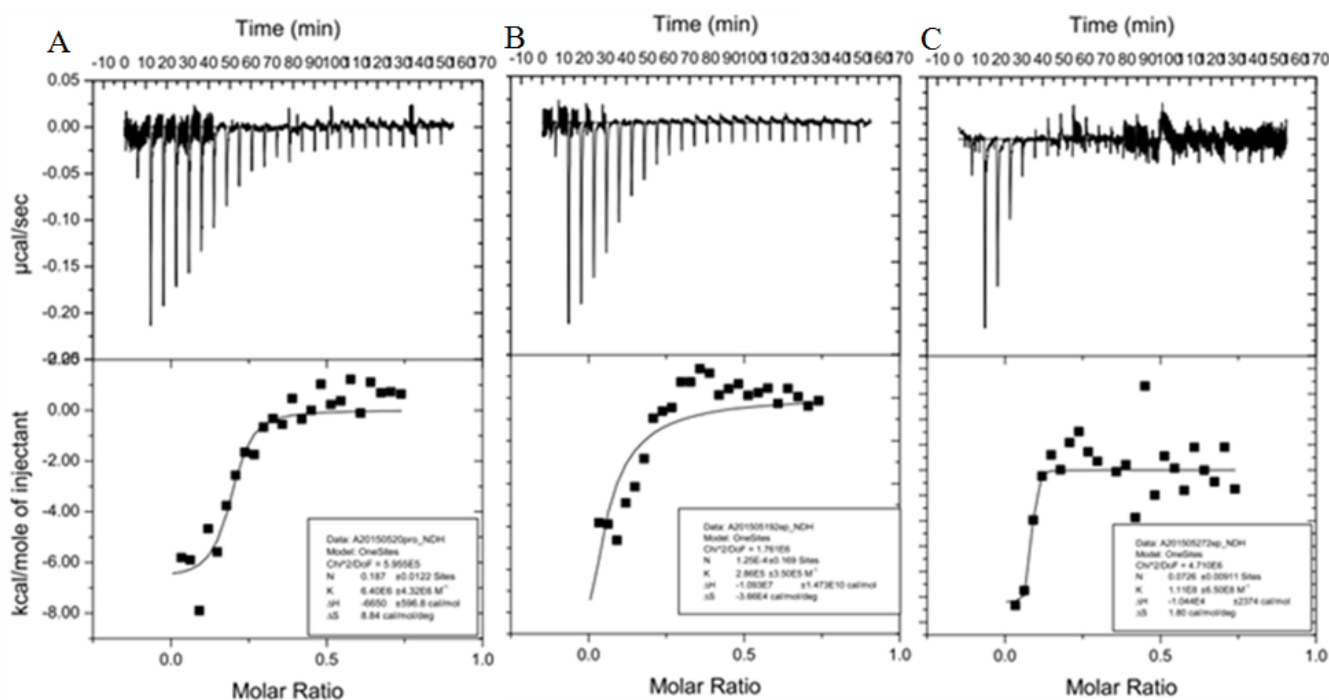


Figure 4.9 Résultats ITC de la pipéracilline - espaceur #2 - G23 (100  $\mu\text{M}$ ) titré dans le GM1 (25  $\mu\text{M}$ ).

D'un autre côté, le peptide P3, la pipéracilline - espaceur #1 - G23 (voir figure 4.10) et la sous-unité B de la toxine du choléra n'ont pas montré d'affinité pour le récepteur. Pour ce qui est de la CTB, le laboratoire disposait d'une quantité trop petite de cette protéine pour réaliser les essais ITC à des concentrations adéquates, alors le signal était probablement trop faible pour être observé. Par contre, lors des essais ÉLISA et SPR, la CTB a démontré une liaison au GM1.

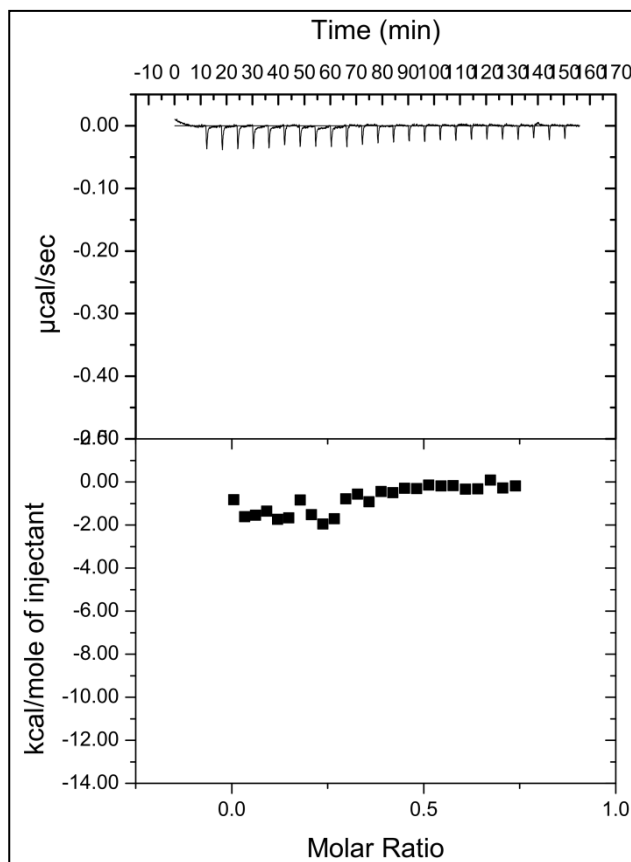


Figure 4.10 Résultats ITC de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 (100  $\mu\text{M}$ ) titré dans le GM1 (25  $\mu\text{M}$ ).

Ceci résume les résultats primordiaux des essais de microcalorimétrie. En revanche, beaucoup d'optimisation a été réalisée et d'autres molécules secondaires ont également été testées pour aider à la compréhension des résultats obtenus, notamment avec la pipéracilline - espaceur #1 - G23.

Plus en détail, un effort important d'optimisation de la méthode ITC a été investi au départ avec le peptide P3, sans toutefois apporter des résultats concluants. Par contre, dès le premier titrage avec le peptide G23, un signal important se démarquant de tout ce qui avait été observé avec le P3 a été produit. Les concentrations ont été variées pour obtenir le meilleur signal sinusoïde possible facilitant ainsi l'application du modèle mathématique à un site de liaison. Les titrages avec le G23 ont été répétés plusieurs fois dans le PBS pH 7,4 et dans le HBSS pH 6,5. L'affinité du peptide G23 avec le GM1 ayant été démontrée, des prototypes de promédicaments avec la pipéracilline ont été développés, d'abord avec un espaceur court (espaceur #1). Les essais d'affinité avec cette molécule ont montré une perte totale de l'affinité avec le GM1 .

La perte d'affinité pouvait être imputable directement à la liaison de la cystéine terminale du peptide avec l'espaceur ou encore à un repliement différent du peptide dû à la proximité de la pipéracilline. Pour investiguer cela, le peptide a été lié à l'espaceur #1 ayant préalablement réagi avec l'acide acétique au lieu de la pipéracilline. Cette molécule étant beaucoup plus petite que l'antibiotique aurait pu éviter d'affecter le repliement du peptide. Les résultats du titrage ITC ont montré un retour partiel de la liaison. Avec ce retour partiel de l'affinité, il était possible de s'attendre à ce qu'en éloignant la pipéracilline du peptide à l'aide d'un espaceur plus long il y ait également un retour de l'affinité. Ainsi, la pipéracilline - espaceur #2 - G23 a été synthétisée et titré dans le GM1. Comme anticipé, un retour du signal de liaison avec saturation a été observé. Les concentrations ont été variées pour observer le déplacement de la courbe et obtenir une saturation moins rapide. Le tableau XV présente un résumé des résultats obtenus à différentes conditions pour les multiples molécules testées.

