

# THESE

Présenté pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG**

**ECOLE DOCTORALE SCIENCES CHIMIQUES**

par

Pierre SAE HOUER

## CONCEPTION ET CARACTERISATION BIOLOGIQUE DE SYSTEMES LIPIDIQUES DESTINES A UNE ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE

Discipline : Chimie

Spécialité : Sciences Pharmaceutiques

Pr. Sudaxshina MURDAN

Rapporteur externe

Pr. Patrick SAULNIER

Rapporteur externe

Pr. Eric MARCHIONI

Rapporteur interne

Pr. Thierry VANDAMME

Directeur de thèse



# Remerciements

Dans un premier temps, je tiens à remercier sincèrement le Professeur Thierry Vandamme pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et donné l'opportunité de réaliser ma thèse dans des conditions idéales de travail. Vous m'avez accordé une grande liberté dans cette aventure tout en me faisant confiance sur les nombreux choix que j'ai eu à faire. Cela m'a appris l'autonomie, le sens de l'organisation et de la responsabilité. J'ai beaucoup apprécié votre disponibilité et votre bonne humeur.

Mes remerciements vont aussi au Professeur Eric Marchioni qui m'avait vivement encouragé à me lancer dans cette « nouvelle expérience », il y a trois ans. Nos conversations m'ont toujours beaucoup appris et inspiré aussi bien du point de vue professionnel que personnel. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et mon respect.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur Patrick Saulnier et au Professeur Sudaxshina Murdan de me faire l'honneur de juger ce travail.

Un grand merci à tous les membres du Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives que j'ai pu rencontrer pendant ces trois années. Merci à Béatrice Heurtault pour m'avoir initié et formé à l'utilisation du Nanosizer et du kit de détection des mycoplasmes. Merci à Gaëlle Creusat pour m'avoir montré comment réaliser un test MTT. Merci à Guy et Nicolas pour leur aide. Merci aussi à Benoit, Jérôme, Régis, Rkya pour nos conversations amicales.

Je tiens à exprimer mon entière reconnaissance au Docteur Francis Raul et à Francine Gossé de l'Institut de Recherche Contre les Cancers de l'Appareil Digestif (IRCAD). Vous avez grandement contribué à la mise en place de notre salle de culture cellulaire. C'est aussi grâce à vous que j'ai appris les bases ainsi que de nombreuses subtilités de la culture de cellules.

Au Professeur Jean-Marc Lessinger, à Elisabeth Laurent et à Lyse Fontaine, je tiens à vous exprimer mes plus sincères remerciements pour les travaux que vous avez réalisés quant au dosage de la LDH. Au sein de votre laboratoire au Centre de Chirurgie Orthopédique et de la Main de Strasbourg, d'innombrables dosages ont réalisés pendant les trois dernières années. Je vous remercie aussi pour les bons moments passés autour d'un café accompagné de bons chocolats (ou de saucissons pour Jean-Marc).

Enfin, je remercie encore le Professeur Eric Marchioni et Minjie Zhao pour leur précieuse aide dans la mise au point et la validation des méthodes de dosage chromatographique que nous avons à réaliser.

A mes voisins et voisines d'étage et leurs amis... je tiens aussi à vous remercier : Esther, Joseph, Julie Legrandois, Guillaume, Martine, Françoise, Diane Julien-David, Amadine Cambrai. Vous avez été d'une aide formidable pour mes travaux de chimie analytique. Mais surtout je me rappellerai toujours des soirées, anniversaires et vacances de skis passés ensemble.

Un petit mot à mes camarades de la promo 2006. Un grand merci pour les personnes que je revois encore régulièrement : Thomas, Yves, Joanne, Luc, Philippe, Florent, Leatitia, Christelle, Mélanie, Charlotte, Stéphane...

Je n'oublierai pas non plus tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire. Qu'ils aient travaillé ou non sur mon projet de thèse, votre compagnie a été une expérience irremplaçable. Je tiens particulièrement à remercier Mathieu Schmitt et Emilie Kling qui m'ont apporté une aide précieuse lors de leur présence. Mais je n'oublie pas non plus Marie, Guillaume, Nicolas, Julien, Christel, Anne-Marie, Virginia et tous les autres.

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille ! Toujours présente pour me soutenir et m'aider...

# Table des matières

Table des matières .....	5
Liste des abréviations .....	8
Liste des figures .....	9
Liste des tableaux .....	12
INTRODUCTION GENERALE .....	13
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE .....	17
Chapitre 1: Formulations orales à base d'excipients lipidiques.....	19
1.1 Les principes actifs.....	19
1.2 Excipients pharmaceutiques .....	21
1.2.1 Les solvants organiques miscibles à l'eau ou « co-solvants » .....	21
1.2.2 Les excipients huileux.....	22
1.2.3 Les surfactants non-ioniques.....	23
1.2.4 Les cyclodextrines.....	26
1.3 Systèmes lipidiques .....	26
1.3.1 Le système de classification des systèmes lipidiques.....	26
1.3.2 Systèmes auto-émulsifiants .....	28
1.3.3 Formes micellaires.....	29
1.4 Mécanismes amenant à une amélioration de la biodisponibilité par voie orale.....	30
1.4.1 Augmentation de la solubilité des principes actifs.....	30
1.4.2 Impacts sur les phénomènes de résistance médicamenteuse.....	31
1.4.2.1 Les protéines d'efflux .....	31
1.4.2.2 Les enzymes de métabolisation intestinale .....	33
1.4.2.3 Activité modulatrice des excipients sur les phénomènes de résistance.....	34
Chapitre 2: Caractérisation des systèmes lipidiques et leur stratégie de formulation.....	38
2.1 Propriétés Physicochimiques .....	38
2.1.1 Granulométrie .....	38
2.1.2 Milieux de dissolution .....	39
2.2 Propriétés biologiques.....	40
2.2.1 Etude de la perméabilité et du métabolisme.....	40
2.2.1.1 Perméabilité intestinale .....	40
2.2.1.1.1 Physiologie de l'appareil digestif.....	40
2.2.1.1.2 Modèles <i>in vitro</i> d'absorption intestinale .....	45

2.2.1.1.3	La lignée cellulaire Caco-2 .....	46
2.2.1.2	Modèles in vitro de métabolisme intestinal.....	51
2.2.2	Tests de cytotoxicité.....	51
2.2.2.1	Mises en solution des excipients lipophiles .....	52
2.2.2.2	Tests in vitro sur culture cellulaire .....	53
2.2.2.2.1	Observations microscopiques .....	53
2.2.2.2.2	Mesure du TEER .....	54
2.2.2.2.3	Marqueurs de perméabilité paracellulaire .....	54
2.2.2.2.4	Activité métabolique cellulaire .....	56
2.2.2.2.4.1	Les sels de tétrazolium .....	56
2.2.2.2.4.2	Resazurin .....	57
2.2.2.2.5	Marqueurs d'intégrité membranaire .....	58
2.2.2.2.5.1	LDH .....	58
2.2.2.2.5.2	Autres marqueurs.....	58
2.2.3	Lipolyse.....	59
2.2.3.1	Métabolisme lipidique physiologique .....	59
2.2.3.2	Métabolisme gastro-intestinal des systèmes lipidiques .....	60
2.2.3.3	Modèles in vitro de lipolyse intestinale .....	62
2.3	Stratégie de formulation .....	65
PARTIE EXPERIMENTALE.....		69
Chapitre 3: Evaluation de la cytotoxicité d'excipients utilisés dans les systèmes lipidiques.....		71
3.1	Introduction générale.....	71
3.2	Matériel et méthode .....	72
3.2.1	Préparations des solutions d'excipients.....	72
3.2.2	Culture cellulaire .....	75
3.2.3	Evaluation de la cytotoxicité .....	75
3.2.4	Granulométrie laser .....	77
3.2.5	Statistiques .....	77
3.3	Résultats .....	77
3.3.1	Etudes de cytotoxicité sur les excipients seuls.....	77
3.3.2	Etudes de cytotoxicité de systèmes lipidiques.....	88
3.4	Discussion .....	95
3.5	Conclusion .....	99
Chapitre 4: Mise au point d'une formulation orale pour une substance lipophile, l'orlistat .....		100

4.1	Introduction générale.....	100
4.2	Matériel et méthode .....	102
4.2.1	Etudes d'inhibition de croissance.....	102
4.2.2	Validation de la méthode chromatographique de dosage de l'orlistat .....	104
4.2.3	Préparation des systèmes lipidiques renfermant l'orlistat .....	106
4.2.4	Culture cellulaire .....	107
4.2.5	Test de perméabilité <i>in vitro</i> .....	108
4.2.6	Tests de cytotoxicité.....	108
4.2.7	Granulométrie laser .....	109
4.2.8	Statistiques .....	110
4.3	Résultats .....	110
4.3.1	Etudes d'inhibition de croissance sur les cellules SW480 et SW620.....	110
4.3.2	Validation de la méthode analytique de dosage.....	112
4.3.2.1	Analyse du spectre de masse .....	112
4.3.2.2	Spécificité .....	113
4.3.2.3	Linéarité.....	114
4.3.2.4	Fidélité.....	118
4.3.2.5	Seuil de détection.....	119
4.3.3	Préparation des solutions à tester .....	120
4.3.4	Perméabilité de l'orlistat au travers de la monocouche de cellules Caco-2 .....	121
4.3.5	Résultats des tests de cytotoxicité .....	122
4.3.6	Granulométrie des entités colloïdales formées .....	125
4.4	Discussion .....	126
4.4.1	Etudes d'inhibition de croissance.....	127
4.4.2	Validation de la méthode analytique .....	128
4.4.3	Comparaison des différentes formulations.....	129
4.5	Conclusion .....	134
	CONCLUSION GENERALE .....	135
	REFERENCES .....	141
	Communications scientifiques .....	157
	Communications à des congrès par affiche : .....	157

# Liste des abréviations

ABC : ATP-Binding Cassette

BCRP : Breast Cancer Resistance Protein

CMC : Concentration Micellaire Critique

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

HBSS : Hank's Buffered Saline Solution

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HLB : Balance Hydrophile Lipophile

hPepT1 : human Peptide Transporter 1

LY : Lucifer Yellow

m/v : rapport d'une masse sur un volume

M : molaire

MDCK : Madin–Darby Canine Kidney

MES : acide 2-(N-Morpholino)éthanesulfonique

mM : millimolaire

μM : micromolaire

MRP : Multi-Resistance Protein

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

NR : Rouge Neutre

OA : Oxyde d'aluminium

OAT : Organic Anionic Transporter

OCT : Organic Cationic Transporter

p-gp : p-glycoprotéine

PC : Polycarbonate

PE : Polyester

PEG : Polyéthylène glycol

PET : Polyéthylène-téréphtalate

SEDDS : Self-Emulsifying Drug Delivery Systems

SMEDDS® : Self-MicroEmulsifying Drug Delivery Systems, marque déposée par Gattefossé en 1995

TEER : Résistance électrique transépithéliale

XDB : Extra Densely Bonded



## Liste des figures

Figure 1 : Classification biopharmaceutique des substances actives (BCS) selon Amidon et al [Amidon et al, 1995].....	20
Figure 2 : Classification biopharmaceutique pour la disposition des principes actifs (BDDCS) selon Benet et al [Benet et al, 2008].....	21
Figure 3 : Schéma récapitulatif sur les effets possibles des excipients sur les protéines d'efflux et les enzymes de métabolisation pré-systémique .....	36
Figure 4 : Structure d'une villosité au niveau de l'épithélium intestinal circulation sanguine et lymphatique [Physiological Pharmaceutics, Barriers to Drug Absorption, 2 <sup>nd</sup> Edition, Chapitre VI] ....	41
Figure 5 : Schéma de l'épithélium intestinal formant une barrière sélective contre le passage dans la circulation générale de substances exogènes. (A) voie paracellulaire. (B) Absorption transcellulaire par un transporteur membranaire. (C) Phénomène de diffusion passive et phénomène d'efflux réalisé par un transporteur membranaire et limitant l'absorption de la substance exogène. (D) Phénomène d'efflux favorisant l'élimination intestinale de substances provenant du sang [Chan et al, 2004]. ....	43
Figure 6 : Schéma d'une monocouche de cellules Caco-2 ensemencés sur un support poreux. Cette monocouche délimite le compartiment donneur du compartiment receveur. ....	47
Figure 7 : Modèle de lipolyse pour l'évaluation <i>in vitro</i> de formulations lipidiques. Le principe de cette méthode consiste à utiliser un récipient contenant un milieu de digestion lipidique (sels biliaires, phospholipides, lipases...) stabilisé à 37°C ainsi que le système lipidique à tester. Au niveau de ce récipient, l'activité des lipases pancréatiques sur les lipides exogènes et endogènes libère des acides gras libres qui font chuter le pH. Cette chute de pH est ensuite titrée par pHmétrie et réajustée par l'ajout d'une quantité équimolaire de soude [Porter et al, 2008]. ....	63
Figure 8 : Relations entre les principes émis par Porter dans la stratégie de formulation d'un système lipidique.....	67
Figure 9 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le polysorbate 80. Les barres représentent des moyennes $\pm$ ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). ....	79
Figure 10 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Cremophor® RH40. Les barres représentent des moyennes $\pm$ ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). ....	80
Figure 11 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Cremophor® EL. Les barres représentent des moyennes $\pm$ ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). ....	81
Figure 12 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Cremophor® ELP. Les barres représentent des moyennes $\pm$ ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). ....	82

Figure 13 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Soluphor® P. Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). .....	83
Figure 14 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Solutol® HS15. Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). .....	84
Figure 15 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour la Vitamine E TPGS®. Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). .....	85
Figure 16 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Transcutol® P. Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). .....	86
Figure 17 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Labrafil® M1944CS. Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). .....	87
Figure 18 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 1 (70% (m/m) Labrafil® M1944CS et 30% (m/m) Cremophor® ELP). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). .....	89
Figure 19 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 2 (70% (m/m) Labrafil® M1944CS et 30% (m/m) Solutol® HS15). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). .....	90
Figure 20 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 3 (70% (m/m) Labrafil® M1944CS et 30% (m/m) vitamine E TPGS). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). .....	91
Figure 21 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 4 (70% (m/m) Labrafil® M1944CS et 30% (m/m) Cremophor® RH40). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). .....	92
Figure 22 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 5 (60% (m/m) Labrafil® M1944CS et 40% (m/m) Cremophor® RH40). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). .....	93
Figure 23 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 6 (30% (m/m) Labrafil® M1944CS et 70% (m/m) Vitamine E TPGS®). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (* p<0,05). .....	94
Figure 24: Structure chimique de l'orlistat.....	100

Figure 25 : Représentation tridimensionnelle du complexe formé par le domaine thioestérase de l'AGS et l'orlistat.....	101
Figure 26 : Résultats des tests d'inhibition de croissance sur les cellules SW620 traitées avec l'orlistat (Roche et Sigma-Aldrich).....	111
Figure 27 : Résultats des tests d'inhibition de croissance sur les cellules SW480 traitées avec l'orlistat (Roche et Sigma-Aldrich).....	112
Figure 28 : Spectre de masse de l'orlistat .....	113
Figure 29 : Chromatogramme de masse de la transition m/z 518 → m/z 518 d'une solution d'HBSS simple et d'une solution d'HBSS à 0,96 µM d'orlistat.....	114
Figure 30 : Courbes de linéarité obtenues sur les trois jours de solutions d'orlistat préparées à partir de méthanol ou d'HBSS.....	117
Figure 31 : Pic obtenu lors de l'analyse d'une solution d'HBSS à 0,01 µM d'orlistat.....	120
Figure 32 : perméabilités apparentes de l'orlistat au travers de la monocouche de cellules Caco-2 pour les 8 formulations étudiées et la solution contrôle. La concentration en orlistat de chaque solution est de 100 µM. Les barres représentent des moyennes ±écart-type, n=3. ....	122
Figure 33 : Libération de la LDH exprimée en pourcentage par rapport à la quantité maximale relargée lors d'une lyse cellulaire totale. Les barres représentent des moyennes ±écart-type, n=3. ....	123
Figure 34 : perméabilités apparentes du LY au travers de la monocouche de cellules Caco-2 après le test de perméabilité de l'orlistat. La concentration en LY est de 0,04 % (m/v). Les barres représentent des moyennes ±écart-type, n=3. ....	124
Figure 35 : Valeurs de TEER mesurées après l'étude de perméabilité du LY (TEER2) et valeurs mesurées 12 heures après le TEER2 (TEER3). La concentration en orlistat de chaque solution est de 100 µM. Les barres représentent des moyennes ±écart-type, n=3. ....	125
Figure 36 : Structure chimique des bêta-lactones présentant une meilleure activité inhibitrice vis-à-vis de l'AGS et une solubilité aqueuse améliorée. ....	127

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Excipients pharmaceutiques utilisés dans la formulation des systèmes lipidiques .....	25
Tableau 2 : Classification des systèmes lipidiques selon Pouton [Pouton et al, 2006] .....	27
Tableau 3 : Exemples de principes actifs reconnus pour être sensibles au phénomène d'efflux [Chan et al, 2004].....	33
Tableau 4 : Marqueurs de perméabilité paracellulaire [Konsoula et al, 2005].....	55
Tableau 5 : Liste des 7 principes généraux que Porter et al proposent de suivre lors de la formulation d'un système lipidique [Cuiné et al, 2008 ; Porter et al, 2008] .....	66
Tableau 6 : Liste des excipients étudiés suivant le protocole de cytotoxicité .....	73
Tableau 7 : Composition des six formulations testées.....	74
Tableau 8 : Synthèse des résultats des tests de cytotoxicité pour les excipients seuls.....	96
Tableau 9 : Synthèse des résultats des tests de cytotoxicité pour les six formulations .....	98
Tableau 10 : Volumes prélevés pour préparer la gamme d'étalonnage de l'orlistat.....	104
Tableau 11 : Solutions préparées à partir des quatre formulations comportant qu'un seul excipient .....	106
Tableau 12 : Solutions préparées à partir des quatre formulations comportant une association d'excipients .....	107
Tableau 13 : Résultats de l'analyse chromatographique pour l'étude de linéarité du premier jour..	116
Tableau 14 : Résultats de l'analyse chromatographique pour l'étude de linéarité du deuxième jour	116
Tableau 15 : Résultats de l'analyse chromatographique pour l'étude de linéarité du troisième jour	116
Tableau 16 : Tests statistiques utilisés dans la détermination de la linéarité de la méthode de dosage .....	118
Tableau 17 : Résultats de l'analyse chromatographique pour l'étude de fidélité .....	119
Tableau 18 : comportement des formulations au contact de la phase aqueuse.....	121
Tableau 19 : Diamètres et indices de polydispersité des entités colloïdales formées à partir des 7 formulations .....	126

# **INTRODUCTION GENERALE**

---



Depuis plusieurs années, l'utilisation de systèmes lipidiques dans la conception de formulations médicamenteuses destinées à une administration par voie orale s'est largement répandue. De nombreuses spécialités pharmaceutiques utilisant cette technologie avec des substances actives telles que des agents antirétroviraux ou immunosuppresseurs sont actuellement commercialisées. Ces systèmes correspondent généralement à des formes pharmaceutiques liquides ou semi-solides contenues dans des capsules molles ou dures. Ces formulations sont préférées à des formes solides comme les poudres et les comprimés parce qu'elles permettent d'améliorer la biodisponibilité par voie orale de nombreux principes actifs lipophiles ou faiblement absorbés par voie orale. Le principal avantage de ces formes pharmaceutiques orales est de permettre un traitement ambulatoire pour lequel le patient peut poursuivre son traitement à domicile sans avoir à faire l'objet d'une hospitalisation durant laquelle les substances actives seraient administrées par voie intraveineuse. De plus, la prise d'un traitement par voie orale permet d'améliorer la compliance des patients. Par conséquent, les systèmes lipidiques apportent un réel progrès thérapeutique en contribuant ainsi à une amélioration de la « Santé Publique ».

La mise sur le marché de la première spécialité commerciale d'un système lipidique remonte à 1997. Il s'agissait du Néoral<sup>®</sup>, un immunosuppresseur indiqué dans les rejets de greffes d'organes, de tissus ou de moelle. Depuis, de nombreuses autres formulations de ces systèmes lipidiques ont été proposées. En effet, la mise au point de ces formulations n'est pas toujours évidente et se heurte souvent à des choix déterminants quant à leur efficacité, leur sécurité d'emploi et leur qualité. D'une part, ces choix doivent se faire en fonction des propriétés physicochimiques, de la perméabilité et de la métabolisation pré-systémique éventuelle du principe actif. D'autre part, la grande diversité des excipients disponibles rend plus difficile la conception de ces systèmes. De plus, de nombreux excipients sont connus pour améliorer la biodisponibilité par voie orale de certaines substances actives en agissant plus ou moins spécifiquement sur différents phénomènes de résistance médicamenteuse. Ces derniers correspondent soit à l'efflux, un système de « contre-transport » énergie-dépendant rejetant les molécules substrats hors des cellules à l'aide de protéines membranaires (p-glycoprotéine, BCRP...) soit à la métabolisation pré-systémique de certaines substances actives par des cytochromes intestinaux (CYP3A4...). Que ces excipients soient de nature amphiphile (Cremophor<sup>®</sup>, Labrasol<sup>®</sup>...) ou non (polyéthylène glycol...), ils sont capables d'inhiber ces protéines. De plus, Il est également important de souligner que la proportion des différents excipients au sein d'une formulation conditionne le type de systèmes obtenus (types I, II, III ou IV). En effet, certains confèrent une très bonne dispersion au contact des fluides gastro-intestinaux (type II et III), tandis que d'autres (type IV) peuvent conduire à la formation de gels visqueux ralentissant la

solubilisation et diminuant la surface de contact du principe actif. Par conséquent, le choix du type de formulation constitue aussi un élément stratégique de formulation.

La caractérisation de ces formulations permet aussi de mieux les définir et surtout de prédire leur devenir *in vivo*. Dans un premier temps, l'étude physicochimique de ces systèmes s'intéresse essentiellement à la solubilité du principe actif en milieux aqueux et à la distribution granulométrique des entités colloïdales formées à l'issue de leur contact avec un milieu aqueux. De telles informations permettent de mieux prédire la mise à disposition *in vivo* de la substance active. Dans un deuxième temps, l'étude de leurs propriétés biologiques qui se base sur les mécanismes à l'origine de l'absorption par voie orale d'une molécule, permet de mieux comprendre l'impact de certaines activités physiologiques sur la formulation. Pour cela, l'utilisation de modèles *in vitro* d'absorption intestinale comme celui des cellules Caco-2 permet d'évaluer les phénomènes de perméabilité et d'efflux. En effet, les cellules Caco-2 sont capables de former une monocouche homogène de cellules différenciées présentant de grandes similitudes avec les entérocytes intestinaux. Elles expriment de nombreux transporteurs dont la p-glycoprotéine et permettent, de ce fait, d'étudier les phénomènes d'efflux. Enfin, d'autres modèles comme ceux de métabolisation et de lipolyse gastro-intestinale permettent de déterminer les capacités d'une formulation à maintenir le principe actif sous forme solubilisée ou de le protéger des enzymes de dégradation.

L'objectif de mon travail de thèse était de mettre au point et de caractériser des formulations lipidiques destinées à une administration par voie orale. Ces travaux sont exposés dans une partie expérimentale qui a été scindée en deux études. La première partie traite de la cytotoxicité que peuvent présenter certains excipients sur des infrastructures cellulaires bien définies comme la membrane plasmique ou les jonctions serrées. Cette étude s'est aussi intéressée aux propriétés biologiques de mélanges d'excipients typiques de certains systèmes lipidiques. A l'issue de ces travaux, un protocole d'étude de la cytotoxicité d'excipients hydrosolubles a été mis au point. La deuxième partie s'est intéressée à l'orlistat, une substance lipophile et traversant très difficilement la barrière intestinale. L'intérêt de formuler l'orlistat de manière à augmenter sa biodisponibilité orale réside dans la récente découverte de ses propriétés anticancéreuses. Initialement commercialisé pour traiter l'obésité, l'orlistat constitue un exemple intéressant de médicament qui pourrait se voir attribuer une nouvelle application thérapeutique grâce à sa formulation sous forme de systèmes lipidiques.



# PARTIE

# BIBLIOGRAPHIQUE

---

L'objectif principal de cette partie est d'exposer les connaissances pluridisciplinaires actuelles du domaine de la formulation qui faciliteront aussi la compréhension de la partie expérimentale.

Dans un premier chapitre, les principes de la formulation des systèmes lipidiques destinés à la voie orale y sont présentés à travers les différentes problématiques que posent la nature physicochimique du principe actif, des excipients et du type de systèmes lipidiques mis en œuvre. Parallèlement à cette partie galénique, des considérations d'ordre biologique seront également abordées en mentionnant entre autre les effets de certains excipients sur les phénomènes de résistance médicamenteuse (efflux et métabolisation).

Le deuxième chapitre est consacré davantage à la caractérisation de ces formulations en étudiant leurs propriétés physicochimiques (granulométrie) et biologiques (perméabilité intestinale, cytotoxicité et lipolyse). En conclusion de cette partie, une stratégie générale de formulation des principes actifs lipophiles sera présentée.



# Chapitre 1: Formulations orales à base d'excipients lipidiques

La mise au point d'une formulation orale à base d'excipients lipidiques est complexe et doit tenir compte de nombreux facteurs. Cette partie traitera de ces facteurs qui jouent un rôle déterminant dans l'efficacité d'une forme pharmaceutique destinée à la voie orale. Ces paramètres sont :

- Les propriétés physicochimiques et biologiques du principe actif ;
- Le large choix des excipients pharmaceutiques disponibles pour la formulation ;
- La diversité des systèmes lipidiques destinés à renfermer le principe actif ;
- Les propriétés biologiques de certains surfactants.

## 1.1 Les principes actifs

Le principe actif est la molécule qui, dans un médicament, possède un effet thérapeutique, des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales mais également utilisée en vue d'établir un diagnostic médical ou encore de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action pharmaceutique, immunologique ou métabolique. Administrés par voie orale, ils ne traversent pas tous le tractus gastro-intestinal et ne présentent pas tous nécessairement une bonne biodisponibilité par voie orale. Un certain nombre de facteurs limitants sont à surmonter afin de favoriser leur absorption. Ces facteurs correspondent notamment à des problèmes de stabilité et de solubilité dans les fluides gastro-intestinaux ou à des phénomènes de résistances médicamenteuses se manifestant au niveau de l'intestin ou du foie [Stegemann et al. 2007].

Actuellement, environ 40% des nouvelles substances actives en cours de développement sont très peu hydrosolubles [Douroumis et al, 2006 ; Hauss et al, 2007 ; Stegemann et al. 2007]. Outre leur faible solubilité, ces substances présentent souvent une faible perméabilité qui explique les problèmes de faible biodisponibilité suite à une administration par voie orale. Les stratégies actuelles de recherche et de développement dans le domaine pharmaceutique sont concentrées davantage sur les cibles biologiques et sur le développement de substrats spécifiques à ces dernières. Ces stratégies conduisent à l'obtention de candidats médicaments chimiquement plus complexes présentant un poids moléculaire élevé, un nombre important de liaisons hydrogènes et/ou une lipophilie plus élevée. Ces propriétés contribuent à rendre les molécules moins perméables et moins hydrosolubles [Lipinski et al. 2000].

En 1995, un système de classification biopharmaceutique ou BCS (Biopharmaceutics Classification System) a été proposé par Gordon Amidon et al. afin de classer les principes actifs en fonction de leur perméabilité et de leur hydrosolubilité. Cette classification comprend quatre groupes (Figure 1) dont deux d'entre eux comportent des substances à caractère lipophile mentionnées précédemment. Il s'agit des composés de classe II BCS (faible solubilité et forte perméabilité) et de classe IV BCS (faibles solubilité et perméabilité) [Amidon et al, 1995].

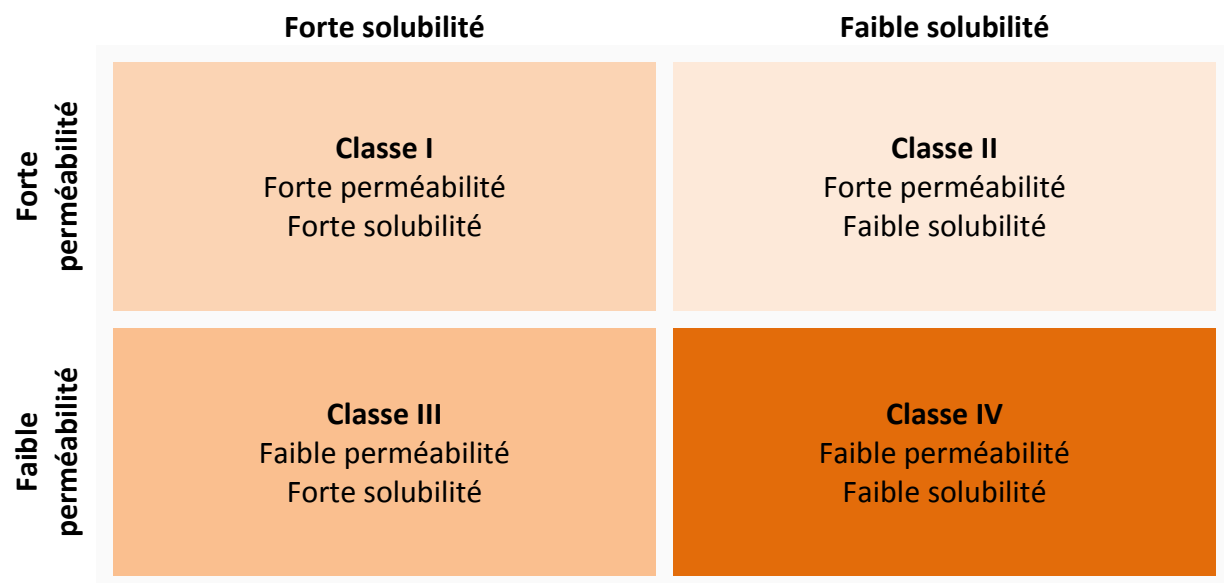


Figure 1 : Classification biopharmaceutique des substances actives (BCS) selon Amidon et al [Amidon et al, 1995]

La classification introduite par Amidon a par la suite inspiré d'autres auteurs. En effet, dès 2005, le système de classification biopharmaceutique pour la disposition des principes actifs ou BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) a été proposé (Figure 2). Dans cette classification améliorée, la notion de perméabilité initialement utilisée dans le cadre de la BCS a été remplacée par celle du métabolisme. Comme les données de métabolisme vues au sens large du terme (réactions de phase I et de phase II) étant plus facilement accessibles que celles de la perméabilité, cette classification est plus représentative des phénomènes d'absorption, d'élimination et de transport du principe actif [Wu et al, 2005 ; Benet et al, 2008]. Dans cette nouvelle classification, la majorité des substances lipophiles des classes II et IV BCS se retrouvent respectivement dans les classes II et IV BDDCS.

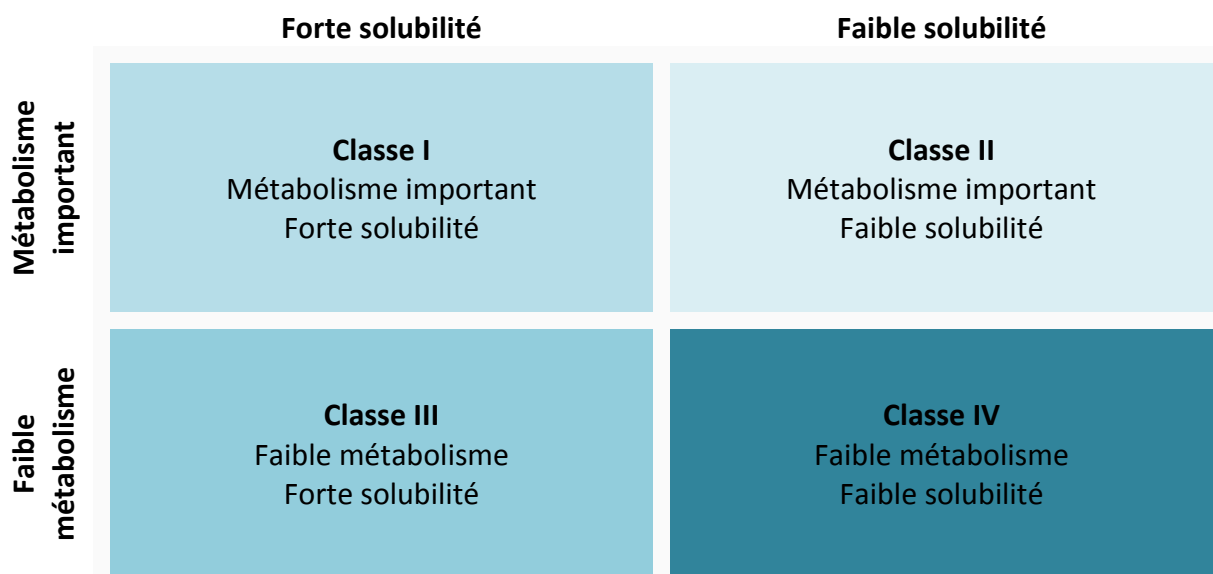


Figure 2 : Classification biopharmaceutique pour la disposition des principes actifs (BDDCS) selon Benet et al [Benet et al, 2008]

## 1.2 Excipients pharmaceutiques

Un excipient pharmaceutique correspond à toute substance autre que le principe actif ou la pro-droque qui rentre dans le procédé de fabrication ou la composition de la forme pharmaceutique finale. Mis à part les rôles de liant, de désintégrant, de diluant, de lubrifiant ou de conservateur, un excipient peut aussi être utilisé comme émulsifiant ou solubilisant. La mise en forme galénique de substances lipophiles et/ou faiblement perméables se réalise généralement à l'aide de solvants organiques miscibles à l'eau, de surfactants non-ioniques, de lipides insolubles dans l'eau, de liquides/semi-solides organiques, de cyclodextrines et de produits permettant un ajustement du pH. Au final, les mélanges principe actif/excipients sont idéalement formulés dans des capsules de gélatine d'un volume allant de 0,19 à 5,0 mL afin de permettre une administration par voie orale [Strickley et al, 2004].

Au sein de chacune de ces catégories d'excipients, il y a une grande diversité de produits présentant des propriétés physicochimiques variables et dont le choix peut être déterminant dans la formulation d'un principe actif.

### 1.2.1 Les solvants organiques miscibles à l'eau ou « co-solvants »

Les solvants organiques miscibles à l'eau (Tableau 1), également appelés co-solvants hydrosolubles, ont été utilisés dans de nombreuses formulations destinées à la voie orale pour solubiliser des substances lipophiles comme des agents anticonvulsivants, des substances antinéoplasiques ou encore des substances cardiotoniques. La majorité des excipients hydrosolubles sont d'origine

synthétique ou héli-synthétique et peuvent se présenter sous diverses formes (glycéride, alcools, polyéthylène glycol 400 ou encore dénommé PEG 400,...) [Haus et al, 2007]. Du fait de sa bonne tolérance, le PEG 400 est le solvant le plus couramment utilisé parmi les excipients autorisés et disponibles commercialement. Par contre, d'autres co-solvants sont moins couramment utilisés. A titre d'exemple, l'éthanol ne peut pas être utilisé à trop forte concentration dans les capsules molles. En effet, du fait de sa volatilité, il peut diffuser facilement à l'extérieur de ces dernières et conduire à une modification de la formulation.

Rares sont les médicaments, comme le VePesid<sup>®</sup>, formulés avec seulement des solvants organiques hydrosolubles. En général, ces excipients sont associés à des surfactants et/ou des huiles [Strickley et al, 2004].

### **1.2.2 Les excipients huileux**

D'origine naturelle ou synthétique, ces excipients sont insolubles dans l'eau. Principalement utilisés comme agents solubilisants, ces excipients sont représentés principalement par des acides gras à longues chaînes, des triglycérides à chaînes longues et moyennes, des huiles et certaines vitamines liposolubles (Tableau 1). Ces excipients huileux sont utilisés dans des compositions de médicaments dont les substances actives ont des propriétés thérapeutiques antivirales, anti-acnéiques, anti-lépreuses, antinéoplasiques, anticonvulsivants et hormonales [Strickley et al, 2004].