Tableau XV. Résumé des essais microcalorimétriques.

Conditions	Résultats
<b>KP3</b>	
1. GM1 10 $\mu$ M dans KP3 1 $\mu$ M (37°C)	1. Signal équivalent à la ligne de base.
2. GM1 100 $\mu$ M dans KP3 10 $\mu$ M (37°C)	2. Signal équivalent à la ligne de base.
3. 10mM dans GM1 1mM (37°C)	3. Signal sinusoïdal (peptide en suspension à cette concentration, effet de dissolution).
<b>P3</b>	
4. 100 $\mu$ M dans GM1 10 $\mu$ M, PBS pH 7.4	4. Signal équivalent à la ligne de base.
5. 100 $\mu$ M dans liposomes GM1 10 $\mu$ M, PBS pH 7.4	5. Signal équivalent à la ligne de base.
<b>G23</b>	
6. 100 $\mu$ M dans GM1 10 $\mu$ M, PBS pH 7.4	6. Signal exothermique, saturation rapide.
7. 50 $\mu$ M dans GM1 10 $\mu$ M, PBS pH 7.4	7. Signal exothermique, avec saturation, mais faible intensité.
8. 100 $\mu$ M dans GM1 50 $\mu$ M, PBS pH 7.4	8. Signal exothermique, sans saturation.
9. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, PBS pH 7.4	9. Signal exothermique, avec saturation, bonne intensité.
10. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH 5.5	10. Signal exothermique, retour à la ligne de base suivi d'un 2e signal exothermique.
11. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	11. Signal exothermique, avec saturation, bonne intensité.
12. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH7.4	12. Signal exothermique, avec saturation, bonne intensité.
<b>P3C</b>	
13. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	13. Signal exothermique, suivi d'endothermique, d'un retour à la ligne de base et d'un autre signal endothermique.
<b>G23R</b>	
14. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	14. Signal exothermique, retour à la ligne de base suivi d'un 2e signal exothermique.
<b>Pipéracilline - espaceur #1 - G23</b>	
15. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	15. Signal équivalent à la ligne de base.
16. 100 $\mu$ M dans GM1 50 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	16. Signal équivalent à la ligne de base.
17. 10 $\mu$ M dans GM1 2,5 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	17. Signal équivalent à la ligne de base.
18. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH 6.5 (37°C)	18. Signal équivalent à la ligne de base.
19. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH 6.5 + 10%DMF	19. Signal équivalent à la ligne de base.
20. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, ACN:Eau (1:1)	20. Signal équivalent à la ligne de base.
<b>Acide acétique - espaceur #1 - G23</b>	
21. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	21. Signal exothermique, retour à la ligne de base suivi d'un 2e signal exothermique.
<b>Pipéracilline</b>	
22. 100 $\mu$ M + G23 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	22. Signal exothermique, avec saturation, bonne intensité.
23. 100 $\mu$ M dans G23 25 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	23. Signal équivalent à la ligne de base.
<b>Pipéracilline - espaceur #2 - G23</b>	
24. 100 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	24. Signal exothermique, saturation rapide.
25. 50 $\mu$ M dans GM1 25 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	25. Signal exothermique, saturation plus lente, perte d'intensité.
26. 100 $\mu$ M dans GM1 50 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	26. Signal exothermique, saturation plus lente, perte d'intensité.
<b>CTB</b>	
27. 1.72 $\mu$ M dans liposomes GM1 0.5 $\mu$ M, PBS pH 7.4	27. Signal endothermique équivalent au liposomes blanc.
28. 1 $\mu$ M dans GM1 0,1 $\mu$ M, HBSS pH 6.5	28. Signal équivalent à la ligne de base.

### 4.3.2 Essais immuno-enzymatique ÉLISA

Différents essais ÉLISA compétitifs ont été réalisés avec les peptides et la sous-unité B de la toxine du choléra. Dans tous les cas, la CTB était en mesure de déplacer la CTB-HRP, montrant que l'essai était réalisé adéquatement. Également dans tous les essais, le P3 n'a jamais démontré un déplacement de la CTB-HRP. Par contre, à une seule reprise, le peptide G23 s'est démarqué significativement du peptide P3. Cet essai avait été réalisé sur 4 plaques différentes, en triplicata dans chaque plaque, mais à partir des mêmes solutions de peptides. La figure 4.11 montre un exemple représentatif d'une des quatre plaques testées lors de cet essai.

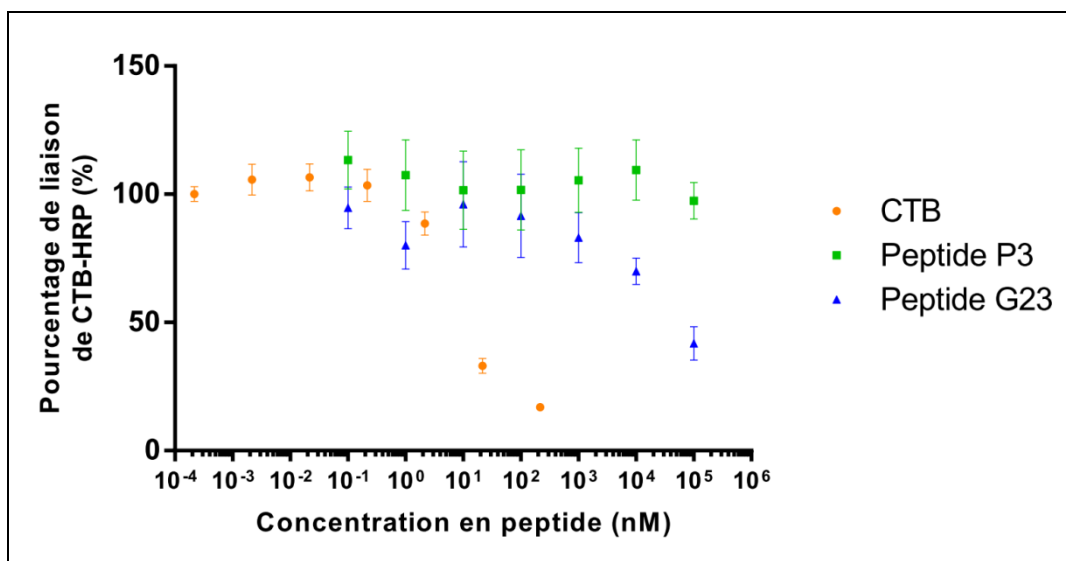


Figure 4.11 ÉLISA compétitif entre les peptides ou la CTB et la CTB-HRP.

Pour une raison encore indéterminée, tous les essais suivants réalisés dans les mêmes conditions ont faillit à montrer le déplacement de la CTB-HRP par le peptide G23, mais ont conservé le déplacement par la CTB (voir figure 4.12 et 4.13 pour deux exemples). L'essai a été optimisé à nouveau sans toutefois rapporter des résultats positifs, cette méthode a donc été mise de côté.