Les excipients lipophiles peuvent présenter des caractéristiques physicochimiques très diverses. En effet, les huiles naturelles se distinguent par leur mélange en triglycérides qui peuvent contenir des acides gras de longueur de chaîne et de degré d'insaturations variables. Ces paramètres influent beaucoup sur leur point de fusion [Haus et al, 2007]. De plus, les triglycérides à chaînes longues et moyennes peuvent présenter des propriétés solubilisatrice et pharmacocinétique différentes en fonction des principes actifs concernés. Le seocalcitol, substance de la classe II de la classification biopharmaceutique, fait partie des molécules ne présentant pas de différences en termes de biodisponibilité et de solubilité que ce soit en présence de chaînes longues ou moyennes [Grove et al, 2005]. Ce fait n'est pas toujours observé avec d'autres substances actives. La longueur de chaîne des triglycérides présents dans la phase lipophile peut altérer la biodisponibilité des principes actifs faiblement hydrosolubles. A titre d'exemple, pour la cyclosporine A, l'halofantrine et la cinnarizine, l'utilisation de triglycérides à longues chaînes permet d'obtenir une biodisponibilité supérieure à celle qui est obtenue en utilisant des triglycérides à chaînes moyennes. Ce phénomène peut être attribué soit à la stimulation de l'absorption par voie lymphatique soit à une meilleure solubilisation des principes actifs dans des micelles mixtes [Behrens et al, 1996 ; Caliph et al, 2000 ; Kaukonen et al, 2004]. Inversement, pour la griséofulvine, la progestérone, le diazépam et le danazol, les triglycérides

à chaînes moyennes permettent une meilleure biodisponibilité. Les processus de digestion et les produits qui en résultent permettent d'expliquer ces observations du fait des différences d'affinité des lipases gastro-intestinales vis-à-vis des triglycérides (voir section 2.2.3.1) [Kaukonen et al, 2004 ; Dahan et al, 2006 ; Dahan et al, 2007]. Par conséquent, en termes de solubilisation, le choix des triglycérides peut avoir une forte influence pour la biodisponibilité des principes actifs. En général, les triglycérides à longues chaînes sont préférentiellement utilisés pour solubiliser des substances actives très lipophiles, alors que les triglycérides à chaînes moyennes sont généralement utilisés pour des molécules moins lipophiles.

Toutefois, l'utilisation de triglycérides comparée à des composés plus amphiphiles n'a pas connu un grand essor. Les raisons principales résident dans leur faible capacité à solubiliser certaines molécules lipophiles, dans la nécessité d'une lipolyse afin de promouvoir le transfert des principes actifs vers la phase aqueuse et dans des problèmes de stabilité liés à la présence d'insaturations (doubles liaisons) [Porter et al, 2008].

### **1.2.3 Les surfactants non-ioniques**

Principalement d'origine semi-synthétique, les surfactants non-ioniques se définissent comme des composés amphiphiles, non chargés et capables de réduire la tension superficielle entre une phase aqueuse et une phase organique. Ils se caractérisent par leur balance hydrophile/lipophile ou HLB (balance hydrophile/lipophile) et leur concentration micellaire critique (CMC). L'HLB permet de caractériser les tendances hydrophiles et lipophiles d'un surfactant. Plus l'HLB est élevée, plus le surfactant possède un caractère hydrophile. Inversement, plus l'HLB est faible, plus le surfactant possède un caractère lipophile. Quant à la CMC, elle correspond à la concentration minimale pour que le surfactant forme des agrégats appelés micelles. Ces deux paramètres influent beaucoup sur la solubilisation de substances lipophiles.

Les surfactants sont capables de s'auto-assembler sous formes de micelles mais aussi de rendre des systèmes composés d'huile et/ou de co-solvant, auto-émulsifiants. De plus, ces excipients jouissent d'une riche diversité de structures et de propriétés physicochimiques du fait des possibilités élevées de greffage et de polymérisation des glycérides ou des acides gras. Pour ces raisons, les surfactants non-ioniques sont largement utilisés dans la formulation de systèmes lipidiques [Strickley et al, 2004].

De nombreux surfactants peuvent aussi agir comme promoteurs d'absorption en augmentant la fluidité membranaire des cellules épithéliales. Ce phénomène permet d'améliorer significativement la perméabilité transcellulaire de molécules lipophiles. Ainsi, en plus de leur propriété solubilisante,

les surfactants peuvent favoriser le passage de substances faiblement hydrosolubles au travers de la barrière intestinale (voir section 1.4.2.1) [Duizer et al, 1998].

Le Tableau 1 représente une liste non-exhaustive de surfactants non-ioniques utilisés dans le domaine pharmaceutique. Il est important de noter que certains excipients classés comme surfactants, peuvent être considérés et utilisés comme des huiles. En effet, le Labrafil® M1944CS qui a une valeur d'HLB environ égale à 3-4, peut agir aussi bien comme agent surfactant ou solubilisant huileux.



Tableau 1 : Excipients pharmaceutiques utilisés dans la formulation des systèmes lipidiques

Catégorie	Nom chimique	Nom commun ou commercial	HLB	CMC (% m/m)
<i>Solvants organiques miscibles à l'eau</i>	PEG 300, PEG 400			
	Ethanol			
	Propylène glycol			
	Glycérine			
	...			
<i>Excipients huileux</i>	Acide oléique			
	Triglycérides à chaînes longues	Huile de maïs, huile de ricin, Peceol®, Maisine®...		
	Triglycérides à chaînes moyennes	Labrafac®, Miglyol® 810, Miglyol® 812, Crodamol® GTCC-PN,		
	Vitamines liposolubles	d- $\alpha$ -tocophérol (vitamine E)		
	...			
<i>Surfactants non-ioniques</i>	Polysorbate	Tween® 20, Tween® 80	16,1 15,0	0,005
	Dérivés d'huile de ricin polyoxyéthylénés	Cremophor® EL, Cremophor® ELP Cremophor® RH40	12-14	0,009
	Mono-, di- et triglycérides et mono- et diesters de PEG	Labrafil® M1944CS, Labrafil® M2125CS, Labrasol®, Gelucire® 44/14	3-4 3-4 14 14	0,005
	Succinate de polyéthylène glycol 1000 de d- $\alpha$ tocophérol	Vitamine E TPGS®	13	0,02
	Hydroxystéarate de PEG-15	Solutol® HS15	14-16	0,005-0,02
	Poloxamère	Pluronic®		
	...			

#### **1.2.4 Les cyclodextrines**

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques présentant une cavité centrale hydrophobe et une surface externe hydrophile. Ces sucres sont capables de solubiliser des substances lipophiles en les logeant au sein de leur cavité hydrophobe [Strickley et al, 2004]. Ces excipients ne seront pas traités plus en détail dans ce manuscrit du fait de leur caractère « non lipidique ».

Au final, la diversité des excipients pharmaceutiques permet la formulation de substances peu solubles dans une phase aqueuse. Elle donne aussi l'opportunité d'agir sur plusieurs paramètres (HLB, CMC, proportion huile/surfactant...) afin d'optimiser une forme pharmaceutique et de conduire à une efficacité *in vivo* adéquate.

### **1.3 Systèmes lipidiques**

L'idée du développement des systèmes lipidiques en tant que forme pharmaceutique vient d'observations faites sur des patients prenant leur traitement accompagné de repas riches en graisses. Il a été effectivement rapporté que la biodisponibilité orale de principes actifs lipophiles comme le danazol est augmentée lorsque l'administration de ce dernier est accompagnée d'aliments gras. Ces derniers permettent entre autres de rallonger le temps de vidange gastrique et ainsi de favoriser la solubilisation et l'absorption de la substance active au niveau du tractus gastro-intestinal [Sunesen et al, 2005]. Ainsi, les formes pharmaceutiques à base de lipides ont permis très rapidement la formulation de substances lipophiles. Ces formes présentent des propriétés particulières. Elles peuvent modifier la composition du contenu gastro-intestinal, interagir avec des transporteurs membranaires et/ou stimuler le transport des principes actifs par la voie lymphatique [Porter et al, 2007]. Ainsi, leur capacité à améliorer la biodisponibilité orale de principes actifs peu hydrosolubles ou lipophiles a contribué à leur essor. De plus, ils apportent une alternative intéressante par rapport aux formes injectables et permettent, du fait de leur administration orale sous forme de capsules molles ou dures, d'améliorer la compliance des patients. Enfin, dans la formulation de peptides thérapeutiques, ces systèmes apportent une protection vis-à-vis des dégradations enzymatiques [Gao et al, 1998 ; Porter et al, 2008].

#### **1.3.1 Le système de classification des systèmes lipidiques**

En 2000, Pouton a établi un système de classification des systèmes lipidiques. Amélioré par la suite en 2006, ce système regroupe les formulations en fonction de leur composition, de leur comportement lors d'une dilution et de la distribution granulométrique des entités colloïdales formées au contact d'une phase aqueuse. Cette classification se compose de quatre types de formulations (Tableau 2) [Pouton et al, 2000 ; Pouton et al, 2006].

Tableau 2 : Classification des systèmes lipidiques selon Pouton [Pouton et al, 2006]

	Type I	Type II	Type III A	Type III B	Type IV
<b>Composition des formulations (% , m/m)</b>					
Excipients lipophiles	100	40-80	40-80	<20	-
Surfactants lipophiles (HLB<12)	-	20-60	-	-	0-20
Surfactants hydrophiles HLB>12)	-	-	20-40	20-50	30-80
Co-solvant	-	-	0-40	20-50	0-50
<b>Autres dénominations</b>		SEDDS	SMEDDS®		
<b>Taille des particules dispersées</b>		>100nm	<100nm	50-100nm	

Les **formulations de type I** correspondent à des systèmes comportant une forte proportion de phase lipophile (triglycérides...). De très faibles concentrations de surfactants (de l'ordre de 1%) peuvent être présentes pour des raisons de stabilité. Ces systèmes présentent les avantages d'être biocompatibles et simples à préparer. Mais ils ne permettent généralement ni une bonne dispersion ni une nette amélioration de la biodisponibilité du principe actif. En fait, ce ne sont pas au sens strict du terme des systèmes auto-émulsionnés contrairement aux **formulations de type II**. Ces dernières sont aussi connues sous le nom de SEDDS (Self-Emulsifying Drug Delivery Systems). Ils correspondent à des mélanges isotropiques d'une phase huileuse et de surfactants lipophiles (HLB<12) formant une émulsion L/H en contact d'une phase aqueuse. La proportion de surfactants utilisés est en général supérieure à 25%. Une forte proportion de surfactants peut amener à des difficultés d'émulsification du fait de la formation au niveau de l'interface huile/eau, de gels plus ou moins visqueux en fonction du surfactant utilisé. Ces systèmes conviennent tout à fait à la formulation de principes actifs lipophiles qui peuvent par la suite être encapsulés dans des capsules molles ou des gélules constituant des formes orales adaptées à la thérapeutique. Ces systèmes se distinguent par leur lipophilie et leur capacité d'auto-émulsification. Les **formulations de type III**, aussi connues sous le nom de SMEDDS® (Self-MicroEmulsifying Drug Delivery Systems), incorporent une phase huileuse, des surfactants plus hydrophiles et des co-solvants (éthanol, polyethylene glycol...) [Pouton et al, 2006]. Les SEDDS (Type II) et les SMEDDS® (Type III) se distinguent par la clarté optique de la dispersion résultante de leur mise en contact avec une phase aqueuse et de la taille des particules qui s'y sont formées. Ainsi, les SEDDS permettent l'obtention de dispersions plutôt opaques avec des particules de tailles supérieures à 100 nm de diamètre, tandis que les SMEDDS® confèrent la formation de particules plus petites avec une taille inférieure à 100 nm et l'obtention d'une dispersion optiquement transparente ou légèrement opalescente. Enfin, les **formulations de type IV** contiennent une forte quantité de surfactants hydrophiles et/ou de co-solvant. Mais elles

n'incorporent pas d'excipients lipophiles et se caractérisent par leur forte hydrophilie [Porter et al, 2008].

A ce jour, les principaux systèmes lipidiques destinés à être encapsulés dans une forme solide (gélules ou capsules molles) pour administration orale, peuvent être classés en deux grands groupes :

- Les systèmes auto-émulsifiants, qui se retrouvent parmi les formulations de type II et III.
- Les systèmes micellaires, assimilables aux formulations de type IV.

### **1.3.2 Systèmes auto-émulsifiants**

Les systèmes auto-émulsifiants regroupent les SEDDS (type II) et les SMEDDS® (type III). Ils ont été largement utilisés en vue d'améliorer la biodisponibilité orale de substances actives faiblement hydrosolubles. Ces formulations auto-émulsifiantes correspondent à des mélanges isotropiques d'huiles avec des surfactants et/ou des co-solvants qui ont la propriété de s'émulsifier spontanément au contact des fluides gastro-intestinaux afin de former des émulsions ou des microémulsions L/H [Constantinides et al, 1995 ; Pouton et al, 1997 ; Gursoy et al, 2004]. Ces microémulsions correspondent à des dispersions isotropiques et thermodynamiquement stables. Ces entités formées *in situ* au niveau du tractus gastro-intestinal assurent la solubilisation du principe actif [Strickley et al, 2004].

Ces systèmes présentent l'avantage de pouvoir incorporer une plus forte quantité de principes actifs lipophiles qu'avec des systèmes non émulsionnés de type I [Pouton et al, 2000]. Une émulsification rapide de ces systèmes sous une agitation modérée et en présence d'une phase aqueuse comme les fluides gastro-intestinaux génère une grande surface de contact pour la formulation. Ceci contribue à améliorer le taux d'absorption de la substance active et permet d'obtenir des profils d'absorption plus reproductibles [Porter et al, 2008].

Les SEDDS et les SMEDDS® ont largement contribué à l'amélioration de la biodisponibilité orale de nombreux principes actifs faiblement hydrosolubles. L'un des exemples de SMEDDS® le mieux connu et commercialement disponible est le Neoral®. Il s'agit d'une formulation de la cyclosporine A, substance utilisée comme immunosuppresseur. Composé d'huile de maïs comme phase huileuse, d'huile de ricin hydrogénée et polyéthoxylénée comme surfactant (Cremophor® RH40), d'éthanol et de propylène glycol comme co-solvant, cette spécialité pharmaceutique permet au contact des fluides gastro-intestinaux une dispersion rapide et thermodynamiquement stable de la cyclosporine A avec des tailles de particules inférieures à 100 nm. Par rapport à une autre spécialité de la cyclosporine A non formulée sous forme de SMEDDS® (Sandimmun®), le Neoral® permet une bonne dispersion de la substance active. Cette propriété permet d'expliquer la meilleure absorption et la

réduction des variations inter- et intra-patients de la biodisponibilité observées après administration orale du Neoral® [Mueller et al, 1994 ; Kovarik et al, 1994]. D'autres phénomènes peuvent aussi expliquer ces observations. En fait, certains excipients du Neoral® peuvent agir sur les phénomènes de résistance médicamenteuse qui se développent au cours d'un traitement. Ce point sera abordé plus en détail dans une partie ultérieure (voir section 1.4.2).

Les principaux systèmes auto-émulsifiants commercialisés sont le Néoral® (cyclosporine), le Norvir® (ritonavir) et le Fortovase® (saquinavir).

### **1.3.3 Formes micellaires**

Les formes micellaires correspondent à des formulations de type IV. Elles permettent de solubiliser une quantité plus importante de principe actif par rapport aux formulations de type I et, tout comme les formulations de type III, de très fines dispersions sont obtenues au contact d'un milieu aqueux. Ces caractéristiques semblent permettre une libération rapide des principes actifs de la formulation et une meilleure absorption [Gao et al, 1998]. En pratique, la dispersion de ces systèmes ne se fait pas aisément. Dans une étude sur les systèmes micellaires, deux formulations du danazol contenant uniquement du Cremophor® RH 40 ou du Cremophor® EL n'ont présenté étonnement qu'une faible biodisponibilité par voie orale. En comparant l'administration du danazol à l'aide d'une capsule molle et celle d'une solution micellaire pré-dispersée, il fut observé que la forme pré-dispersée était plus efficace. Ceci permet de conclure qu'une telle formulation présente une très faible capacité de dispersion [Cuiné et al, 2008]. Ces données sont en accord avec des études préliminaires montrant qu'un gel visqueux se forme à la surface des surfactants en cours de dissolution. Ce phénomène limite la pénétration de l'eau dans la masse de surfactants et réduit ainsi le pouvoir de dispersion et de dissolution des formulations riches en surfactants [Gursoy et al, 2004]. Par la suite, les mêmes auteurs ont étudié l'impact de l'ajout d'un co-surfactant à ce type de formulation afin d'améliorer la dispersion du système. Il en a résulté une amélioration du pouvoir dispersant comparé à une formulation ne comportant qu'un seul surfactant. L'association d'un co-surfactant ne permet pas d'obtenir de meilleurs résultats en termes de biodisponibilité qui sont, par contre, observés avec l'association avec des triglycérides à longues chaînes (SEDDS ou SMEDDS®) [Cuiné et al, 2008]. Ceci suggère que l'inclusion d'une faible quantité de lipides sensibles à la lipolyse serait nécessaire pour une absorption maximale du principe actif.

A ce jour, peu d'études comparatives ont été menées par rapport aux formulations de type II et III. Cependant, des spécialités commerciales de formulation de type IV sont disponibles sur le marché. Un inhibiteur de protéase du VIH, l'amprenavir, présenté sous forme de capsule molle et commercialisé sous le nom d'Agenerase®, en est un exemple. L'Agenerase® est composé de Vitamine

E TPGS® en tant que surfactant, de PEG 400 et de propylène glycol en tant que co-solvant [Strickley et al, 2004 ; Porter et al, 2008].

## **1.4 Mécanismes amenant à une amélioration de la biodisponibilité par voie orale**

La faible biodisponibilité de certains médicaments administrés par la voie orale s'explique souvent soit par des problèmes de solubilité inhérents aux propriétés physicochimiques de la substance active (voir section 1.1) soit par des phénomènes de résistances médicamenteuses.

Un principe actif ne peut franchir les membranes biologiques que s'il est solubilisé au niveau des fluides gastro-intestinaux [Porter et al, 2007]. Les composés de la classe II et IV BCS (voir section 1.1) sont les plus concernés par les problèmes de trop faible solubilité [Amidon et al, 1995]. La forte lipophilie de ces composés constitue un obstacle majeur dans l'obtention d'une bonne biodisponibilité par voie orale. Pour résoudre ces problèmes, une grande variété d'excipients solubilisants peut être utilisée [Dressman et al, 2000 ; Strickley et al, 2004].

De nombreuses substances actives font l'objet de résistances médicamenteuses développées par l'organisme. Initialement, ces réactions physiologiques ont un but de protection vis-à-vis de substances exogènes potentiellement toxiques. Elles se manifestent généralement par une activité synergique des phénomènes d'efflux et de réactions de métabolisation pré-systémique. Ces deux mécanismes contribuent fortement à diminuer la biodisponibilité orale de nombreux principes actifs [Benet et al, 2001 ; Benet et al, 2004 ; Sun et al, 2004].

### **1.4.1 Augmentation de la solubilité des principes actifs**

La solubilité d'un principe actif lipophile peut être augmentée par la mise au point de systèmes lipidiques utilisant des excipients solubilisants comme les surfactants non-ioniques, les excipients lipophiles, les co-solvants ou encore les cyclodextrines (voir section 1.2.4) [Strickley et al, 2004]. Ces excipients permettent de réduire les forces intermoléculaires qui sont en jeu lorsque le principe actif est sous forme solide et ainsi d'améliorer son taux de solubilisation [Porter et al, 2007].

Comme mentionné précédemment (voir section 1.3), une alimentation riche en lipides peut augmenter la solubilisation et la biodisponibilité de certains principes actifs. De plus, les systèmes lipidiques peuvent aussi augmenter leur dissolution gastro-intestinale en stimulant divers processus physiologiques. Ils peuvent favoriser la sécrétion endogène de sels biliaires ou de phospholipides. La combinaison de lipides exogènes et endogènes peut amener à la formation d'entités colloïdales comme des micelles mixtes permettant de solubiliser le principe actif [Porter et al, 2007].

Pour évaluer l'efficacité de l'effet solubilisant des formulations, il existe des milieux de dissolution permettant de prédire le comportement *in vivo* d'un principe actif peu soluble dans l'eau. Ces milieux permettent d'étudier la solubilité d'une molécule dans l'estomac ou dans l'intestin. De plus, il est possible de simuler les conditions « à jeun » ou « après un repas » en faisant varier leur composition et leur osmolarité. Ces solutions qui seront traitées dans le chapitre suivant (voir section 2.1.2), contiennent du taurocholate de sodium, de la lécithine, de l'acide acétique et divers sels. Ces essais de dissolution présentent une bonne corrélation *in vitro* / *in vivo*. Ces essais donnent des résultats d'autant plus exacts pour les substances de la classe II BCS. Par conséquent, ces essais peuvent s'avérer particulièrement utiles lors du développement d'une formulation [Dressman et al, 2000]. La détermination de la perméabilité *in vitro* utilisant des modèles d'absorption intestinale comme celui des cellules Caco-2 (voir section 2.2.1.1.3), peuvent être mis à profit pour étudier la solubilité. Ces essais de perméabilité ne permettent pas d'évaluer directement la solubilisation du principe actif. Une amélioration du passage au travers de la monocouche cellulaire signifie que les différents composants de la formulation ont permis une dissolution efficace de la substance [Saha et al, 2000]. Ces essais *in vitro* présentent beaucoup d'intérêts parce qu'en plus d'étudier les phénomènes de solubilisation, ils permettent aussi de diminuer le nombre d'expérimentations animales.

#### **1.4.2 Impacts sur les phénomènes de résistance médicamenteuse**

Pour de nombreuses pathologies, le développement de phénomènes de résistance médicamenteuse est un problème majeur. De nombreux principes actifs comme les agents anticancéreux voient leur biodisponibilité par voie orale diminuée suite à des phénomènes d'efflux et de métabolisation pré-systémique. Les phénomènes d'efflux sont médiés par des transporteurs très peu spécifiques présents au niveau de l'épithélium intestinal. Ces protéines transportent les principes actifs du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, empêchant de cette façon leur absorption [Sun et al, 2004 ; Chan et al, 2004]. Les réactions de métabolisation contribuent aussi par des réactions enzymatiques à diminuer la biodisponibilité d'une substance active en le dégradant en métabolite inactif [Benet et al, 2004]

##### **1.4.2.1 Les protéines d'efflux**

Les transporteurs membranaires les plus largement connus et impliqués dans les phénomènes d'efflux appartiennent à la superfamille des protéines ABC (ATP-Binding Cassette). Ces protéines utilisent l'ATP comme source d'énergie pour pouvoir assurer le transport unidirectionnel de leur substrat. Cette superfamille se subdivise en plusieurs sous-familles de protéines classées en fonction de leur homologie de séquence. Parmi ces groupes, les transporteurs responsables du phénomène d'efflux sont la p-glycoprotéine (p-gp), la « Multi-Resistance Protein 2 » (MRP 2) et la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). Localisés sur le pôle apical des cellules épithéliales, ces transporteurs

jouent donc un rôle important dans le devenir de certains médicaments dans l'organisme [Chan et al, 2004].

La **p-gp** est une protéine de 170-180 kDa possédant une partie cytosolique renfermant le site de fixation de l'ATP nécessaire à l'efflux [Sun et al, 2004]. Cette protéine est fortement exprimée dans les tumeurs cancéreuses mais également dans de nombreux tissus normaux tels que l'épithélium intestinal, la barrière hémato-encéphalique, le foie ou le rein. Au niveau des tissus normaux, la p-gp détient un rôle d'excrétion ou de barrière protectrice vis-à-vis de l'organisme en limitant l'absorption de substances exogènes ou de toxines. Cependant, elle participe aussi aux phénomènes de résistance médicamenteuse en effluant de nombreux principes actifs. Cette résistance est surtout rencontrée au niveau des cellules cancéreuses où la p-gp est généralement fortement exprimée. La p-gp possède une large spécificité. Toutefois, la majorité des substrats de la p-gp partagent une structure commune. Ils possèdent généralement un caractère organique amphiphatique avec une partie plane hydrophobe et sont neutres ou chargés positivement [Chan et al, 2004]. Les principes actifs concernés appartiennent à des classes thérapeutiques très diverses (anticancéreux, antiviraux, antibiotiques...) (Tableau 3). Cette propriété d'efflux associée à sa très grande diversité de localisation, d'expression et à sa faible spécificité, fait de la p-gp une des principales protéines impliquées dans les phénomènes de résistance médicamenteuse [Sun et al, 2004 ; Chan et al, 2004].

A ce jour, 13 transporteurs **MRP** ont été découverts. Seule la protéine MRP2 est exprimée sur le pôle apical des cellules épithéliales intestinales et participe ainsi à l'efflux. Ces derniers présentent aussi une large spécificité de substrats. MRP2 permet l'efflux de nombreuses substances actives comme les anticancéreux, les inhibiteurs de protéases anti-VIH ou encore des fluoroquinolones (Tableau 3) [Chan et al, 2004]. De plus, cette spécificité se superpose à celle de la p-gp, bien qu'elle en reste distincte. La MRP2 peut exercer un effet synergique avec la p-gp lorsque son expression et sa compatibilité de substrats sont similaires [Taipalensuu et al, 2001 ; Chan et al, 2004].

La BCRP est une protéine de 72 kDa qui, à la différence de la p-gp et de la MRP2, ne possède qu'un seul site de fixation à l'ATP. Cette protéine est très largement exprimée au niveau de la membrane plasmique des cellules néoplasiques. Elle est aussi localisée au niveau des tissus normaux comme le placenta, l'épithélium intestinal ou les vaisseaux sanguins. Également impliquée dans l'efflux de diverses molécules dont de nombreuses substances actives (Tableau 3), la BCRP a préférentiellement pour substrat des composés neutres ou chargés négativement et des métabolites sulfatés. Le rôle de la BCRP et de la MRP2 pourrait être sous-estimé par rapport à celui de la p-gp parce qu'en fonction de la localisation sur le tractus gastro-intestinal, leur expression peut être bien supérieure à celle de



la p-gp. Ainsi, leurs implications dans les phénomènes de résistance médicamenteuse n'est pas négligeable [Chan et al, 2004 ; Mao et al, 2005 ; Gutmann et al, 2005 ; Taipalensuu et al, 2001].

**Tableau 3 : Exemples de principes actifs reconnus pour être sensibles au phénomène d'efflux [Chan et al, 2004]**

	<b>p-gp</b>	<b>MRP2</b>	<b>BCRP</b>
<b>Anticancéreux</b>			
Vinblastine	Substrat	Substrat	
Vincristine	Substrat	Substrat	
Daunorubicine	Substrat		Substrat
Doxorubicine	Substrat	Substrat	Substrat
Etoposide	Substrat	Substrat	Substrat
Teniposide			Substrat
Cisplatine		Substrat	
Methotrexate	Substrat		Substrat
Mitoxantrone	Substrat		Substrat
Paclitaxel	Substrat		
Topotecan	Substrat		Substrat
<b>β-bloquants</b>			
Celiprolol	Substrat		
Talinolol	Substrat		
<b>Antiviraux</b>			
Indinavir	Substrat	Substrat	
Nelfinavir	Substrat		
Ritonavir	Substrat	Substrat	
Saquinavir	Substrat	Substrat	
Adefovir		Substrat	
Cidofovir		Substrat	
<b>Antibiotiques</b>			
Ciprofloxacine			
Grepafloxacine	Substrat	Substrat	
Sparfloxacine	Substrat		
Levofloxacine	Substrat		
Erythromycine	Substrat		

Le chevauchement des spectres d'activité de ces 3 transporteurs d'efflux fait qu'une seule et même molécule, substrat de ces protéines, peut rencontrer des difficultés majeures à franchir la barrière intestinale. De plus, ces difficultés sont amplifiées, lorsque la substance active est sensible aux enzymes de métabolisation pré-systémique.

#### **1.4.2.2 Les enzymes de métabolisation intestinale**

Lors des études du métabolisme des médicaments, une grande importance est souvent apportée à l'activité hépatique. Par contre, l'activité du métabolisme intestinal ou pré-systémique n'est pas étudiée en routine et cette négligence peut s'avérer lourde de conséquences dans des études de prédiction *in vitro* / *in vivo*. En effet, une grande partie des substances de la classe II BDDCS (voir section 1.1) est métabolisée au niveau de l'intestin. Parmi ces substances, de nombreux

immunosuppresseurs, benzodiazépines et antiviraux sont retrouvés. Au niveau intestinal, les réactions de métabolisation qui ont lieu, impliquent des enzymes de phase I et II comme celles de la superfamille des cytochromes P450 ou des glutathion-S-transférases. La CYP3A, une sous-famille des cytochromes P450, comporte la CYP3A4, une enzyme exprimée de façon prédominante au niveau de l'intestin. Elle représente environ 80% de tous les cytochromes P450 intestinales. Cette sous-famille se caractérise par leur très large spécificité de substrats et détient un rôle majeur dans la métabolisation médicamenteuse chez l'homme. 40-50% des principes actifs commercialisés font l'objet d'une réaction d'oxydation par ces enzymes. De plus, leur expression peut être induite par l'administration chronique de principes actifs de natures diverses comme des anticonvulsivants, des glucocorticoïdes ou certains antibiotiques. Comme ces inductions sont propres à chaque thérapeutique, elles peuvent différer d'un individu à l'autre. Ceci permet aussi d'expliquer les variabilités d'expression interindividuelle des CYP3A [Thummel et al, 1998 ; Galetin et al, 2006]. Par conséquent, les réactions de métabolisation pré-systémique sont des facteurs importants à prendre en compte dans l'étude des résistances médicamenteuses parce que les CYP3A intestinales peuvent agir sur la biodisponibilité (potentielles interactions médicamenteuses...) de nombreuses substances actives de façon très variable en fonction de leur degré d'expression propre à chaque individu [Thummel et al, 1998].

A ce jour, il n'existe pas de modèle *in vitro* approprié afin de prédire fidèlement les réactions de métabolisation pré-systémique. Un tel modèle devrait tenir compte de nombreux facteurs comme la variation d'expression des enzymes le long du tractus gastro-intestinal, les différences interindividuelles d'activité et le rôle du phénomène d'efflux [Galetin et al, 2006]. Quelques modèles de prédiction *in vitro* mettant en jeu des microsomes humains ont été proposés [Obach et al, 2006]. Toutefois ces tests sont loin de tenir compte des facteurs cités précédemment.

Un autre phénomène visant à diminuer encore plus l'absorption des substances actives est la synergie qui existe entre la CYP3A4 et la p-gp au niveau de l'épithélium intestinal. En effet, la p-gp permet d'augmenter l'exposition du principe actif à la métabolisation par la CYP3A4 à travers des cycles répétés d'absorption et d'efflux [Benet et al, 2001 ; Sun et al, 2004]. Cette synergie est amplifiée par le fait que ces deux protéines partagent de nombreux substrats communs [Chan et al, 2004 ; Wu et al, 2005] et que leurs gènes sont largement exprimés tout le long du tractus gastro-intestinal [Thörn et al, 2005].

#### **1.4.2.3 Activité modulatrice des excipients sur les phénomènes de résistance**

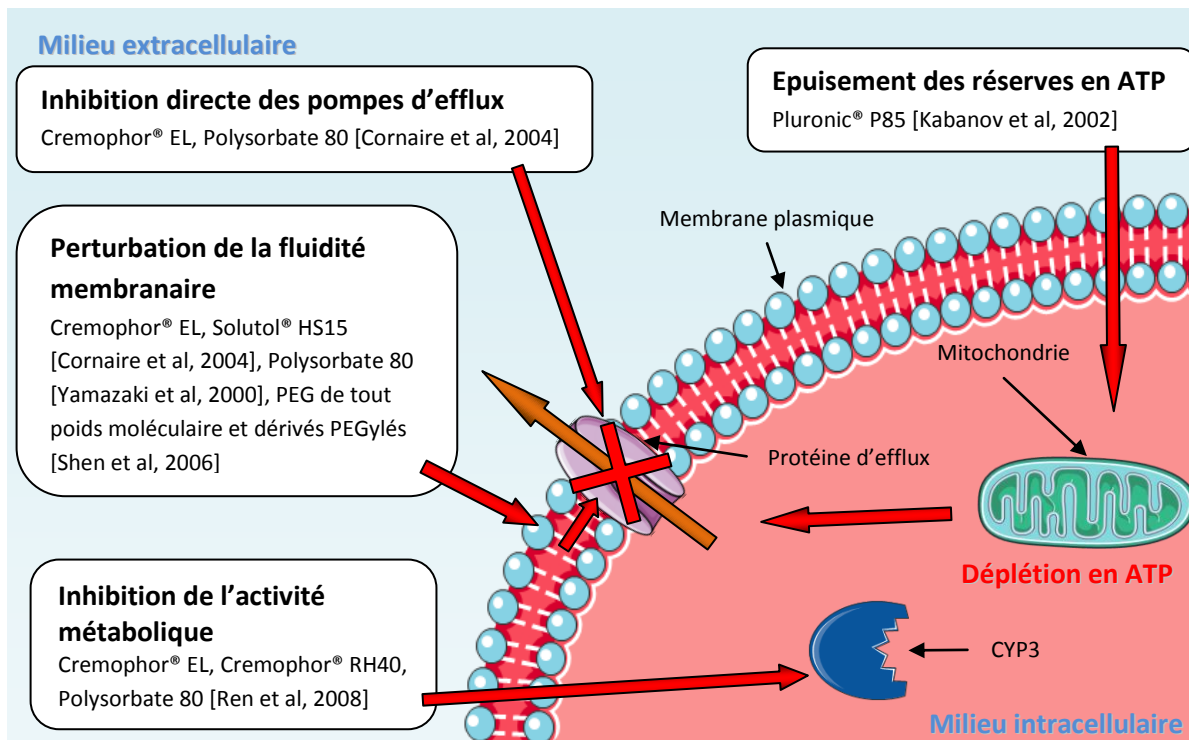
Tous les excipients ne sont pas nécessairement de nature inerte. Certains peuvent être considérés comme des « excipients fonctionnels ». Cette fonctionnalité s'exprime généralement par des

modifications des activités métaboliques et/ou de transport. En effet, ces excipients possèdent des propriétés physicochimiques propres permettant de moduler les phénomènes de résistance médicamenteuse. Ils peuvent agir sur les CYP3A et les protéines d'efflux par des mécanismes très variés [Strickley et al, 2004].

Pour **bloquer les pompes d'efflux** (p-gp, MRP2, BCRP), les excipients peuvent agir de différentes manières. Ils sont entre autre capables de s'y lier de façon compétitive ou non, de perturber la fluidité de la membrane plasmique ou de priver ces transporteurs d'énergie en créant une déplétion en ATP (Figure 3).

La majorité des surfactants non-ioniques inhibent la p-gp en modifiant la fluidité de la bicouche phospholipidique constituant la membrane plasmique. Leur insertion à ce niveau peut altérer l'arrangement physiologique de la membrane et ainsi celui des protéines d'efflux. En fonction de la structure du surfactant, ces modifications peuvent se faire dans le sens d'une augmentation ou dans celui d'une diminution de la fluidité et, par conséquent, entraînent une perte de la fonctionnalité des protéines d'efflux. Une étude a montré que l'HLB optimale (voir section 1.2.3) pour obtenir une bonne activité sur les protéines d'efflux, devrait préférentiellement être située entre 10 et 17 [Lo et al. 2003]. Ces perturbations ont été notamment observées avec le Labrasol® [Lin et al, 2007], la Vitamine E TPGS®, le Cremophor® EL, le Solutol® HS15 [Cornaire et al, 2004], le Pluronic® P85 [Yamagata et al, 2007], les polysorbates 20 et 80 [Yamazaki et al, 2000], des PEG de poids moléculaires très variés et des esters de PEG et d'alcool gras ou acide gras de longueurs de chaînes intermédiaires [Lo et al, 2003 ; Shen et al, 2006]. En plus de leur impact sur la membrane plasmique, certains de ces excipients comme le Cremophor® EL ou le polysorbate 80 peuvent exercer leurs effets inhibiteurs en se liant directement à la p-gp [Cornaire et al, 2004]. Enfin, il existe aussi des excipients qui agissent intra-cellulairement au niveau des mitochondries. Ces derniers bloquent la production endogène d'ATP et ainsi inhibent indirectement l'efflux par les transporteurs ABC et certaines activités métaboliques (Figure 3). Les poloxamères (Pluronic® P85) et la Vitamine E TPGS® sont bien connus pour épuiser les réserves intracellulaires d'ATP. En conséquence, ces excipients présentent un double intérêt en formulation : ils permettent de priver en énergie les pompes d'efflux ATP-dépendant tout en les inhibant par modification de la fluidité membranaire [Kabanov et al, 2002 ; Collnot et al, 2007].