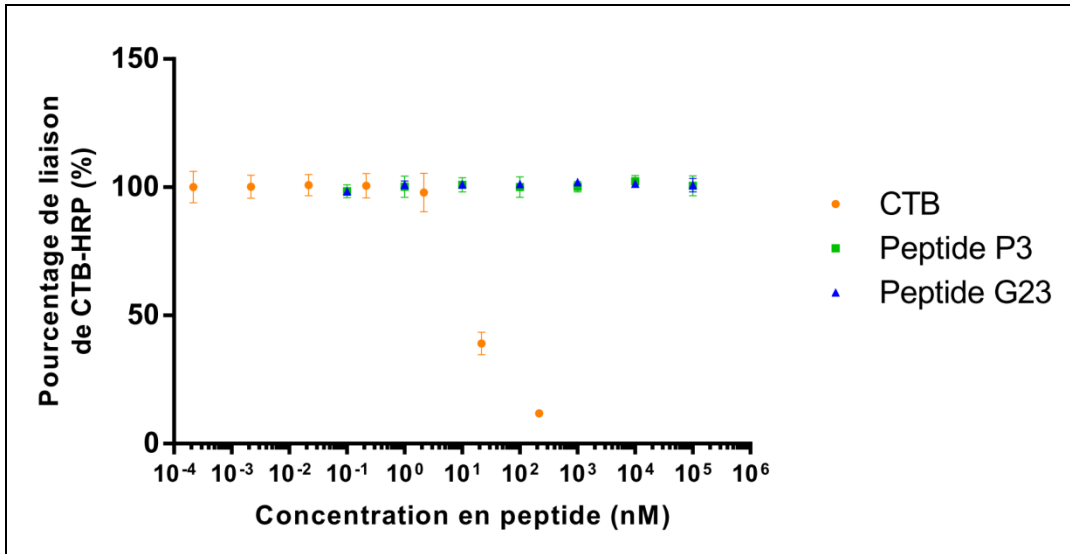


Figure 4.12 ÉLISA compétitif entre les peptides ou la CTB et la CTB-HRP.

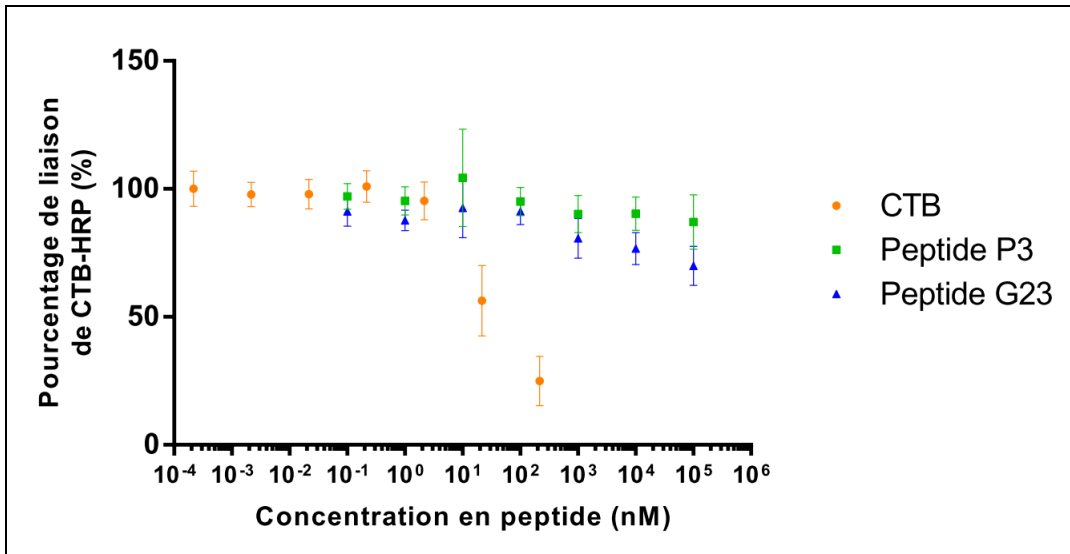


Figure 4.13 ÉLISA compétitif entre les peptides ou la CTB et la CTB-HRP.

### 4.3.3 Essais de résonance plasmonique de surface (SPR)

Les essais SPR ont été réalisés avec le peptide G23 et la sous-unité B de la toxine du choléra. Les résultats ont montré que le peptide G23 était capable de lier le récepteur GM1 avec une constante de dissociation de  $K_d = 36 \pm 3 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ). Dans la figure 4.14, il est possible d'observer l'adsorption du GM1 sur la monocouche d'ODM ainsi que la liaison du peptide sur le GM1 à chaque augmentation de concentration. La figure 4.15 montre la saturation des écarts de signaux SPR par l'augmentation de la concentration en peptide.

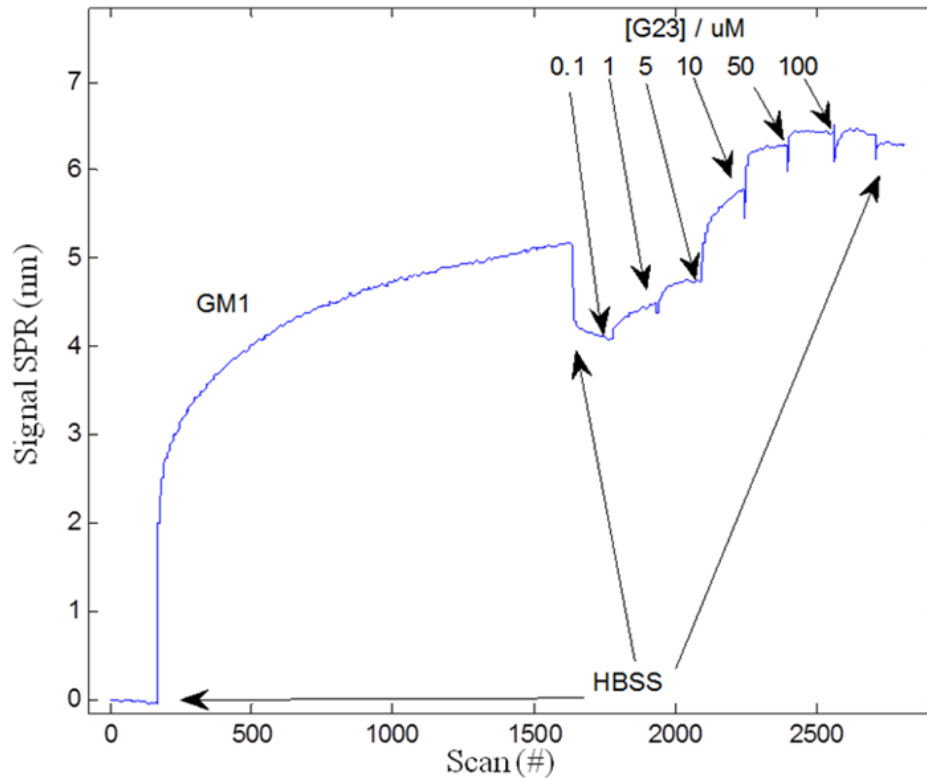


Figure 4.14 Signaux SPR obtenus avec le peptide G23

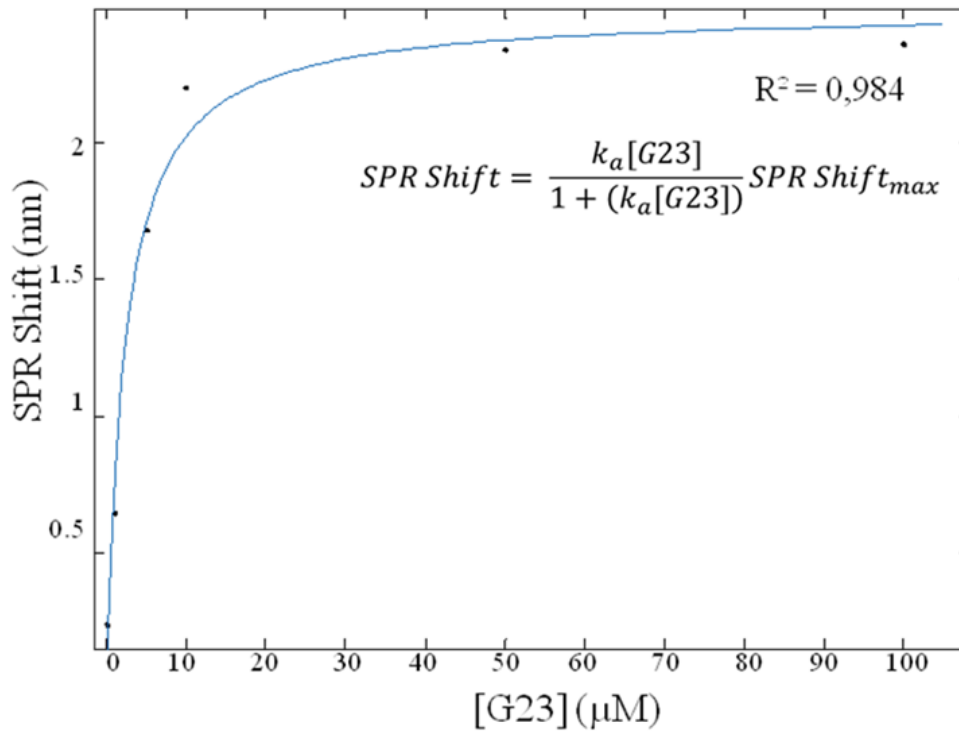


Figure 4.15 Shift SPR obtenus avec le peptide G23

L'essai réalisé avec la CTB a rapporté une constante de dissociation de  $K_d = 56 \pm 11$  nM ( $n=3$ ) et les figures 4.16 et 4.17 montrent les signaux SPR et les shift SPR respectivement.

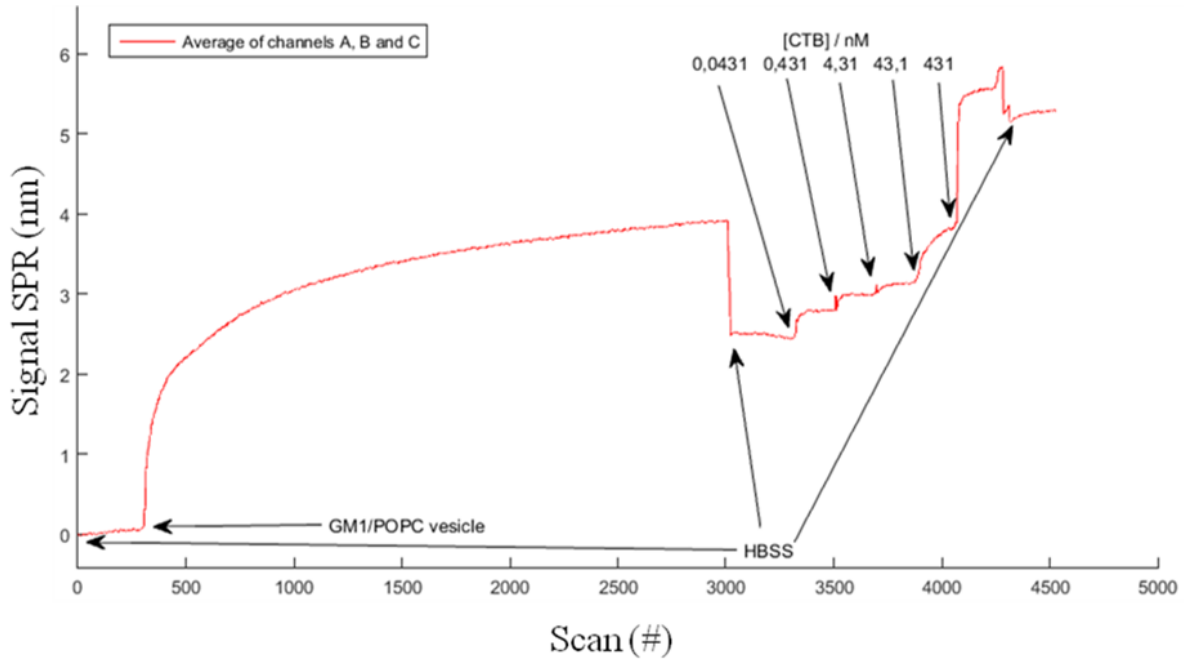


Figure 4.16 Signaux SPR obtenus avec la CTB

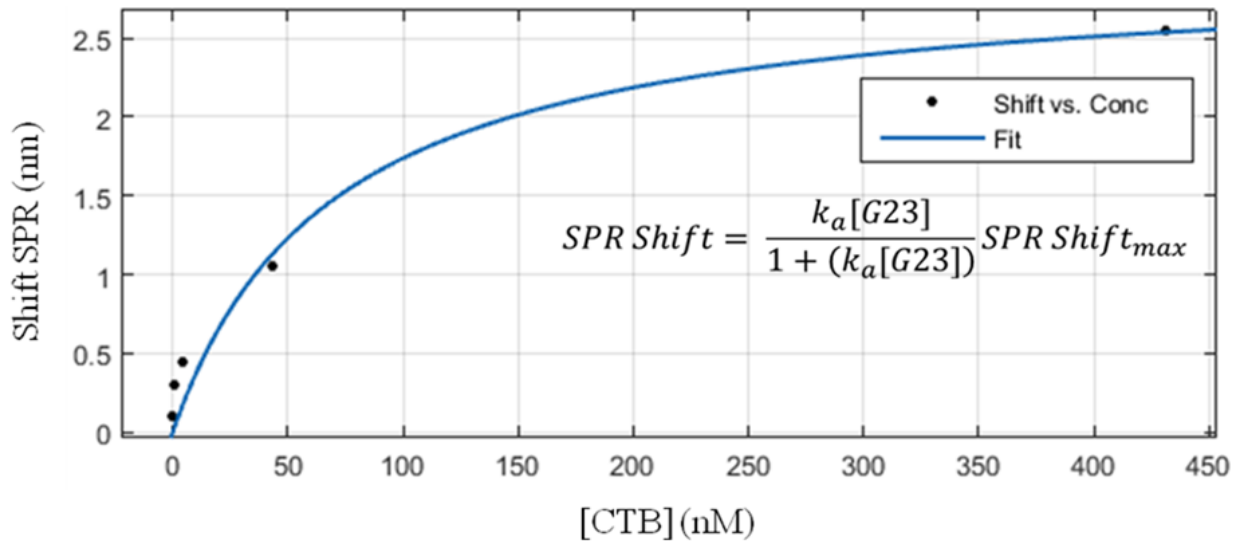


Figure 4.17 Shift SPR obtenus avec la CTB



## 4.4 Discussion

Les essais d'affinité ont permis d'orienter le choix du peptide avant de débiter la synthèse des promédicaments. Par l'essai microcalorimétrique, le peptide P3 a rapidement été écarté pour être remplacé par le G23. Ce dernier a montré sa capacité à lier le ganglioside GM1 dans au moins deux des trois méthodes, soit l'ITC et la SPR. Chaque méthode comportait des avantages et des inconvénients.

D'abord, la méthode microcalorimétrique avait l'avantage d'être simple et plutôt rapide. En effet, la préparation des échantillons et le titrage pouvaient être réalisés dans la même journée et plus d'un essai pouvait être fait par jour. De plus, aucun dérivé des molécules n'était nécessaire, alors les résultats montraient l'affinité des molécules intactes. Par contre, l'inconvénient majeur était que le récepteur utilisé formait des micelles en solution par ses chaînes lipophiles et sa tête polaire. Ceci a entraîné une surestimation des récepteurs disponibles pour la liaison avec le peptide, comme la stœchiométrie de la réaction ( $N < 1$ ) en a témoigné. Cette surestimation a engendré une baisse de la constante de dissociation et donc une surestimation de l'affinité.

Du côté de la méthode ÉLISA, l'avantage principal était qu'aucun instrument complexe n'était nécessaire pour réaliser l'essai. Plusieurs essais pouvaient donc être lancés simultanément sur différentes plaques et même plusieurs molécules pouvaient être analysées sur la même plaque en triplicata. Dans les conditions des essais réalisés, l'inconvénient principal a été la trop forte affinité entre la sous-unité B de la toxine du choléra liée à l'enzyme HRP et le récepteur GM1. Le compétiteur étant trop puissant grâce à ces cinq sous-unités de liaison, il a été impossible d'obtenir des résultats positifs et reproductibles avec les peptides monovalents aux concentrations utilisées.