La concentration en surfactants est aussi un paramètre important pour inhiber les protéines d'efflux. Ces excipients agissent généralement sous forme de monomères. Ainsi, pour avoir une inhibition efficace, il a été rapporté, notamment pour le Pluronic® P85, que la concentration doit être en dessous de la CMC (voir section 1.2.3) [Nerurkar et al, 1997 ; Kabanov et al, 2002 ; Lo et al, 2003].



**Figure 3 : Schéma récapitulatif sur les effets possibles des excipients sur les protéines d'efflux et les enzymes de métabolisation pré-systémique**

Au niveau des microsomes cellulaires, l'activité de la CYP3A4 peut y être inhibée de plus de 50% par différents types d'excipients comme des surfactants, des polymères ou encore des antioxydants. Néanmoins, ce sont surtout les surfactants (Cremophor® EL, polysorbate 80) qui montrent les meilleures propriétés inhibitrices. En effet, le polysorbate 20 montre une activité inhibitrice particulièrement forte. De ce fait, l'impact des excipients sur la CYP3A4 est un paramètre à prendre en considération lors de la formulation de médicaments sensibles aux réactions de métabolisation intestinale [Ren et al, 2008 ; Ren et al, 2009].

Nous avons vu précédemment (voir section 1.3) que formuler des principes actifs faiblement hydrosolubles dans des SMEDDS® permettait d'améliorer significativement la biodisponibilité orale de certaines de ces substances et aussi de réduire leurs variabilités inter- et intra-patients. Ceci est souvent lié à une meilleure solubilisation de la substance active mais aussi à une activité plus « pharmacologique » des excipients. La cyclosporine A est un bon exemple de molécule peu soluble dans l'eau et faisant l'objet d'efflux et de métabolisation par les CYP3A. Dans une formulation orale commercialisée sous le nom de Neoral®, ce principe actif est formulé avec du Cremophor® RH40 (huile de ricin polyéthoxylénée) qui détient un triple rôle. Il permet de maintenir la cyclosporine A sous forme solubilisée après ingestion tout en contribuant à l'atténuation des phénomènes de résistance médicamenteuse en inhibant la p-gp [Cornaire et al, 2004] et CYP3A4 [Ren et al, 2008]. Des mécanismes similaires sont suggérés pour expliquer l'augmentation de la biodisponibilité orale

d'un certain nombre de substrats lipophiles de la p-gp et/ou des CYP3A comme le talinolol et le saquinavir. Respectivement, ces deux principes actifs ont été formulés avec de la Vitamine E TPGS® et du Cremophor® EL comme surfactants connus pour leur effet sur la p-gp [Bogman et al, 2005 ; Martin-Facklam et al, 2002].

Au final, la compréhension des mécanismes permettant d'augmenter la biodisponibilité orale de substances actives lipophiles constitue un réel progrès et permet de mettre en place des stratégies de formulation plus efficace [Porter et al. 2008].

# Chapitre 2: Caractérisation des systèmes lipidiques et leur stratégie de formulation

## 2.1 Propriétés Physicochimiques

Une formulation à base d'excipients lipidiques possède ses propres caractéristiques physicochimiques qui varient en fonction de la nature et de la proportion de ses composants. Deux de leurs principales propriétés sont souvent étudiées lors de la caractérisation et de l'évaluation d'une formulation. Ces propriétés correspondent à :

- La taille et la distribution granulométrique des entités colloïdales formées après dispersion dans la phase aqueuse.
- La capacité de la formulation à solubiliser le principe actif dans des milieux de dissolution spécifiques et stimulant les conditions *in vivo*.

### 2.1.1 Granulométrie

Après administration par voie orale, les gélules ou les capsules molles libèrent au niveau du tractus gastro-intestinal un système lipidique qui aura tendance à s'émulsifier et à former des colloïdes dans lesquels le principe actif est dissout. La taille de ces entités colloïdales peut être mesurée par granulométrie laser ou DLS (Dynamic Light Scattering). Cette technique d'analyse permet aussi la mesure de l'indice de polydispersité qui donne une estimation de la distribution des tailles des entités colloïdales présentes dans la phase dispersante. Étudié depuis longtemps, ce paramètre de taille est d'ailleurs utilisé comme un des critères du système de classification des formulations lipidiques proposé par Pouton en 2000 (voir section 1.3.1) [Pouton et al, 2000].

Les avis concernant la relation entre de la taille de ces colloïdes et l'amélioration de l'absorption de la substance active, divergent. Porter et al. considèrent que la performance d'une formulation est très faiblement liée à la taille des particules dispersées au niveau des fluides gastro-intestinaux et que cette performance dépend plutôt des mécanismes de solubilisation, de dispersion et de digestion lipidique [Porter et al, 2007]. Par contre, d'autres auteurs suggèrent qu'une taille de particules réduite augmentant la surface de contact du principe actif ainsi qu'un faible indice de polydispersité seraient en faveur d'une meilleure absorption. Cet effet s'expliquerait par une perturbation de la fluidité membranaire initiée par la grande proportion de surfactants nécessaire à cette réduction de taille (voir section 1.4.2.3). Une telle corrélation a été notamment observée avec des polysorbates, des sucro-esters et des esters de sorbitane et d'acides gras [Gao et al, 1998 ; Koga et al, 2000 ; Koga et al, 2002 ; Cui et al, 2005]. De plus, l'obtention de fines gouttelettes associée à une faible polydispersité est garante d'une meilleure stabilité des entités colloïdales formées [Hong et al, 2006].

Néanmoins, la capacité à produire une fine dispersion de gouttelettes n'est pas nécessairement garante d'une biodisponibilité optimale. Le critère de lipolyse (voir section 2.2.3) reste incontournable. Une étude comparative sur l'efficacité de systèmes auto-émulsifiants formant des particules de tailles plus grandes que celles fournies par une formulation composée uniquement de surfactants (type IV), a été menée. Elle a montré que la formation d'entités colloïdales de taille très réduite n'aboutit pas forcément à une meilleure absorption mais que la présence de triglycérides dans la formulation peut s'avérer utile [Nielsen et al, 2008].

L'intérêt de mesurer ce paramètre permet d'estimer l'efficacité de la forme pharmaceutique et surtout de donner une idée sur ses capacités à faire passer la substance active au travers des membranes biologiques.

### **2.1.2 Milieux de dissolution**

Bien que le principe actif soit solubilisé dans la formulation, il est possible qu'il précipite en arrivant au niveau de l'estomac ou de l'intestin. Afin de mieux prédire ces phénomènes de précipitation, il a été vu précédemment (voir section 1.4.1) qu'il existe quatre milieux de dissolution simulant l'environnement gastro-intestinal : le milieu « SGF » mimant le contenu gastrique à jeun, le milieu « Milk » mimant le contenu gastrique après un repas, le milieu « FaSSIF » mimant le contenu intestinal à jeun et le milieu « FeSSIF » mimant le contenu intestinal après un repas. L'état post prandial est reproduit dans le milieu FeSSIF par une augmentation de l'osmolarité, des concentrations en sels biliaires (taurocholate de sodium) et en phospholipides (lécithine) et par une chute de pH. Au cours d'un test de dissolution, le milieu est agité à l'aide d'une pale afin de faciliter la dispersion de la formulation et les échantillons sont prélevés pour une analyse qui se fait généralement par chromatographie liquide [Dressman et al, 2000]. Néanmoins, la mise en place de ces systèmes peut s'avérer complexe et des soucis de reproductibilité peuvent être rencontrés. Ceci est notamment observé avec le taurocholate de sodium dont l'état de pureté peut varier [Wei et al, 2006].

Ces tests de solubilité ont été appliqués dans l'étude de nombreuses formulations lipidiques. Schamp et al. ont mis au point des systèmes à base de Gélucire® 44/14, de Vitamine E TPGS® et de Soluphor® P (2-pyrrolidone) pour solubiliser un principe actif lipophile et le maintenir dans cet état. En comparant leurs résultats *in vitro* avec des données *in vivo* réalisées chez le chien, une très bonne corrélation a pu être établie [Schamp et al, 2006]. Par conséquent, ces milieux présentent une bonne corrélation *in vitro/in vivo* pour les substances de la classe II BCS et s'avèrent, par conséquent, utiles lors de la mise en forme de médicaments [Dressman et al, 2000].

Les milieux de dissolution se présentent donc comme un outil intéressant en formulation. Ils peuvent aussi être incorporés dans des systèmes plus complexes. En effet, un couplage à un modèle d'absorption intestinale comme des cellules Caco-2 (voir section 2.2.1.1.3) fournit un système permettant l'étude des phénomènes de dissolution et d'absorption. Un tel système peut être appliqué aussi bien sur des principes actifs seuls que sur des formulations auto-émulsifiantes [Kataoka et al, 2006].

## 2.2 Propriétés biologiques

L'examen des propriétés biologiques et de l'efficacité d'une formulation orale peut se faire de trois façons différentes. D'abord, la perméabilité et le métabolisme du principe actif peuvent être évalués à l'aide de modèles *in vitro* mimant les phénomènes d'absorption et de métabolisation intestinale. Par la suite, il est intéressant de rechercher les potentiels effets cytotoxiques qu'auraient les excipients afin d'améliorer l'efficacité et la sécurité de leur emploi. Enfin, la connaissance de la sensibilité de la formulation à la lipolyse permet de mieux prédire son devenir *in vivo*.

### 2.2.1 Etude de la perméabilité et du métabolisme

#### 2.2.1.1 Perméabilité intestinale

##### 2.2.1.1.1 Physiologie de l'appareil digestif

L'administration orale d'un médicament se déroule généralement en quatre phases distinctes qui sont l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'élimination. Pour les médicaments administrés par voie orale, la phase d'absorption tient une place prépondérante. Elle a lieu principalement au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle. Ce tissu est doté d'une riche vascularisation lui permettant une bonne distribution des molécules absorbées vers les organes cibles.

Le **tube digestif** est constitué de la cavité buccale, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle et du gros intestin. Histologiquement, l'intestin grêle est constitué de quatre couches distinctes qui sont, en partant de la lumière intestinale, la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et enfin la séreuse. La muqueuse possède trois fonctions importantes : la fonction sécrétrice, l'absorption et la protection vis-à-vis des agents infectieux. Elle est également composée de trois structures différentes : l'épithélium de revêtement, la lamina propria et la musculaire muqueuse. Les phénomènes d'absorption se déroulent au niveau de l'épithélium. Ce dernier est riche en cellules caliciformes responsables de la sécrétion de mucus. Le mucus ainsi sécrété empêche la digestion de certains organes par les enzymes sécrétées. Il facilite également le transit de la nourriture le long du tube digestif. Certaines cellules de l'épithélium sécrètent des enzymes et des hormones, permettant



ainsi à la muqueuse d'avoir une fonction endocrine. La sous-muqueuse renferme des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des follicules lymphatiques et des neurofibres. Ce réseau vasculaire abondant alimente les tissus de la paroi du tube digestif. La musculature et la séreuse ont principalement un rôle structural et ne participent pas à l'absorption des médicaments.

Anatomiquement, l'intestin grêle est constitué de trois parties qui sont le duodénum (20-30cm), le jéjunum (2,5m) et l'iléum (3,6m). Sa seule longueur associée à la présence des villosités et microvillosités intestinales (Figure 4) procurent une grande surface d'absorption d'environ 200m<sup>2</sup>. Les villosités intestinales sont des cavités digitiformes de 0,5 à 1mm de hauteur. En ce qui concerne les microvillosités, ce sont de minuscules saillies qui se trouvent à la surface des cellules épithéliales. Chaque cellule en compte environ 1000. Ces microvillosités sont formées par la membrane plasmique donnant un aspect duveteux à la muqueuse, d'où l'appellation de bordure en brosse de l'épithélium intestinal [Physiological Pharmaceutics, Barriers to Drug Absorption, 2<sup>nd</sup> Edition, Chapitre VI].

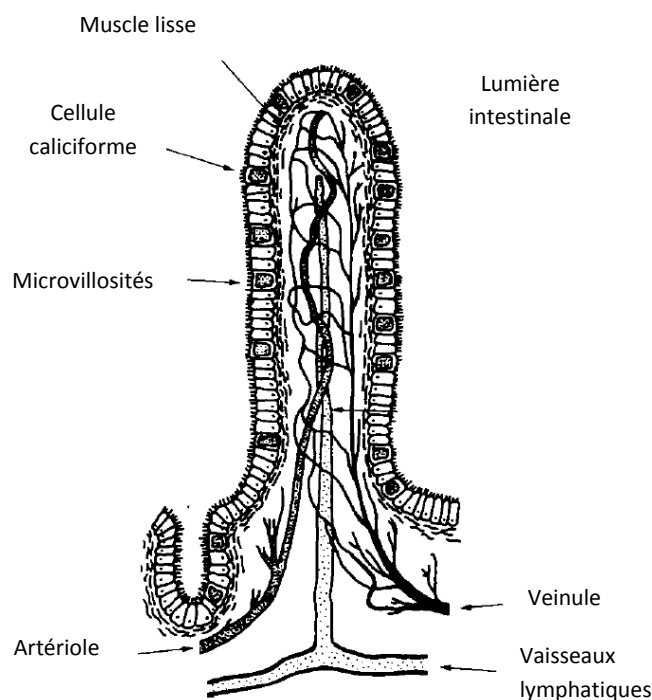


Figure 4 : Structure d'une villosité au niveau de l'épithélium intestinal circulation sanguine et lymphatique [Physiological Pharmaceutics, Barriers to Drug Absorption, 2<sup>nd</sup> Edition, Chapitre VI]

Au niveau de l'épithélium intestinal, les médicaments peuvent franchir la **barrière intestinale** en empruntant la voie paracellulaire ou la voie transcellulaire (Figure 5). Le mode de passage à travers cette barrière est déterminé par les propriétés physicochimiques, le poids moléculaire, la lipophilie et le degré d'ionisation de la substance active. Les molécules hydrophiles de faible poids moléculaire auront plutôt tendance à traverser l'épithélium intestinal en suivant la voie paracellulaire, alors que

des molécules plus grosses et lipophiles emprunteront la voie transcellulaire [Hidalgo et al, 2001 ; Chan et al, 2004].

Le **transport paracellulaire** (Figure 5 A) des ions et des molécules de petites tailles se fait sélectivement. En effet, il est régulé par différents types de jonctions intercellulaires localisées vers le pôle apical. Ces protéines regroupent les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les jonctions communicantes et les desmosomes qui jouent le rôle de "joints étanches" entre les entérocytes (Figure 5). Elles permettent aussi le maintien de la polarité cellulaire en évitant la libre diffusion des protéines et des lipides du côté apical vers le côté basolatéral et inversement. Ce type de transport est qualifié de passif parce qu'il ne nécessite pas d'autres sources d'énergie que celle générée par le gradient électrochimique [Kapus et al, 2006].

A ce jour, quatre types de jonctions serrées ont été identifiés. Il s'agit de l'occludine, des claudines, des JAM (Junctional Adhesion Molecule) et de la protéine Crumb. L'occludine et les claudines jouent un rôle prépondérant dans l'adhésion des cellules entre elles. L'occludine dont l'expression est très large (glandes salivaires, peau, cellules rénales, œsophage, foie...), constitue le composant majoritaire des jonctions serrées. Puis, viennent les claudines qui occupent aussi une place importante parmi les jonctions serrées. Découvertes en 1998, 24 types de claudines différentes ont été identifiés sur le génome humain. C'est l'interaction des domaines extracellulaires des jonctions serrées de deux cellules voisines qui contribue à leur liaison [Feldman et al, 2005 ; Van Itallie et al, 2006].

De nombreuses substances chimiques comme le caprate de sodium, les sels biliaires ou les chitosans sont connus pour agir au niveau du cytosquelette et ainsi affecter les jonctions serrées. Ces excipients peuvent « desserrer » ces jonctions et ainsi augmenter le diamètre des pores intercellulaires. Ces effets amènent à une augmentation de la perméabilité de molécules plus lipophiles et de poids moléculaire plus élevé. Ce mécanisme permet notamment d'expliquer l'effet promoteur d'absorption de certains excipients. Néanmoins, de telles substances promotrices d'absorption peuvent également présenter une certaine toxicité *in vivo* (voir section 2.2.2). En conséquence, il est plus prudent de tenir compte de la balance bénéfique/risque lors de l'utilisation de ces produits [Anderberg et al, 1993 ; Ward et al, 2000 ; Turner et al, 2006 ; Salama et al, 2006].

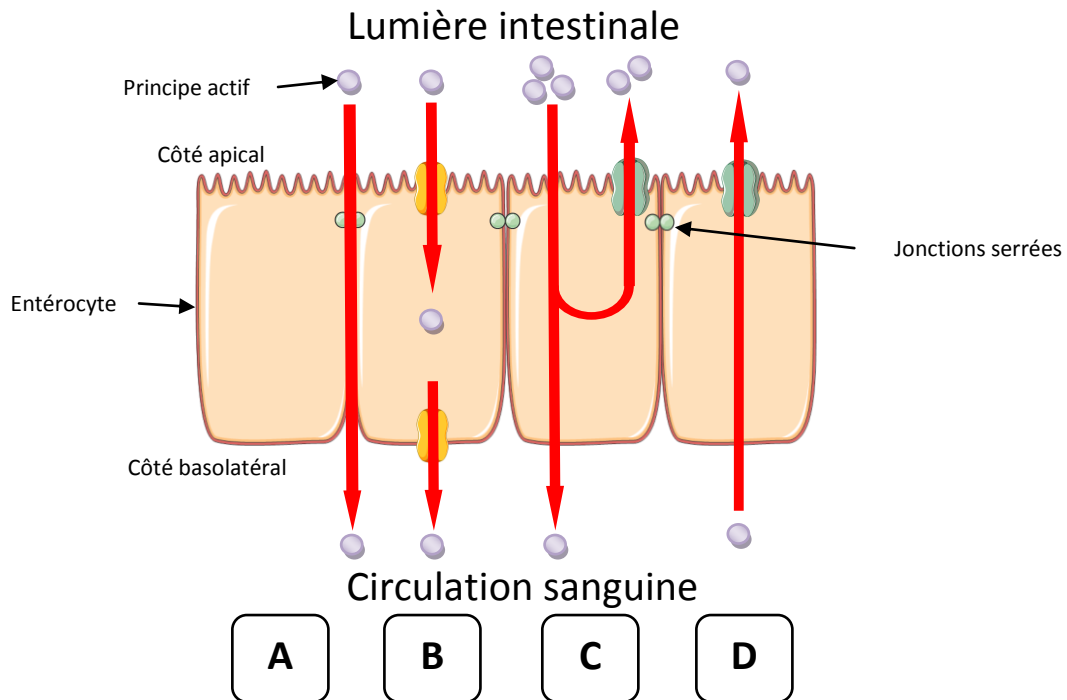


Figure 5 : Schéma de l'épithélium intestinal formant une barrière sélective contre le passage dans la circulation générale de substances exogènes. (A) voie paracellulaire. (B) Absorption transcellulaire par un transporteur membranaire. (C) Phénomène de diffusion passive et phénomène d'efflux réalisé par un transporteur membranaire et limitant l'absorption de la substance exogène. (D) Phénomène d'efflux favorisant l'élimination intestinale de substances provenant du sang [Chan et al, 2004].