La méthode SPR a semblé être la méthode la plus appropriée pour les essais d'affinité avec les molécules utilisées. En effet, en réponse à l'inconvénient de la méthode ITC, le récepteur dans cet essai était adsorbé sur une surface solide avec les têtes polaires (sites de liaisons) vers la surface et il était entouré de lipides comme dans l'environnement physiologique. De plus, la

méthode SPR s'est avérée assez sensible pour évaluer la liaison de la sous-unité B de la toxine du choléra à de faibles concentrations. Également, en comparaison avec l'essai ÉLISA, le signal obtenu montrait directement la liaison du ligand au récepteur, au lieu d'indirectement avec un compétiteur. Cette méthode demandait une préparation à l'avance des liposomes et des prismes recouverts d'or et d'ODM, mais l'essai en soi était rapide.

Le potentiel de l'essai SPR a été observé par l'analyse avec le peptide G23 et la CTB. Toutefois, l'essai devra être répété quelques fois pour évaluer la reproductibilité de la méthode. D'un autre côté, la constante de dissociation obtenue pour la CTB (56 nM) se retrouve entre celles retrouvées dans la littérature soit de 0,73 nM à 952 nM (46, 51, 52, 58, 59). Par contre, ces valeurs étant plutôt dispersées, due au fait qu'elles proviennent de différents types d'essai (ITR, SPR et cellulaires), les résultats obtenus seront comparés entre eux plutôt qu'avec la littérature. Enfin, il serait intéressant par la suite de tester les autres composés comme la pipéracilline liée à l'espaceur #1 et #2 et au peptide G23. De cette façon, les méthodes ITC et SPR pourraient être comparées.

# **Chapitre 5. Évaluation de la perméabilité des promédicaments**

## **5.1 Introduction**

Suite à la démonstration de l'affinité entre les promédicaments et le récepteur, il faut démontrer leur capacité à traverser la barrière intestinale. Pour ce faire, des essais de perméabilité doivent être réalisés. Les essais les plus courants dans le développement pharmaceutique sont le PAMPA et le Caco-2. L'essai PAMPA consiste à imbiber un filtre de différents lipides et à observer le passage du médicament à travers cette membrane hydrophobe. Cet essai est simple et donne une bonne idée de la perméabilité passive des molécules. Par contre, dans le cadre de ce projet, le transport visé est de type actif puisque le promédicament doit être internalisé par endocytose grâce au récepteur GM1. Dans ce cas, l'essai de type Caco-2 consiste à faire pousser des cellules intestinales immortalisées sur un filtre jusqu'à ce qu'elles développent des jonctions assez serrées entre elles pour qu'il n'y ait pas de fuite de part et d'autre de la membrane. Les molécules peuvent par conséquent traverser les cellules par diffusion passive, active et paracellulaire. Cet essai est donc approprié puisque les cellules ont la capacité de transporter activement les molécules.

Plusieurs groupes de recherche ont étudié le mécanisme d'internalisation de la toxine du choléra à travers un autre type cellulaire que le Caco-2, soit des cellules de carcinome colorectal humain dérivé de métastases du poumon, nommées T84 (15, 60-64). Ces cellules seraient plus représentatives des cryptes intestinales et possèderaient une quantité plus élevée de ganglioside GM1 à leur surface (60, 65). Ainsi, pour prouver le concept de ce projet, les essais de perméabilité ont été réalisés avec les cellules T84 ainsi que les Caco-2. Les cellules Caco-2 servent alors de contrôle, puisqu'elles présentent moins de GM1 à leur surface, la perméabilité des promédicaments devrait être plus faible que dans les cellules T84.

## **5.2 Matériel et méthodes**

### **5.2.1 Développement des lignées cellulaires et du test de perméabilité**

Les cellules T84 ont été achetées chez ATCC (Manassas, USA). Elles ont été mises en culture dans une flasque T25 pour cellules adhérentes avec capuchon ventilé (Sarstedt Inc., Montreal, Canada) avec leur milieu de culture spécifique, soit un mélange (1:1) de milieu Eagle modifié de Dulbecco et de milieu de nutriment F12 (DMEM-F12 Glutamax) additionné de 10 % de sérum foetal bovin (FBS) et de 1 % de solution d'antibiotiques pénicilline-streptomycine (10000 U/mL) (Invitrogen, Burlington, Canada). La flasque a été placée à l'incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pour 24 heures et les cellules mortes ont été retirées en changeant le milieu. Après 3 jours, les cellules ont été transférées dans une plaque T75 du même type. Ensuite, les passages ont été effectués aux 7 jours en transférant le quart de la totalité des cellules présentant une confluence de 80%. Pour assurer la pérennité de cette nouvelle lignée au sein du laboratoire, une partie des cellules ont été congelées lors des passages 2, 3, 7, 12 et 16 dans le milieu de culture additionné de 5% diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada).

Les cellules Caco-2 (ATCC, Manassas, USA) ont été mises en culture à partir d'échantillons congelés du passage 22 dans le milieu Eagle modifié de Dulbecco additionné de 10 % de sérum foetal bovin (FBS), de 1 % de solution d'antibiotiques pénicilline-streptomycine (10000 U/mL) et de 1% d'acides aminés non essentiels (Invitrogen, Burlington, Canada). Le même protocole que pour les cellules T84 a été suivi, avec deux passages par semaine et sans congélation de cellules.

L'essai de perméabilité a été développé selon un protocole standard d'essai Caco-2 implémenté au laboratoire (66). La concentration en molécule à tester a été fixée à 10 µM pour être dans des conditions de solubilité en plus d'avoir une assez forte intensité lors de la quantification. Les volumes de prélèvements ainsi que le remplacement de volume ont été changés durant les essais pour être conformes aux protocoles Caco-2.

### 5.2.2 Réalisation d'essais de perméabilité

Deux essais de perméabilité ont été réalisés. Un essai dans les cellules Caco-2 et un dans les cellules T84. Les cellules Caco-2 (passage 42) ont étéensemencées sur 12 filtres de polycarbonate (0,45µm) (VWR, Mississauga, Canada). Le milieu a été changé aux deux jours et l'essai de perméabilité a été réalisé après 21 jours. La pipéracilline seule a été testée dans 6 puits (n=6) et la pipéracilline- espaceur 1 - peptide G23 dans les 6 autres (n=6). Après une incubation de 30 minutes des cellules dans le HBSS pH 6.5, le tampon a été retiré par aspiration et la molécule (10 µM) dans le HBSS pH 6.5 a été ajouté à la face apicale des cellules (500 µL). Le HBSS pH 6.5 (1500 µL) a été ajouté au côté basolatéral. Un premier prélèvement de 50 µL a été effectué (à t = 0) du côté apical et basolatéral et a été dilué dans 200 µL d'un mélange équivalent d'ACN et d'eau + 0,1 % acide acétique. La plaque a été placée dans un incubateur à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> et sous agitation à l'aide d'un ThermoMixer à 300 rpm. Des prélèvements identiques au premier ont été réalisés après 1, 2 et 3 heures. Une courbe de calibration (0,005 à 3 µM) pour chaque molécule a été produite dans la même phase mobile. Les échantillons ont été analysés par HPLC-MS/MS avec la méthode finale développée lors des essais de stabilité.

Pour le deuxième essai, les cellules T84 ont étéensemencées au passage 19 sur 12 filtres identiques à l'essai Caco-2. Elles ont poussé 28 jours avec un changement de milieu aux 2 jours. Les perméabilités de la pipéracilline seule (n=6) et du peptide G23 seul (n=6) ont été testées. Suite à l'incubation de 30 minutes avec le HBSS pH 6.5 et au retrait du tampon, 500µL de chaque molécule en solution (10 µM) dans le HBSS pH 6.5 ont été ajoutés du côté apical et 1500 µL du HBSS pH 6.5 seul ont été ajoutés du côté basolatéral. Contrairement aux essais avec les cellules Caco-2, et selon les protocoles standards, les prélèvements (0, 1, 2 et 3 heures) ont été effectués seulement du côté basolatéral et les volumes ont été remplacés par du HBSS pH 6.5 préchauffé à 37°C. À la fin de l'essai, 200µL ont été prélevés du côté apical et un prélèvement des solutions de départ a également été réalisé. 150 µL de chaque prélèvement ont été dilués avec 150 µL d'ACN + 0,1 % acide acétique. Deux courbes de calibration ont été produites, de 0,025 à 5 µM pour la pipéracilline et de 0,5 à 5 µM pour le peptide G23. Les échantillons ont été quantifiés par HPLC-MS/MS.

### 5.3 Résultats

Dans les deux types cellulaires, la pipéracilline c'est montrée non-perméable, c'est-à-dire, qu'aucune pipéracilline n'a été détectée du côté basolatéral et que la concentration de départ du côté apical est demeurée la même après 3 heures.

L'essai de perméabilité de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 dans les cellules Caco-2 a démontré qu'aucune pipéracilline ou pipéracilline - espaceur #1 - G23 intacte n'a traversé la monocouche cellulaire (voir figure 5.1). De plus, une partie de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 semble s'être dégradée en pipéracilline seule du côté apical (voir figure 5.2).

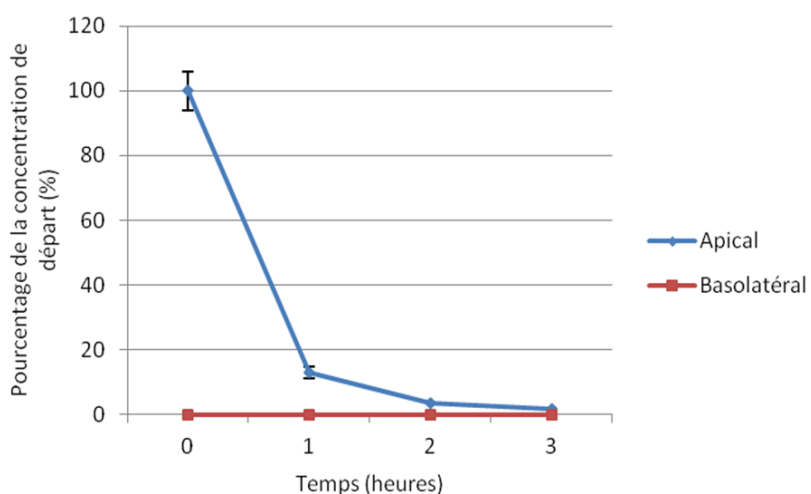


Figure 5.1 Perméabilité de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 dans les cellules Caco-2.

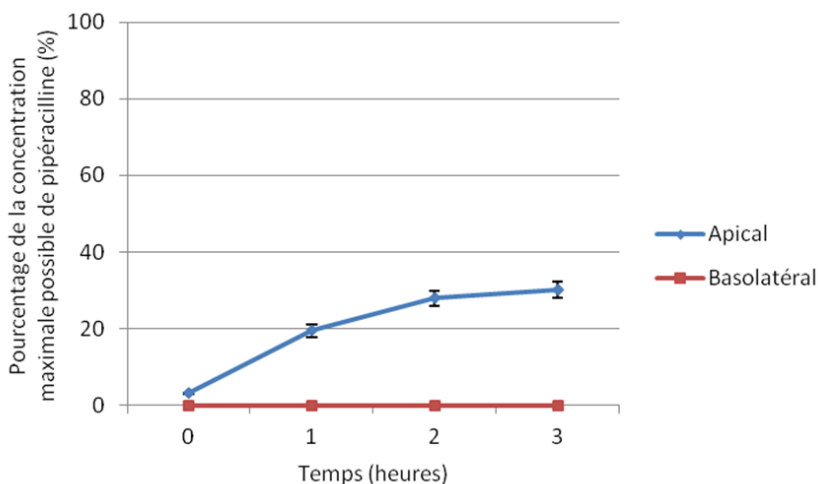


Figure 5.2 Apparition de pipéracilline dans l'essai de perméabilité de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 dans les cellules Caco-2.

L'essai de perméabilité du peptide G23 dans les T84 a résulté en une disparition du peptide du côté apical, il restait 14 % de la concentration de départ après 3 heures, tandis qu'aucun peptide intact n'a été détecté du côté basolatéral.

## 5.4 Discussion

Pour confirmer le concept de cette recherche, il faut démontrer la première hypothèse, soit que la liaison d'un peptide reconnaissant le récepteur GM1 à une molécule peu perméable facilitera son absorption. Pour ce faire, des essais de perméabilité à travers une monocouche de cellules intestinales ont été réalisés. Avant tout, la perméabilité de la molécule modèle seule, pipéracilline, a été évaluée, afin de s'assurer de son incapacité à traverser la barrière intestinale. Dans les deux types cellulaires, la pipéracilline n'a pas traversé la monocouche de cellules, confirmant donc que la molécule est adéquate pour faire partie du modèle.

Ensuite, la perméabilité du premier promédicament (pipéracilline - espaceur #1 - G23) a été évaluée dans les cellules Caco-2. L'essai a résulté en aucune pipéracilline ou pipéracilline - espaceur #1 - G23 du côté basolatéral des cellules, en plus d'une dégradation de la pipéracilline - espaceur #1 - G23 formant en partie la pipéracilline du côté apical. Ces résultats en perspectives avec les essais de stabilité confirment que la molécule n'est pas stable dans les conditions de l'étude.

Pour évaluer directement la capacité du peptide à traverser les cellules, un test a été réalisé avec le peptide G23 seul dans les cellules T84. Aucun peptide n'a été retrouvé du côté basolatéral et seulement 14 % du peptide est demeuré du côté apical. Malgré les résultats démontrant la stabilité du peptide sur 3 heures dans le HBSS pH 6,5, il demeure possible qu'une partie du peptide ait été dégradé lors de l'essai possiblement par l'action d'enzymes à la surface des cellules. L'autre hypothèse est que le peptide soit entré dans les cellules, mais aie été incapable d'en ressortir du côté basolatéral. En effet, il a été songé au départ qu'il était possible que la durée de l'essai soit trop courte pour que le peptide puisse s'échapper de l'endosome. Par contre, cette hypothèse est contredite par des études qui ont montré qu'il fallait de 15 à 60 minutes à la toxine du choléra pour réaliser son activité sur l'adénylate cyclase, donc pour être internalisée et passer par le Golgi et le réticulum endoplasmique (13,

67). Dans une autre étude, il a été montré qu'une toxine du choléra modifiée pour n'avoir qu'un seul site de liaison au GM1 atteignait son plateau d'activité à l'intérieur de 120 minutes (14). Donc, l'essai réalisé sur 3 heures devrait être suffisamment long pour évaluer le transport du peptide. Il est possible que le peptide soit incapable de sortir de la cellule par ce mécanisme. Il a été songé que du fait qu'il était plutôt lipophile et par son transport au niveau du Golgi, il pourrait s'associer avec les chylomicrons pour être transporté par exocytose (68). Cette hypothèse demeure toutefois impossible à évaluer avec le modèle de perméabilité développé. Il faudrait l'optimiser pour ajouter la composante du transport de lipides. Des exemples de modèles *in vitro* sont présentés dans la revue de littérature de Yanez et al. (68).