Le **passage transcellulaire** est la voie majoritaire d'absorption des nutriments et des médicaments. Ce transport peut se réaliser par simple diffusion au travers de la membrane plasmique (Figure 5 C) ou à l'aide de transporteurs membranaires (Figure 5 B). L'absorption des molécules hydrophiles mettent préférentiellement en jeu des transporteurs membranaires qui ont la particularité d'être saturables et de demander de l'énergie. Quant aux molécules lipophiles, elles empruntent généralement la voie de la diffusion passive. Mais cette diffusion permet aussi le passage sélectif d'ions et de molécules organiques par l'intermédiaire de canaux. Ce passage se fait dans le sens du gradient électrochimique et ne nécessite donc pas d'apport d'énergie. Cependant, cette voie ne permet pas de contourner les phénomènes possibles d'efflux vus précédemment (voir section 1.4.2.1). D'ailleurs, les protéines d'efflux peuvent aussi participer à l'élimination intestinale de substances présentes dans la circulation sanguine (Figure 5 D).

Les transporteurs membranaires interviennent dans le cadre du transport actif. Ce dernier peut être primaire ou secondaire. Le transport actif primaire nécessite l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie et met en jeu de nombreux transporteurs de la superfamille des protéines ABC. Ces derniers assurent un transport unidirectionnel de leur substrat. Ils ont soit une fonction d'efflux, soit une fonction d'absorption. Pour le transport actif secondaire, l'énergie requise pour le passage transmembranaire du substrat est apportée par le co-transport d'une autre molécule. Ce co-

transport a lieu, soit dans le même sens que le transport du substrat du transporteur, soit en sens inverse. Il s'agit alors respectivement d'un symport ou d'un antiport. Les transporteurs de la famille SLC (SoLute Carrier) assurent ce transport actif secondaire [Hidalgo et al, 2001 ; Chan et al, 2004].

Outre les protéines d'efflux décrites précédemment (voir section 1.4.2.1), la **superfamille des protéines ABC** comporte aussi des transporteurs transmembranaires (MRP1, MRP3...) impliqués dans les phénomènes d'absorption. La protéine MRP1 localisée sur le côté basolatéral des cellules de l'épithélium intestinal permet le passage du milieu intracellulaire vers le compartiment sanguin de substances exogènes. Néanmoins, ce transporteur possède un rôle ambigu. Bien qu'il favorise le passage systémique de xénobiotiques, son association avec les systèmes d'efflux peut aussi jouer un rôle de détoxification cellulaire en accélérant leur métabolisation et/ou leur élimination. Ainsi, l'accumulation intracellulaire de molécules potentiellement toxiques est réduite [Englund et al, 2006 ; Chan et al, 2004].

La famille des protéines SLC comporte des **transporteurs d'ions organiques** et des **transporteurs peptidiques**.

Au niveau de l'intestin, les **transporteurs d'ions organiques** ont pour substrats de nombreuses molécules ioniques et non ioniques, endogènes ou exogènes. Chacune des sous-familles de ces transporteurs comme les OAT (Organic Anionic Transporter) et les OCT (Organic Cationic Transporter) présente leurs propres spécificités de substrats. Les OCT permettent le transport facilité de molécules organiques chargées positivement. Parmi ces molécules, de nombreuses substances actives (antihistaminiques, myorelaxants,  $\beta$ -bloquants, antiarythmiques) et métabolites portent dans leurs structures chimiques des fonctions amines primaires, secondaires, tertiaires ou quaternaires. Outre ces xénobiotiques, les OCT transportent également des cations organiques endogènes comme la dopamine et la choline. Malgré le rôle important qu'ils jouent dans l'absorption intestinale, leur expression est réduite au niveau du tube digestif en comparaison de celle qui existe dans le rein ou dans le foie [Zair et al, 2008]. Le transport des cations organiques au niveau de l'épithélium intestinal peut se faire soit dans le sens d'une absorption soit dans le sens d'un efflux. Ce transport est généralement potentiel-dépendant, bien que pour certains substrats comme la choline, aucune force motrice ne soit nécessaire. Les OAT, aussi faiblement exprimés au niveau de l'épithélium intestinal, permettent le transport facilité de molécules organiques chargées négativement [Endres et al, 2006 ; Zair et al, 2008].

L'effervescence du secteur de la biotechnologie et le développement de médicaments à structure peptidique ou peptidomimétique ont conduit les chercheurs à s'intéresser au mode de transport des peptides. Ainsi, la découverte de la hPepT1, un **transporteur peptidique** au niveau de l'épithélium

intestinal, a été faite par Fei et al. [Fei et al, 1994 ; Liang et al, 1995]. Ce transporteur intervient dans l'absorption de di- et tripeptides mais également dans l'absorption de médicaments (inhibiteurs d'enzyme de conversion, antibiotiques). Le transport à travers l'épithélium intestinal s'effectue grâce à une force motrice induite par un gradient de protons [Thwaites et al, 1994]. En effet, la structure de hPepT1 a révélé la présence d'un site de liaison aux protons [Nussberger et al, 1997]. Le problème majeur que pose l'administration orale des peptides thérapeutiques, est lié à leur inactivation par des enzymes de dégradation (carboxypeptidases, aminopeptidases, trypsine...) présentes tout le long du tractus gastro-intestinal. Ces enzymes lysent les oligopeptides à des endroits très précis dans l'enchaînement des acides aminés. Elles ont pour but final de réduire la protéine initiale en fragments di- ou tripeptidiques qui pourront être absorbés au niveau intestinal. Ces raisons expliquent que les seules substances actives de natures peptidiques (insuline, héparines...) commercialisés sont formulés pour une administration parentérale [Petrus et al, 2009].

Grace à ces connaissances détaillées sur les mécanismes d'absorption intestinale, de nombreux outils *in vitro* ont pu être développés afin de mieux prédire le devenir d'une formulation pharmaceutique dans l'organisme humain.

#### 2.2.1.1.2 Modèles *in vitro* d'absorption intestinale

Il existe de nombreux modèles *in vitro* de barrière intestinale permettant de mieux comprendre les propriétés d'absorption de formulations ou l'effet de modulateurs des protéines d'efflux sur le passage de principes actifs substrats de ces protéines. Les principaux modèles sont basés soit sur l'utilisation de morceaux d'intestin prélevés directement chez l'animal soit sur l'utilisation de lignées cellulaires issues de tumeurs présentant des phénomènes de résistance médicamenteuse.

Les modèles nécessitant un prélèvement de tissus ou d'organes chez l'animal ne sont pas toujours évidents à mettre en place. Ils exigent une bonne maîtrise et un savoir-faire dans leur mise en place et leur manipulation. La **chambre de Ussing** et la **méthode du sac d'intestin éversé de rat** sont deux exemples permettant d'illustrer ce type de modèles. Le premier consiste à fixer des petites sections de muqueuse intestinale entre deux chambres contenant un tampon. Ainsi, le transport d'une molécule d'une chambre à l'autre au travers de ce tissu peut y être évalué. Typiquement, la molécule d'intérêt est additionnée dans la chambre donneuse et son accumulation dans la chambre receveuse est mesurée en fonction du temps. Ce modèle présente l'avantage de pouvoir évaluer le transport sur des sites bien précis de l'intestin et surtout de présenter une très bonne corrélation *in vitro/in vivo* [Lennernäs et al, 1997]. La méthode du sac d'intestin éversé de rat consiste à « éverser » un morceau d'intestin fraîchement excisé de façon à ce que l'épithélium intestinal se retrouve orienté vers l'extérieur. A partir de petits segments d'environ 2,5cm de long, des sacs renfermant une

solution tampon sont préparés et introduits dans un récipient contenant une solution contenant une formulation à tester. Sur ce modèle, le contenu du sac et le récipient correspondent respectivement au compartiment receveur et donneur. Cette technique rapide et peu coûteuse permet d'étudier et de quantifier les phénomènes d'absorption et d'efflux par l'intestin grêle et le colon. Bien que sa mise en place nécessite un savoir-faire, sa reproductibilité et sa précision confortent son grand potentiel dans les études de mécanismes ou de cinétique du transport des substances actives [Barthe et al, 1998 ; Hidalgo et al, 2001].

Plusieurs lignées cellulaires immortalisées ont été utilisées dans les études d'absorption intestinale et les principales sont les cellules Caco-2, HT-29 et MDCK. Les cellules **HT-29** sont capables de former une monocouche cellulaire et se différencier en entérocytes ou en cellules sécrétrices de mucus. De ce fait, elles permettent d'étudier les effets de la mucine sur l'absorption intestinale. Les cellules **MDCK** forment une monocouche de cellules différenciées en seulement 3 jours. Ce modèle est adapté pour suivre la perméabilité paracellulaire ou la diffusion transmembranaire d'un médicament. Avec ces cellules, les résultats obtenus sont très reproductibles d'une expérience à l'autre. Par contre, sa faible expression en p-gp rend les études d'interaction avec le système d'efflux impossibles. Enfin, les caractéristiques des cellules **Caco-2** seront exposés plus longuement à la section suivante [Irvine et al, 1999 ; Braun et al, 2000 ; Hidalgo et al, 2001 ; Taub et al. 2002].

#### 2.2.1.1.3 La lignée cellulaire Caco-2

La lignée cellulaire Caco-2 est constituée d'une population hétérogène de cellules cancéreuses issues d'un adénocarcinome colanique humain. Elle a été largement utilisée depuis les années 80 en tant que modèle *in vitro* de barrière intestinale. Les cellules Caco-2 sont classiquementensemencées sur un support poreux (Figure 6) où elles forment une monocouche qui sert à délimiter le compartiment donneur (ou mucosal) du receveur (ou sérique). Après confluence, ces cellules se différencient spontanément en cellules morphologiquement et biochimiquement proches des entérocytes humains. Cette différenciation se réalise dans des conditions classiques de culture cellulaire pendant environ 21-25 jours. Au fur et à mesure des années, elles sont devenues le modèle cellulaire le plus largement utilisé dans les études prédictives de l'absorption d'un principe actif. Ces cellules permettent aussi l'étude des phénomènes de résistances médicamenteuses grâce à l'expression de protéines d'efflux comme la p-gp et la BCRP sur leur pôle apical [Artursson et al, 2001 ; Hidalgo et al, 2001 ; Gutmann et al, 2005 ; Sambuy et al, 2005].

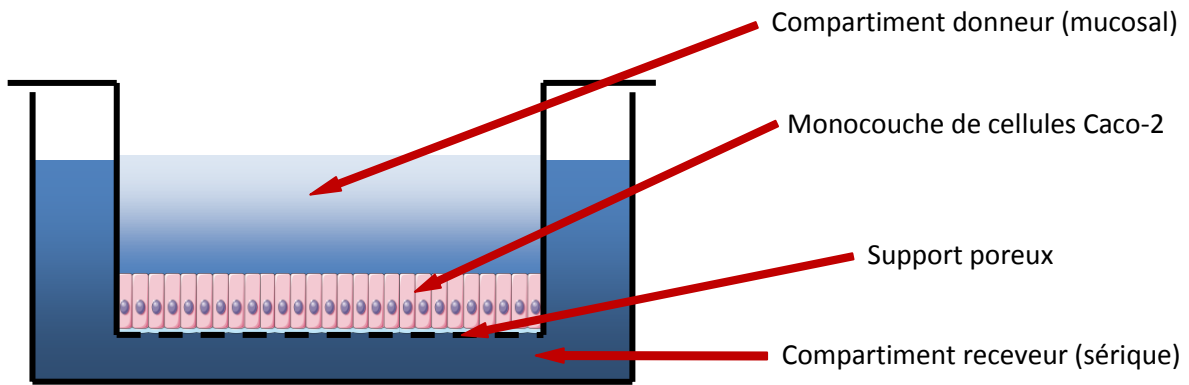


Figure 6 : Schéma d'une monocouche de cellules Caco-2 ensemencées sur un support poreux. Cette monocouche délimite le compartiment donneur du compartiment receveur.

Les cellules Caco-2 expriment beaucoup de protéines impliquées dans l'absorption et l'efflux de molécules exogènes. Outre la p-gp et la BCRP, ces cellules présentent des **potentiels d'absorption et de métabolisation** propres aux entérocytes humains. En effet, elles expriment des transporteurs  $\text{Na}^+$ -dépendants (SGLT1) et  $\text{Na}^+$ -indépendants (GLUT1 – GLUT5) qui rendent possibles le transport de glucose [Delie et al, 1997]. Mais elles expriment aussi des transporteurs peptidiques [Thwaites et al, 1994 ; Behrens et al, 2004], nucléosidiques [Delie et al, 1997], d'acides biliaires et des protéines d'efflux [Taipalensuu et al, 2001 ; Gutmann et al, 2005 ; Englund et al, 2006 ; Maubon et al, 2007]. Par conséquent, le modèle *in vitro* d'absorption intestinale Caco-2 apparaît comme un modèle fidèle des phénomènes d'absorption et d'efflux intestinaux. Sa corrélation *in vitro/in vivo* est tout particulièrement fidèle en ce qui concerne la p-gp et la BCRP [Delie et al, 1997]. L'activité métabolique des cellules Caco-2 se rapproche aussi de celle de l'intestin. Ces cellules Caco-2 peuvent synthétiser et sécréter des particules lipoprotéiques (apolipoprotéines, chylomicrons,...) [Delie et al, 1997]. Des peptidases (trypsine et chymotrypsine) [Bai et al, 1995], des glutathion-S-transférases, des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, glutathion réductase, catalases...) et des cytochromes P450 sont exprimées. Toutefois, ces cytochromes sont exprimés de façon hétérogène dans les cellules Caco-2. Ainsi, l'isoforme 1A1 du cytochrome P450 (CYP1A1) est fortement exprimé et inductible dans les cellules Caco-2, tandis que les isoformes 1A2 (CYP1A2) et 3A4 (CYP3A4) y sont absents. Expriment de nombreuses enzymes de métabolisation, les cellules Caco-2 apparaissent comme un modèle intéressant dans l'étude de la métabolisation intestinale de principes actifs. Cependant, l'absence d'expression du CYP3A4, enzyme majeure de la métabolisation de médicaments, limite l'utilisation des cellules Caco-2 dans les études de métabolisation aux molécules insensibles à la CYP3A4 [Delie et al, 1997]. Néanmoins, il est possible de faire exprimer la CYP3A4 en l'induisant avec de la vitamine  $\text{D}_3$  dihydroxylée ou en transfectant les cellules [Van Breemen et al, 2005]. Cette expression permet ainsi d'étudier le métabolisme pré-systémique des

médicaments [Cummins et al, 2001]. Finalement, les cellules Caco-2 apparaissent comme un modèle cellulaire fiable pour les études *in vitro* prédictives d'absorption intestinale et d'interactions médicamenteuses.

Cependant, plusieurs **paramètres de cultures** influencent les caractéristiques de la monocouche de cellules Caco-2 et sont à prendre en compte. Parmi ces facteurs, le nombre de passages des cellules et les conditions de culture interviennent.

Les cellules Caco-2 constituent une population hétérogène de cellules présentant des phénotypes variables. De ce fait, les paramètres des monocouches étudiées peuvent varier d'une étude à une autre. Ainsi, les variations d'expression en p-gp ou en jonctions serrées peuvent modifier les propriétés absorptives de ce modèle. Afin de limiter cette variabilité, la connaissance du **nombre de passages** cellulaires peut s'avérer être utile. Ce passage correspond au procédé de sous-culture de cellules qui est généralement réalisé pour produire un grand nombre de cellules à partir de cellules préexistantes. Le nombre de passages cellulaires est un bon indicateur des caractéristiques de la monocouche étudiée. Aux passages cellulaires élevés, la résistance électrique transépithéliale (TEER) des monocouches est souvent élevée. L'activité enzymatique (sucrase-isomaltase, phosphatase alcaline...) et l'expression des transporteurs membranaires (p-gp...) sont variables. Ces différences d'expression en fonction du nombre de passages des cellules sont imputables à l'hétérogénéité intrinsèque de la population parentale de cellules Caco-2. Par conséquent, lors d'études mettant en jeu les cellules Caco-2, il est important de connaître avec précision le nombre de passages [Sambuy et al, 2005].