Pour l'instant, pour mieux comprendre le parcours du peptide, ce dernier sera lié à un marqueur fluorescent (l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)) et suite à l'essai de perméabilité, la fluorescence de part et d'autre de la membrane sera observée ainsi que celle à l'intérieur des cellules par cytométrie en flux (FACS). Également, des essais de microscopie pourront être réalisés pour vérifier de plus près le parcours intracellulaire du peptide. Par ces essais, il sera possible de conclure si la disparition du peptide du côté apical des cellules T84 est due à une internalisation ou à une dégradation.

## **Conclusion et perspectives**

L'objectif général de ce projet de recherche était de préparer des promédicaments à partir d'une molécule active et d'un peptide ayant de l'affinité pour le GM1 et d'évaluer leur capacité à être absorbé dans les cellules intestinales. Les trois objectifs spécifiques établis au départ pour cette partie du projet ont été atteints, soit:

- évaluer la cinétique de conversion des promédicaments en molécules actives seules;
- développer une méthode d'évaluation de l'affinité de liaison du peptide et des promédicaments avec le ganglioside GM1;
- évaluer l'endocytose *in vitro* des promédicaments.

En effet, des méthodes de quantification ont été développées pour les molécules sélectionnées et les méthodes les plus critiques, soit celles de la pipéracilline et de ses dérivés, ont été validées pour les essais de stabilité. Les essais de stabilité ont été développés et se sont avérés



efficaces pour évaluer le métabolisme des molécules modèles de promédicament ainsi que pour discriminer les milieux offrant une meilleure stabilité. De plus, trois méthodes d'évaluation de l'affinité ont été investiguées et deux d'entre elles (ITC et SPR) se sont montrées adéquates pour l'évaluation de la liaison avec le ganglioside GM1. Enfin, l'essai de perméabilité permettant d'observer l'absorption des promédicaments a été tiré de protocoles standards et adapté pour les cellules T84. Par conséquent, un progrès important a été apporté dans ce projet puisqu'avec les essais maintenant en place, il sera beaucoup plus facile de tester et de comparer les différentes molécules issues de la synthèse.

En contrepartie, avec les essais effectués et les résultats obtenus, les deux hypothèses de départ soit qu'un promédicament se liant au GM1 peut améliorer l'absorption intestinale de médicaments peu perméables et que ce promédicament peut être métabolisé en molécule active seule une fois absorbé, ne peuvent être confirmées ou infirmées. En effet, les essais de perméabilité n'ont pas été concluants puisque le premier a été réalisé avec une molécule ne démontrant pas de liaison au récepteur GM1 et le deuxième avec le peptide seul. Des essais de perméabilité avec un prototype de promédicament ayant une stabilité et une affinité adéquate seraient alors plus conclusifs. En parallèle aux efforts de synthèse et de caractérisation d'un tel composé, des essais avec le peptide lié à un traceur fluorescent non perméable, soit l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) seront réalisés pour évaluer d'abord si le peptide entre dans la cellule et le cas échéant, pour investiguer son parcours dans le cytosol.

À plus long terme, un promédicament ayant démontré sa stabilité, son affinité et sa perméabilité pourra être administré chez le rat pour évaluer sa pharmacocinétique. À cette étape, il sera important de garder en tête que la formulation devra être optimisée pour conserver le peptide intact lors du passage du promédicament dans le tractus gastro-intestinal. Une forme orale à libération entérique serait préférable pour éviter la dégradation par des enzymes gastriques comme la pepsine. Il est également possible de formuler le promédicament avec des inhibiteurs de protéases pour prévenir le clivage du peptide par les enzymes pancréatiques comme la trypsine ou la chymotrypsine. Cette double protection a déjà été utilisée par exemple pour l'administration de vaccins oraux où de l'amidon carboxyméthyle et des inhibiteurs de protéases de Bowman-Birk dérivés du soja ont servi comme agents de libération entérique et comme inhibiteur enzymatique respectivement (69, 70).



## Bibliographie

1. Kerns EH, Di L. Drug-like properties : concepts, structure design and methods : from ADME to toxicity optimization. Amsterdam ; Boston: Academic Press; 2008. xix, 526 p., 2 p. of plates p.
2. Dictionnaire Larousse médical: Absorption intestinale. Available from: [http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/absorption\\_intestinale/10867](http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/absorption_intestinale/10867).
3. Chevrier G. Les entérocytes et l'absorption intestinale 2002 [updated 2015; cited 2015]. Available from: <http://bio.m2osw.com/gcartable/enterocyte.htm>.
4. Boroujerdi M. Pharmacokinetics and Toxicokinetics: CRC Press; 2015.
5. 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.
6. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition.: Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
7. FDA. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance. 2015. p. 14.
8. Thomas VH, Bhattachar S, Hitchingham L, Zocharski P, Naath M, Surendran N, et al. The road map to oral bioavailability: an industrial perspective. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2006;2(4):591-608.
9. Fasinu P, Pillay V, Ndesendo VM, du Toit LC, Choonara YE. Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2011;32(4):185-209.
10. Stella V, Borchardt R, Hageman M, Oliyai R, Maag H, Tilley J. *Prodrugs: Challenges and Rewards*: Springer New York; 2007.
11. Reidl J, Klose KE. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS microbiology reviews*. 2002;26(2):125-39.
12. Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin - a foe & a friend. *The Indian journal of medical research*. 2011;133:153-63.
13. Kaper JB, Morris JG, Jr., Levine MM. Cholera. *Clinical microbiology reviews*. 1995;8(1):48-86.
14. Jobling MG, Yang Z, Kam WR, Lencer WI, Holmes RK. A single native ganglioside GM1-binding site is sufficient for cholera toxin to bind to cells and complete the intoxication pathway. *mBio*. 2012;3(6).
15. Badizadegan K, Wheeler HE, Fujinaga Y, Lencer WI. Trafficking of cholera toxin-ganglioside GM1 complex into Golgi and induction of toxicity depend on actin cytoskeleton. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;287(5):C1453-62.
16. Fujinaga Y. Transport of bacterial toxins into target cells: pathways followed by cholera toxin and botulinum progenitor toxin. *Journal of biochemistry*. 2006;140(2):155-60.
17. Fujinaga Y, Wolf AA, Rodighiero C, Wheeler H, Tsai B, Allen L, et al. Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell*. 2003;14(12):4783-93.
18. Lencer WI, Delp C, Neutra MR, Madara JL. Mechanism of cholera toxin action on a polarized human intestinal epithelial cell line: role of vesicular traffic. *The Journal of cell biology*. 1992;117(6):1197-209.

19. Mocchetti I. Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2005;62(19-20):2283-94.
20. Margolis RU, Margolis ReK. *Neurobiology of glycoconjugates*. New York: Plenum Press; 1989. xvii, 453 p. p.
21. Svennerholm L. *Biological function of gangliosides : proceedings of Nobel Symposium 83*. Amsterdam ; New York: Elsevier; 1994. xviii, 409 p. p.
22. Kolter T. *Ganglioside Biochemistry*. ISRN Biochemistry. 2012;2012:36.
23. Yu RK, Bieberich E, Xia T, Zeng G. Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. *Journal of lipid research*. 2004;45(5):783-93.
24. Svennerholm L. The Gangliosides. *Journal of lipid research*. 1964;5:145-55.
25. Svennerholm L. Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. *Journal of neurochemistry*. 1963;10:613-23.
26. Christie WW. Gangliosides: structure, occurrence, biology and analysis lipidlibrary.aocs.org [updated 2014; cited 2015]. Available from: <http://www.lipidhome.co.uk/lipids/sphingo/gang/index.htm>.
27. Aureli M, Mauri L, Ciampa M, Prinetti A, Toffano G, Secchieri C, et al. GM1 Ganglioside: Past Studies and Future Potential. *Mol Neurobiol*. 2015:1-19.
28. Saslowsky DE, te Welscher YM, Chinnapen DJ, Wagner JS, Wan J, Kern E, et al. Ganglioside GM1-mediated transcytosis of cholera toxin bypasses the retrograde pathway and depends on the structure of the ceramide domain. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(36):25804-9.
29. Georgieva JV, Brinkhuis RP, Stojanov K, Weijers CA, Zuilhof H, Rutjes FP, et al. Peptide-mediated blood-brain barrier transport of polymersomes. *Angewandte Chemie*. 2012;51(33):8339-42.
30. Lobenberg R, Amidon GL. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. *New scientific approaches to international regulatory standards*. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2000;50(1):3-12.
31. Matsubara T, Ishikawa D, Taki T, Okahata Y, Sato T. Selection of ganglioside GM1-binding peptides by using a phage library. *FEBS letters*. 1999;456(2):253-6.
32. Dong MW. *Modern HPLC for Practicing Scientists*: Wiley; 2006.
33. Kang J-S. Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples. In: Prasain JK, editor. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology » "Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles"2012*.
34. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*. 2009;30(1):19-34.
35. SantéCanada. Directives du programme des produits thérapeutiques ICH Q2B: Validation des méthodes d'analyse: méthodologie 1999 [cited 2014]. Available from: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/applic-demande/guide-ld/ich/qual/q2b-fra.php>.
36. Milev S. Isothermal titration calorimetry: Principles and experimental design. In: *Healthcare G*, editor. 2013.
37. Velazquez-Campoy A, Freire E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *Nature protocols*. 2006;1(1):186-91.

38. Velazquez-Campoy A, Leavitt SA, Freire E. Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods in molecular biology*. 2015;1278:183-204.
39. SinoBiologicalInc. ELISA encyclopedia 2004 [updated 2015; cited 2015 06-10]. Available from: <http://www.elisa-antibody.com/>.
40. GEHealthcare. Biacore Sensor Surface Handbook 2008. Available from: <http://www.gelifesciences.com>.
41. Marquart A. SPR-Pages 2006 [updated 2015; cited 2015 06-10]. Available from: <http://www.sprpages.nl>.
42. Schasfoort RBM, Tudos AJ. Handbook of surface plasmon resonance. Cambridge, UK: RSC Pub.; 2008. xxi, 403 p. p.
43. Roos H, Karlsson R, Nilshans H, Persson A. Thermodynamic analysis of protein interactions with biosensor technology. *Journal of molecular recognition : JMR*. 1998;11(1-6):204-10.
44. Cooper MA. Typical set-up for an SPR biosensor. *Nature Reviews Drug Discovery*2002.
45. Turnbull WB, Precious BL, Homans SW. Dissecting the cholera toxin-ganglioside GM1 interaction by isothermal titration calorimetry. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(4):1047-54.
46. Masserini M, Freire E, Palestini P, Calappi E, Tettamanti G. Fuc-GM1 ganglioside mimics the receptor function of GM1 for cholera toxin. *Biochemistry*. 1992;31(8):2422-6.
47. Liu JK, Teng Q, Garrity-Moses M, Federici T, Tanase D, Imperiale MJ, et al. A novel peptide defined through phage display for therapeutic protein and vector neuronal targeting. *Neurobiology of disease*. 2005;19(3):407-18.
48. Hamorsky KT, Kouokam JC, Bennett LJ, Baldauf KJ, Kajiura H, Fujiyama K, et al. Rapid and scalable plant-based production of a cholera toxin B subunit variant to aid in mass vaccination against cholera outbreaks. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(3):e2046.
49. Montaner AD, De Nichilo A, Elias F, Rodriguez JM, Flo JM, Lopez RA, et al. Ganglioside GM1-binding peptides as adjuvants of antigens inoculated by the intranasal route. *Vaccine*. 2006;24(11):1889-96.
50. Zhao SS, Bukar N, Toulouse JL, Pelechacz D, Robitaille R, Pelletier JN, et al. Miniature multi-channel SPR instrument for methotrexate monitoring in clinical samples. *Biosensors & bioelectronics*. 2015;64:664-70.
51. Aman AT, Fraser S, Merritt EA, Rodighiero C, Kenny M, Ahn M, et al. A mutant cholera toxin B subunit that binds GM1- ganglioside but lacks immunomodulatory or toxic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(15):8536-41.
52. Kuziemko GM, Stroh M, Stevens RC. Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance. *Biochemistry*. 1996;35(20):6375-84.
53. Seo JH, Kim CS, Cha HJ. Structural evaluation of GM1-related carbohydrate-cholera toxin interactions through surface plasmon resonance kinetic analysis. *The Analyst*. 2013;138(22):6924-9.
54. Williams TL, Jenkins AT. Measurement of the binding of cholera toxin to GM1 gangliosides on solid supported lipid bilayer vesicles and inhibition by europium (III) chloride. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(20):6438-43.

55. Sinclair HR, Kemp F, Slegte J, Gibson GR, Rastall RA. Carbohydrate-based anti-adhesive inhibition of *Vibrio cholerae* toxin binding to GM1-OS immobilized into artificial planar lipid membranes. *Carbohydrate research*. 2009;344(15):1968-74.
56. Ariga T, Kobayashi K, Hasegawa A, Kiso M, Ishida H, Miyatake T. Characterization of high-affinity binding between gangliosides and amyloid beta-protein. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2001;388(2):225-30.
57. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*. 2012;1(2):147-68.
58. MacKenzie CR, Hirama T, Lee KK, Altman E, Young NM. Quantitative analysis of bacterial toxin affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(9):5533-8.
59. Frelre E, Mayorgal OL, Straume M. Isothermal titration. *Analytical chemistry, American Chemical Society* 1990;62(18).
60. Wolf AA, Fujinaga Y, Lencer WI. Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(18):16249-56.
61. Wolf AA, Jobling MG, Wimer-Mackin S, Ferguson-Maltzman M, Madara JL, Holmes RK, et al. Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. *The Journal of cell biology*. 1998;141(4):917-27.
62. Rodighiero C, Fujinaga Y, Hirst TR, Lencer WI. A cholera toxin B-subunit variant that binds ganglioside G(M1) but fails to induce toxicity. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(40):36939-45.
63. Lencer WI, Moe S, Rufo PA, Madara JL. Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(22):10094-8.
64. Wimer-Mackin S, Holmes RK, Wolf AA, Lencer WI, Jobling MG. Characterization of receptor-mediated signal transduction by *Escherichia coli* type IIa heat-labile enterotoxin in the polarized human intestinal cell line T84. *Infection and immunity*. 2001;69(12):7205-12.
65. Beguin P, Schneider AC, Mignolet E, Schneider YJ, Larondelle Y. Polyunsaturated fatty acid metabolism in enterocyte models: T84 cell line vs. Caco-2 cell line. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2014;50(2):111-20.
66. Zaraa S. Optimisation et évaluation d'un nouveau test PAMPA amélioré pour la prédiction de l'absorption intestinale de médicaments: Université de Montréal; 2013.
67. Gill DM, King CA. The mechanism of action of cholera toxin in pigeon erythrocyte lysates. *The Journal of biological chemistry*. 1975;250(16):6424-32.
68. Yanez JA, Wang SW, Knemeyer IW, Wirth MA, Alton KB. Intestinal lymphatic transport for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(10-11):923-42.
69. De Koninck P, Archambault D, Hamel F, Sarhan F, Mateescu MA. Carboxymethyl-starch excipients for gastrointestinal stable oral protein formulations containing protease inhibitors. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*. 2010;13(1):78-92.

70. Kennedy AR. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *The American journal of clinical nutrition*. 1998;68(6 Suppl):1406s-12s.