A côté des facteurs relatifs aux cellules elles-mêmes, les paramètres de culture cellulaire comme le temps de culture, la densité d'ensemencement, la composition du milieu ou le support de culture, influent beaucoup sur les propriétés des monocouches cellulaires. Une forte **densité d'ensemencement** permet aux cellules d'arriver à confluence plus rapidement et de débiter plus tôt le processus de différenciation. Un ensemencement d'une trop forte densité augmente également le risque de former des multicouches. Ainsi, en fonction de la densité d'ensemencement, le temps de culture global ne sera donc pas identique. Dans la littérature, les densités peuvent varier de 3 500 cellules/cm<sup>2</sup> [Anderle et al, 2003] à 500 000 cellules/cm<sup>2</sup> [Thwaites et al, 1993]. De façon générale, une densité de 60 000 cellules/cm<sup>2</sup> est utilisée avec les Caco-2 afin d'obtenir une bonne différenciation cellulaire au bout de trois semaines [Behrens et al, 2003]. Le **temps de culture** des cellules influence aussi les caractéristiques morphologiques et biochimiques des cellules. Après 25 jours de culture sur des filtres en polycarbonate traités avec du collagène, les cellules sont totalement différenciées (avec un noyau polarisé et une taille de cellules comparable à celle des



entérocytes humains) et présentent une expression maximale et homogène du récepteur PepT1. Généralement, les valeurs du TEER et de la perméabilité apparente du mannitol atteignent un plateau à partir du 21<sup>ème</sup> jour [Bravo et al, 2004]. Avant les 21-25 jours recommandés, les monocouches de cellules Caco-2 ne sont pas suffisamment matures en tant que modèle de transport intestinal. De nombreux transporteurs membranaires (transporteurs du glucose, de peptides, de vitamines...) et enzymes risquent d'être mal exprimés, si le temps de culture n'est pas bien contrôlé. Inversement, sur des cultures étendues sur quatre semaines, les risques de désorganisations morphologiques et d'apparition de multicouches sont plus importants. Par conséquent, le temps de culture gouverne un bon nombre de caractéristiques morphologiques et biochimiques [Behrens et al, 2003]. La **composition du milieu** de culture peut aussi être à l'origine des grandes variabilités intra- et interlaboratoires. D'un lot à l'autre, le sérum de bœuf fœtal utilisé peut moduler la morphologie et les fonctions biochimiques des cellules. Lorsqu'un nouveau lot de sérum est utilisé, il est nécessaire d'effectuer un certain nombre de contrôles comme des observations microscopiques, l'évaluation du passage paracellulaire (perméabilité au Lucifer Yellow...) ou des mesures de TEER. Ceci est nécessaire parce que la composition en hormones de croissance et autres facteurs, varie d'un lot de sérum à l'autre [Hubatsch et al, 2007]. La composition du milieu et notamment le sérum influent beaucoup sur la différenciation cellulaire. En effet, la perméabilité paracellulaire peut différer en fonction de la quantité de jonctions serrées. Le milieu de culture peut aussi favoriser l'expression de protéines impliquées dans les phénomènes de résistance médicamenteuse. En effet, la CYP3A4 très faiblement exprimée dans des conditions de culture « classiques », peut voir sa présence augmentée lorsque qu'elles sont cultivées pendant 2 semaines avec un milieu de culture contenant de la vitamine D<sub>3</sub> dihydroxylée [Cummins et al, 2001]. Outre l'activité enzymatique, l'expression des transporteurs peut aussi être régulée par la composition en nutriments du milieu. Par exemple, la présence d'acide rétinolique permet d'augmenter l'expression de la p-gp [Sambuy et al, 2005]. Par conséquent, la composition du milieu est un paramètre clé dans la bonne maturation des monocouches des cellules Caco-2. Actuellement, les **supports de culture** poreux sur lesquels poussent les cellules Caco-2, sont en polyester (PE), en oxyde d'aluminium (OA), en polycarbonate (PC) ou en polyéthylène-téréphtalate (PET). Les filtres en OA ou PET présentent l'avantage d'être translucides et de permettre des observations microscopiques par rapport à ceux en PE ou PC. Le matériau du filtre ne semble pas avoir d'influence sur l'expression des transporteurs membranaires [Delie et al, 1997 ; Sambuy et al, 2005]. Inversement, la perméabilité paracellulaire semble dépendre du filtre choisi. Behrens et Kissel ont observé des TEER plus élevés et des perméabilités paracellulaires réduites pour les cellules mises en culture sur des filtres en PET par rapport à des filtres en PC [Behrens et al, 2003]. Enfin, ces supports peuvent être traités et recouverts de collagène, ce qui permet de favoriser l'adhésion cellulaire [Delie et al, 1997 ; Behrens et al, 2003].

Toutefois, ce modèle n'est pas parfait et présente des **inconvenients**. Ces cellules demandent une longue période de maturation (21-25 jours) nécessaire à l'obtention d'une monocouche fonctionnelle et pendant laquelle le risque d'infection est plus important. Les résultats peuvent présenter de grandes variabilités intra- et interlaboratoires dues au caractère hétérogène des cellules, à leurs conditions de culture, au facteur humain (variabilité liée à l'opérateur) ou aux propriétés de la monocouche cellulaire (TEER, passage). De ce fait, la comparaison de résultats interlaboratoires doit être interprétée avec prudence [Hidalgo et al, 2001 ; Sambuy et al, 2005]. De plus, l'absence de mucus et de cholestérol constitue une barrière en moins au passage des substances exogènes. Ainsi, la diffusion passive de composés lipophiles comme la testostérone au travers d'une monocouche de cellules Caco-2 peut être surestimée [Ward et al, 2000].

De nombreuses **solutions** ont été proposées pour répondre aux difficultés rencontrées avec les cellules Caco-2. Le temps de maturation peut être réduit à 3 jours en cultivant les cellules avec un milieu de culture enrichi en hormones de croissance [Da Violante et al, 2004]. Pour limiter les variations intra- et interlaboratoires, des clones ont été isolés à partir de lignée originelle de cellules Caco-2 (lignée parentale). Cette sélection permet d'obtenir des lignées clonales possédant des propriétés bien précises. Par exemple, le clone Caco-2/TC7 exprime significativement plus d'enzymes de métabolisation (CYP3A) que la lignée parentale. Ces lignées (Caco-2/TC7, Caco-2/AQ, Caco-2/15...) ont permis l'obtention de populations cellulaires homogènes et, par conséquent, des résultats reproductibles [Carrière et al, 1994 ; Chan et al, 2004 ; Sambuy et al, 2005]. Enfin, pour pallier à l'absence de mucus, des co-cultures hétérogènes ont été réalisées avec de cellules caliciformes (sécrétrices de mucus) [Hilgendorf et al, 2000]. Ainsi, l'association de cellules Caco-2 avec des HT29 ont permis d'obtenir un modèle plus fidèle de l'épithélium intestinal tout en rendant la méthode plus robuste et des résultats plus reproductibles.

Les cellules Caco-2 ont souvent été utilisées afin de comparer la perméabilité intestinale d'un principe actif seul par rapport à la même substance formulée dans un système lipidique. Cet outil permet de vérifier l'efficacité d'une formulation. De telles études ont déjà été réalisées avec des systèmes contenant du Gelucire® 44/14, du polysorbate 80, du Pluronic® [Saha et al, 2000], de la Vitamine E TPGS® [Rege et al, 2002], des phospholipides [Kapitza et al. 2007], du Cremophor® RH40 [Nielsen et al, 2008].

Au final, les cellules Caco-2 apparaissent comme un modèle de barrière intestinale présentant une très bonne corrélation *in vitro/in vivo*. Outre les difficultés citées précédemment, elles ont pour avantages d'être faciles à mettre en culture et à manipuler. Elles expriment des mécanismes de transport et de métabolisme intestinaux permettant de réaliser des études prédictives d'absorption

ou de métabolisation. L'intérêt majeur de ce modèle en formulation est la possibilité d'étudier les phénomènes de résistance médicamenteuse grâce à la présence de la p-gp [Artursson et al, 1991 ; Saha et al, 2000 ; Sambuy et al, 2005].

### **2.2.1.2 Modèles *in vitro* de métabolisme intestinal**

Par rapport à l'efflux, les phénomènes de métabolisme intestinal ne sont pas toujours systématiquement étudiés. Dans cette partie, deux modèles permettant leur étude vont être présentés.

Le premier modèle a déjà été évoqué précédemment et consiste à utiliser des cellules Caco-2 exprimant des CYP3A. Pour obtenir de telles cellules, il suffit de les transfecter de façon stable par des gènes codant pour la CYP3A4 [Cummins et al, 2001] ou d'utiliser directement les clones Caco-2/TC7 exprimant des concentrations effectives de CYP3A [Carrière et al, 1994]. La recherche de métabolites formés permet d'apprécier les phénomènes de métabolisme intestinal.

Le deuxième modèle fait appel à des microsomes intestinaux (fragments de membranes du réticulum endoplasmique) pour étudier les réactions métaboliques de phase I initiées par les cytochromes P450 et les réactions de conjugaisons de phase II. Au niveau de l'épithélium, ces réactions produisent des métabolites qui peuvent atteindre directement la circulation générale en traversant la membrane basolatérale. Toutefois certains d'entre eux obtenus selon la technique décrite ci-dessus, peuvent aussi être des substrats des transporteurs d'efflux qui les éliminent vers le lumen intestinal [Chan et al, 2004]. Bien que les microsomes aient été souvent utilisés pour prédire le métabolisme de premier passage ou les interactions médicamenteuses [Galetin et al, 2006 ; Obach et al, 2006], ils ont aussi permis d'étudier l'effet d'excipients pharmaceutiques sur la métabolisation du midazolam, un substrat de la CYP3A4 [Ren et al, 2008 ; Ren et al ; 2009].

Sachant que de nombreux excipients couramment utilisés en formulation sont capables d'inhiber la CYP3A (voir section 1.4.2.3), ces modèles peuvent se révéler très utiles dans l'évaluation du pouvoir inhibiteur de formes pharmaceutiques sur la métabolisation pré-systémique.

### **2.2.2 Tests de cytotoxicité**

Un malentendu général stipulant que les excipients sont inertes et exempts d'effets indésirables persiste chez certaines personnes. Les excipients pharmaceutiques sont censés être des entités chimiques inoffensives et n'exerçant pas d'effets pharmacologiques. La toxicité de substances inconnues utilisées comme excipients constitue une caractéristique critique et imprévisible pour la formulation de médicaments. Des excipients couramment utilisés et ayant démontré une grande efficacité dans l'amélioration de la biodisponibilité orale de substances lipophiles comme le

Cremophor® EL, ont été associés à de sérieux troubles. Des réactions d'hypersensibilité anaphylactiques, des hyperlipidémies, des anomalies au niveau des lipoprotéines, des agrégations d'érythrocytes et des neuropathies périphériques ont été rapportées pour le Cremophor® EL à la dose moyenne de 5 mL par jour [Gelderblom et al, 2001]. Ces effets indésirables pourraient s'expliquer par la formation de radicaux libres issus de la peroxydation d'excipients polyinsaturés et/ou par la perturbation directe de la membrane plasmique [Gelderblom et al, 2001 ; Wandel et al, 2003]. En fonction de leur structure chimique, certains esters et éthers de PEG peuvent montrer une toxicité épithéliale à partir d'une concentration de 0,1 mM [Ekelund et al, 2005]. Quant au polysorbate 80, il est aussi capable à partir d'une concentration de 30 µg/mL d'altérer certains paramètres physiologiques intracellulaire et membranaire comme la perméabilité au Ca<sup>2+</sup> ou la concentration cytosolique en glutathion [Hirama et al, 2004]. Comme la mise au point de systèmes lipidiques tend à augmenter, le risque potentiel de cytotoxicité liée aux excipients doit être pris en compte afin d'assurer une meilleure sécurité, efficacité et qualité de ces formulations [Gursoy et al, 2004]. L'utilisation de tests de cytotoxicité *in vitro* mettant en jeu des cultures de cellules permettrait de mieux prédire l'impact *in vivo* de certains excipients.

#### **2.2.2.1 Mises en solution des excipients lipophiles**

Les difficultés de solubilisation en milieu aqueux sont essentiellement rencontrées avec des composés fortement lipophiles comme les excipients huileux ou les surfactants ayant une HLB très basse. Néanmoins la solubilisation des excipients est nécessaire à la réalisation des tests de cytotoxicité. Elle constitue une difficulté non négligeable qui doit être surmontée. L'identification de solvants permettant de solubiliser une forte concentration d'excipients et rendant sa dispersion homogène est essentielle. De plus, le milieu aqueux et le solvant utilisés pour dissoudre le principe actif doit aussi respecter l'intégrité des cellules afin d'éviter les faux positifs. Généralement, les essais de solubilisation se font par des techniques d'agitation dont l'intensité augmente au besoin et les phases dispersantes utilisables sont, par ordre de préférence, des solutions aqueuses compatibles avec la culture cellulaire (DPBS, HBSS, milieu de culture...), le diméthyl sulfoxyde (DMSO) et l'éthanol. Certains polymères comme les PEG400 permettent aussi d'améliorer la solubilisation [Sugano et al, 2001]. La solubilité de l'excipient peut être déterminée par observation visuelle ou microscopique. Si la solution apparaît claire, transparente et exempte de précipitation, la substance est considérée comme dissoute [Stokes et al, 2008].

La première technique de solubilisation préconisée dans les tests de solubilisation consiste à agiter au vortex de façon modérée la solution à température ambiante pendant 1 à 2 minutes. Si la substance n'est pas dissoute, la solution est passée aux ultrasons pendant 5 minutes. En dernier ressort, la solution peut être chauffée à 37°C pendant 5-60 minutes sous agitation magnétique. Si les

différentes techniques de solubilisation sont inefficaces, l'utilisation de solvants organiques s'avère nécessaire. En général, le DMSO ou l'éthanol sont utilisés à une concentration de 0,5% (v/v) [Stokes et al, 2008]. Cependant, la concentration en DMSO ne devrait pas dépasser 0,5-1% (v/v) au risque d'induire des dommages cellulaires [Irvine et al, 1999], bien que dans certaines études, elle atteigne des concentrations de 10% (v/v) tout en montrant une bonne compatibilité du point de vue viabilité cellulaire [Da Violante et al, 2002]

### **2.2.2.2 Tests *in vitro* sur culture cellulaire**

Des nombreux essais de cytotoxicité *in vitro* à court terme ont été développés dans le cadre des études de criblage (chimiothèque). Bien que ces tests ne remplaceront jamais les études *in vivo* sur l'animal, ils peuvent être un outil intéressant dans la pré-sélection des substances dont la toxicité est inconnue et surtout dans l'apport d'informations sur leur activité au niveau cellulaire [Lappalainen et al, 1994]. De plus, ces tests *in vitro* peu onéreux permettent de réduire les expérimentations animales. Récemment, il a été rapporté que le rôle de la toxicologie prédictive est essentiel pour le bon développement d'un médicament tout comme leur application dans la détermination des concentrations non-cytotoxiques des excipients [Kola et al, 2004 ; Sachs-Barrable et al, 2007]

L'essai de cytotoxicité *in vitro* idéal devrait permettre une mesure simple, rapide, efficace, fiable, sensible, reproductible et économique de la viabilité cellulaire. Malheureusement, un tel test n'existe pas pour l'instant et ceci explique le besoin d'utiliser plusieurs types de tests présentant leurs caractéristiques propres (sensibilité, spécificité...). Le choix du test de cytotoxicité approprié se fait en fonction des effets présumés d'une substance inconnue sur les cellules. Ce choix est crucial dans l'obtention de données fiables et ne doit pas être négligé, surtout lors d'études de cytotoxicité à court terme [Pohjala et al, 2007]. Ainsi, il est recommandé d'utiliser plusieurs tests afin d'assurer la fiabilité des données obtenues [Fotakis et al, 2006]. Dans cette partie, les caractéristiques des principaux essais de cytotoxicité seront exposées.

#### **2.2.2.2.1 Observations microscopiques**

La façon la plus simple, rapide et économique de visualiser des altérations cellulaires est l'observation microscopique. Les altérations morphologiques sont souvent les premiers signes d'une mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Bien que différents colorants vitaux permettent d'affiner ces observations, seules des informations générales de modifications structurales peuvent être obtenues par simple observation microscopique [Borenfreund et al, 1985]. Depuis l'émergence de la fluorescence dans le domaine de la microscopie, l'utilisation de marqueurs cellulaires spécifiques couplés à une sonde fluorescente permet également de visualiser de façon précise certaines infrastructures cellulaires [Silva et al, 2006].

#### 2.2.2.2.2 Mesure du TEER

Mentionné précédemment (voir section 2.2.1.1.3), le TEER permet d'évaluer et de suivre l'intégrité, la maturité et l'étanchéité d'une monocouche de cellules mimant la barrière intestinale (voir section 2.2.1.1.3). Sa mesure est simple, fiable et non destructive. Elle consiste à apprécier le flux d'électrolytes entre les compartiments donneur et receveur à l'aide de deux électrodes. Une valeur élevée de TEER signifie qu'une monocouche est étanche et que de nombreuses jonctions serrées s'y sont formées. Par contre, une chute du TEER peut indiquer une augmentation de la perméabilité paracellulaire. Ce paramètre peut être mesuré avec toutes lignées cellulaires capables de former une monocouche de cellules différenciées comme les MDCK, les Caco-2 ou les HT-29.

Les opinions sur la fiabilité du TEER en tant que bon indicateur de cytotoxicité divergent d'un auteur à l'autre. D'une part, Okada et al considèrent que le TEER est un indicateur sensible pour une grande variété de substances (agents formant des pores au niveau des membranes ou agissant sur le cytosquelette) [Okada et al, 2000]. D'autre part, cette sensibilité a été remise en question. Mukherjee et al ont suggéré que le TEER ne reflète que l'intégrité des jonctions serrées et leur récupération. Cette dernière consiste à remplacer la solution contenant l'excipient à tester par un milieu riche en nutriments (milieu de culture...) pendant une durée déterminée afin de laisser une opportunité aux cellules de « récupérer ». Si le TEER revient à sa valeur originelle, les dommages créés par l'excipient sont réversibles. Inversement, si le TEER diminue ou ne change pas, les dommages sont irréversibles. Toutefois, il a été observé que même après un retour à des valeurs normales de TEER, des lésions cellulaires peuvent persister. Ceci a notamment été observé par le test du MTT (voir section 2.2.2.4.1) [Mukherjee et al, 2004]. Par conséquent, le suivi seul du TEER ne permet pas de fournir des résultats objectifs de cytotoxicité. Dans la majorité des études, la détermination de la valeur du TEER est associée à d'autres essais [Collnot et al, 2006].

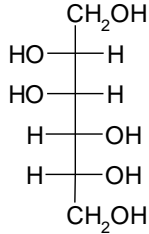
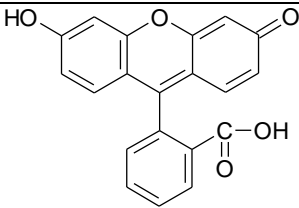
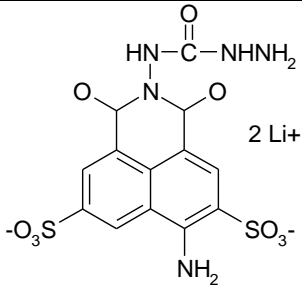
#### 2.2.2.2.3 Marqueurs de perméabilité paracellulaire

Une relation étroite existe entre l'intégrité membranaire et la perméabilité paracellulaire (voir section 2.2.2.2.2). En effet, les lésions membranaires peuvent causer l'ouverture des jonctions serrées. Mais la dénaturation protéique, l'altération des filaments d'actine du cytosquelette ou la modification de la concentration intracellulaire de calcium peuvent aussi avoir un impact sur les jonctions serrées. [Tomita et al, 1995 ; Sakai et al, 1998 ; Konsoula et al, 2005 ; Duizer et al, 1998]. Ceci explique l'utilisation des marqueurs de perméabilité paracellulaire comme tests de cytotoxicité. Comme pour le TEER, ce paramètre peut être mesuré sur toutes les monocouches cellulaires simulant une barrière physiologique.

Les principaux marqueurs sont la fluorescéine, le Lucifer Yellow (LY) et le mannitol radio-marqué. Ils présentent des poids moléculaires variés (voir Tableau 4). Ils ont été utilisés pour étudier la toxicité

de diverses substances affectant la perméabilité paracellulaire comme des enzymes protéolytiques [Bock et al, 1998] ou des promoteurs d'absorption [Anderberg et al, 1993 ; Tomita et al. 1995]. En plus d'être utilisés dans les études de cytotoxicité, ces marqueurs servent couramment à vérifier la qualité des monocouches cellulaires [Irvine et al, 1999 ; Hubatsch et al, 2007].

**Tableau 4 : Marqueurs de perméabilité paracellulaire [Konsoula et al, 2005]**

Dénomination	Poids moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Structure chimique
<i>[<sup>3</sup>H]Mannitol</i>	128	
<i>Fluorescéine</i>	376	
<i>Lucifer Yellow</i>	450	

Le mannitol radio-marqué est le marqueur le plus souvent utilisé du fait de sa grande sensibilité dans la détermination des dommages au niveau des jonctions serrées [Konsoula et al, 2005]. Cependant, la fluorescéine et le LY apportent une alternative non radioactive à l'étude de la perméabilité paracellulaire [Hubatsch et al, 2007]. En général, les marqueurs fluorescents sont utilisés à des concentrations allant de 100µM à 2,2mM, tandis que le mannitol est utilisé à 0,1% (m/v). Malgré la grande sensibilité des techniques de fluorescence, celle du dosage radioactif du mannitol se révèle être supérieure. Mais les méthodes de fluorescence restent intéressantes en termes de sécurité et de gestion des déchets [Konsoula et al, 2005]. De plus, elles peuvent fournir des informations sur le diamètre d'ouverture des jonctions serrées. En effet, Noach et al. ont couplé la fluorescéine à des dextrans de poids moléculaires variés. Ces composés présentent ainsi des tailles variées et le suivi de leur perméabilité permet d'estimer la taille d'ouverture des jonctions serrées [Noach et al, 1993].

Certains excipients pharmaceutiques comme le Softigen® 767, peuvent agir sur les jonctions serrées [Cornaire et al, 2004]. L'utilisation de ces marqueurs peut aider à exposer ces effets.

#### 2.2.2.2.4 Activité métabolique cellulaire

Les tests de cytotoxicité évaluant le métabolisme cellulaire existent depuis plus de 20 ans. De nombreuses modifications permettant de les améliorer et de les optimiser ont été apportées au fil des années. Ces tests ont été largement exploités dans les études de criblage à haut débit [Hamid et al, 2004 ; Wang et al, 2004]. Les techniques les plus fréquemment utilisées ont été celles mettant en jeu les sels de tétrazolium et le resazurin.

##### 2.2.2.2.4.1 Les sels de tétrazolium

Les tests aux sels de tétrazolium sont des tests colorimétriques permettant d'étudier les effets cytotoxiques de substances chimiques [Vellonen et al, 2004]. Le principe de cette méthode repose sur la réduction des sels de tétrazolium lors du transport des électrons dans la chaîne respiratoire des mitochondries [Mosmann et al, 1983]. Cette réduction reflète l'activité métabolique mitochondriale qui peut être altérée sous l'effet d'excipients ou d'autres substances chimiques.

Le premier sel de tétrazolium à avoir été développé est le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Ce réactif est dilué à une concentration de 5 mg/mL dans du milieu de culture dépourvu de sérum. Après exposition des cellules aux substances à tester pendant une durée bien déterminée (2 à 24 heures), le MTT est mis au contact des cellules. Une incubation de 3-4 heures à 37°C sous atmosphère humide et à 5% de CO<sub>2</sub> est nécessaire pour que le MTT entre dans les cellules soit par endocytose soit par l'intermédiaire d'un transporteur membranaire [Liu et al, 1997]. Au contact des cellules viables, le réactif MTT de couleur jaune est réduit par des déhydrogénases en cristaux de formazan MTT insolubles dans l'eau. Ces cristaux dont la formation est proportionnelle au nombre de cellules viables, peuvent être facilement solubilisés par du DMSO ou de l'isopropanol. Une simple mesure d'absorbance permet d'obtenir les résultats de ce test aux sels de tétrazolium [Mosmann et al, 1983 ; Holst et al, 2005 ; Hansen et al, 1989].

Vers la fin des années 80, des sels analogues au MTT ont été mis au point. Ils présentent l'avantage d'aboutir à la formation de formazans solubles dans l'eau après métabolisation enzymatique par des cellules viables. Ces sels correspondent aux 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium (MTS), disulfonate de 4-[3-(4-iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzène (WST-1) et sodium(2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulphophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide (XTT). Avec ces sels, l'étape de solubilisation du formazan n'est plus nécessaire. En réduisant le protocole d'une étape, les risques d'imprécision et d'erreur diminuent également. Le MTS, le WST-1 et le XTT se différencient essentiellement par la longueur d'onde d'absorption utilisée pour leur détection. Cependant, ces sels demandent la présence d'un accepteur intermédiaire d'électrons, le méthosulfate de phénazine, afin de catalyser la formation du formazan.



Cette méthode a été largement utilisée dans l'étude de promoteurs d'absorption [Mukherjee et al, 2004] tout comme dans celle d'excipients pharmaceutiques [Wang et al, 2004]. Néanmoins, cette technique présente aussi un certain nombre de limites. Ces sels peuvent notamment être réduits ailleurs que dans les mitochondries. Des inhibiteurs et substrats de protéines d'efflux [Vellonen et al, 2004], diverses substances chimiques [Konsoula et al, 2005], des enzymes cytosoliques ou microsomales ainsi que la membrane plasmique peuvent réduire de façon non spécifique les sels de tétrazolium. De ce fait, la cytotoxicité peut être sous-estimée ou complètement masquée [Bernas et al, 2000 ; Gonzalez and Tarloff, 2001]. Pour éviter ces erreurs d'interprétations des résultats obtenus, il est recommandé de réaliser en parallèle d'autres tests aux sels de tétrazolium en l'absence de cellules [Konsoula et al, 2005]. Enfin, cette méthode est destructive et ne permet donc pas de réaliser des études ultérieures avec les mêmes cellules [Holst et al, 2005].

Outres les inconvénients cités précédemment, les tests aux sels de tétrazolium présentent les avantages d'être reproductibles [Lappalainen et al. 1994] et très sensibles [Fotakis et al. 2006]. L'activité mitochondriale est un marqueur de cytotoxicité aigüe qui montre des signes de lésions cellulaires beaucoup plus précoces qu'avec les deux autres méthodes vues précédemment ou avec des marqueurs d'intégrité membranaire [Konsoula et al, 2005].

#### 2.2.2.4.2 *Resazurin*

La méthode utilisant le resazurin (aussi connu sous le nom de Alamar Blue™) est basée sur un mécanisme similaire à celui des sels de tétrazolium. Le principe de cette méthode consiste à utiliser un marqueur d'oxydoréduction, le resazurin. Ajouté dans un milieu de culture, ce réactif de couleur bleu foncé et non-fluorescent est assimilé au niveau cellulaire où il est réduit en un produit rouge fluorescent, le resofurin [O'Brien et al, 2000]. Cette réduction se fait aussi au niveau des mitochondries mais la principale différence avec les sels de tétrazolium est que le resazurin capte les électrons à une autre étape de la chaîne respiratoire [O'Brien et al, 2000 ; Holst et al, 2005].

Du fait de leurs similarités, de nombreuses comparaisons ont été faites entre le resazurin et les sels de tétrazolium. Ces comparaisons ont amené à des résultats très divergents sur la sensibilité de ces méthodes. Hamid et al ont observé une meilleure sensibilité avec le resazurin [Hamid et al, 2004], tandis que Holst et al ont observé le phénomène inverse [Holst et al, 2005].

Le resazurin et les sels de tétrazolium présentent un inconvénient en commun qui est le risque de réduction non-spécifique du réactif par des systèmes d'oxydoréduction présents au niveau du cytoplasme ou des microsomes [O'Brien et al, 2000 ; Gonzalez and Tarloff, 2001]. Ces réductions peuvent amener à des faux positifs. Par contre, le resazurin affiche le précieux avantage de ne pas être destructif vis-à-vis des cellules et permet ainsi leur utilisation pour des études ultérieures. Les

cellules gardent leurs fonctions intactes comme celle de la production aérobie d'ATP [Holst et al. 2005].

#### 2.2.2.2.5 Marqueurs d'intégrité membranaire

Les marqueurs d'intégrité membranaire permettent d'apprécier l'état de la membrane après exposition à une substance toxique. Ces marqueurs correspondent soit à des substances endogènes présents dans les cellules comme la lactate deshydrogénate (LDH) soit à des substances exogènes (rouge neutre, bleu trypan...) dont l'accumulation intracellulaire est étudiée.

##### 2.2.2.2.5.1 LDH

Jusqu'à un certain seuil, la présence de LDH dans le surnageant cellulaire indique des lésions au niveau de la membrane plasmique. Les cellules mortes suite à la destruction de leur membrane plasmique, libèrent une grande quantité de LDH. Le dosage de cette enzyme peut se faire de diverses façons. Il est possible de le réaliser par des mesures d'absorbance à l'aide d'un lecteur de microplaques. Ceci permet l'application de ce test aux criblages à haut débit. Les informations fournies permettent d'étudier des phénomènes de cytotoxicité [Fotakis et al, 2006; Silva et al, 2006; Pohjala et al, 2007].

Le test de la LDH est connu pour sa faible sensibilité. De plus, il n'est capable que de détecter des effets directs sur la membrane plasmique, tandis que les sels de tétrazolium permettent de détecter des troubles intracellulaires plus profonds [Pohjala et al, 2007]. En plus de sa faible sensibilité, les résultats sont moins précis et moins reproductibles d'une expérience à l'autre en comparaison de ce qui est observé avec les sels de tétrazolium [Lappalainen et al, 1994 ; Fotakis et al, 2006].

Comme pour les autres méthodes, le test de la LDH a été utilisé pour étudier les propriétés cytotoxiques d'excipients pharmaceutiques comme la Vitamine E TPGS® [Collnot et al, 2006], du polysorbate 80, du Cremophor® EL [Cornaire et al, 2000],...

##### 2.2.2.2.5.2 Autres marqueurs

Le rouge neutre (NR) ou chlorure de 2-amino-3-méthyl-7-diméthylaminophénazonium est un colorant vital hydrosoluble, peu onéreux et utilisé dans certains tests de cytotoxicité. Après sa diffusion à travers la membrane plasmique de cellules intactes, il s'incorpore au niveau des lysosomes. Le NR étant légèrement électropositif, il a tendance à former des liaisons électrostatiques avec les sites anioniques présents dans l'environnement lysosomal. Contrairement aux tests d'activité métabolique, le NR n'est pas censé être dégradé enzymatiquement. Ainsi, le risque de faux négatif est moins important [Finter et al, 1969 ; Borenfreund et al, 1985]. En fonction des études réalisées, certains auteurs trouvent une meilleure sensibilité du NR par rapport à celle de la LDH [Fotakis et al, 2006], alors que d'autres la trouvent inférieure [Weyermann et al, 2005]. Comme pour

le TEER, son association avec d'autres tests de cytotoxicité peut se révéler utile dans l'identification de mécanismes amenant aux effets cytotoxiques [Borenfreund et al, 1988].

De nombreux marqueurs similaires existent. Par exemple, le bleu trypan est aussi un colorant vital hydrophile utilisé couramment en culture cellulaire pour différencier les cellules mortes des cellules vivantes. D'autres composés comme la calcein-AM sont aussi utilisables...

Tout comme les tests de cytotoxicité, les phénomènes de digestion lipidique ont une grande importance.

### **2.2.3 Lipolyse**

La lipolyse intestinale est un processus physiologique survenant après administration orale de tout produit lipidique. Elle peut jouer un rôle dans la biodisponibilité d'un principe actif en fonction de la sensibilité des excipients utilisés dans le système lipidique.

#### ***2.2.3.1 Métabolisme lipidique physiologique***

Les modalités du processus de lipolyse gastro-intestinale des lipides sont des éléments déterminants dans la compréhension des phénomènes de solubilisation des lipides et des principes actifs lipophiles.

Le métabolisme des lipides exogènes provenant de l'alimentation ou de traitements médicamenteux commence généralement au niveau de l'estomac où les triglycérides sont hydrolysés en diglycérides et en acides gras par des lipases acides. Parmi ces enzymes, la lipase gastrique et la lipase linguale contribuent principalement à cette hydrolyse. Ces lipases présentent une meilleure affinité vis-à-vis de triglycérides à chaîne moyenne que pour les triglycérides à chaîne longue. Les phospholipides et les esters de cholestérol ne sont pas métabolisés par ces enzymes [Nordskog et al, 2001] et les lipases acides peuvent être inhibées par les acides gras à chaîne longue. Ce dernier phénomène permet d'expliquer la faible contribution des lipases acides à l'hydrolyse totale des triglycérides provenant de l'alimentation. En effet, la lipolyse gastrique ne représente que 10-30% de cette hydrolyse totale [Pafumi et al, 2002 ; Mu et al, 2004].

Au niveau du tractus gastro-intestinal, l'émulsification des lipides exogènes a lieu d'abord dans l'estomac. Elle se fait de façon relativement grossière avec formation de gouttelettes de grandes tailles. Les mécanismes de contraction et de vidange gastrique ainsi que la présence de phospholipides, de protéines, de polysaccharides et d'autres produits amphiphiles exogènes contribuent à cette formation en stabilisant les interfaces eau/huile [Armand et al, 1996]. Arrivés au niveau du duodénum, les lipides exogènes stimulent la sécrétion de sels biliaires, de phospholipides, de cholestérol et de fluides pancréatiques (contenant des lipases pancréatiques) [Kossena et al,

2007]. Grâce à la présence de ces sécrétions et de la pré-hydrolyse gastrique, une émulsification plus stable, homogène et fine peut se mettre en place [Embleton et al, 1997 ; Mu et al, 2004]. Par la suite, le processus de digestion lipidique est complété par l'action de complexes de lipase/co-lipase pancréatiques. Les lipases se fixent à la surface des gouttelettes d'huile afin d'hydrolyser les triglycérides en 2-monoglycéride et en acides gras. Cependant, les concentrations physiologiques de sels biliaires et de phospholipides inhibent l'activité des lipases pancréatiques. Dans de telles conditions, le rôle de la co-lipase est essentiel afin de permettre aux lipases pancréatiques de se fixer à la surface des gouttelettes d'huile [van Tilbeurgh et al, 1999 ; Miled et al, 2000 ; Lowe et al, 2002]. Les produits de lipolyse gastrique sont aussi de puissants agents émulsifiants et les acides gras favorisent la liaison du complexe lipase/co-lipase à la surface de l'émulsion. Ces facteurs montrent que la lipolyse est un processus essentiellement auto-catalytique [Embleton et al, 1997; Nordskog et al, 2001].

Une attention particulière peut être apportée aux inhibiteurs de lipases qui peuvent modifier de façon significative les phénomènes physiologiques de lipolyse. A titre d'exemple, l'orlistat qui est un médicament indiqué dans le traitement de l'obésité, peut bloquer la digestion lipidique au niveau gastro-intestinal [Padwal et al, 2007]. Ce genre d'interactions médicamenteuses peut ainsi affecter la biodisponibilité orale de certaines formes pharmaceutiques.

Tout au long du processus de lipolyse gastro-intestinale, des variations chimiques et physiques liées à la digestion de lipides exogènes peuvent survenir au niveau de la lumière intestinale. Des systèmes micellaires composés de sels biliaires et de phospholipides peuvent se former et faciliter la solubilisation de substances lipophiles au niveau du tractus gastro-intestinal. Dans le cadre des systèmes lipidiques, il est possible de contrôler ces paramètres au moment du choix des excipients lipidiques.

### ***2.2.3.2 Métabolisme gastro-intestinal des systèmes lipidiques***

En stimulant la sécrétion de sels biliaires au niveau du duodénum, les lipides exogènes en association avec les produits de lipolyse permettent la formation d'une série d'entités colloïdales comme des micelles, des micelles mixtes ou des émulsions. Depuis longtemps, les repas riches en lipides sont connus pour favoriser la sécrétion de sels biliaires. Or des études récentes ont montré que de **petites quantités de lipides** (de l'ordre du gramme) étaient capables de stimuler les contractions de la vésicule biliaire et la sécrétion des sels. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'administration orale de gélules ou de capsules molles renfermant un système lipidique serait à même de stimuler la sécrétion de sels biliaires à jeun [Kossena et al, 2007].

L'association citée précédemment (sels biliaires, lipides exogènes, produits de lipolyse) et la présence de lipides endogènes (phospholipides, cholestérol...) permettent aussi une bonne **solubilisation** des principes actifs peu hydrosolubles dans un microenvironnement lipidique contenant des émulsions, des systèmes micellaires et vésiculaires [Wiedmann et al. 2002]. Parallèlement, ceci permet de créer un réservoir de principes actifs solubilisés au niveau du site d'absorption et de générer un gradient de concentration requis pour favoriser l'absorption du principe actif du compartiment intestinal vers le compartiment sanguin. Certaines substances amphiphiles présentes dans le lumen comme les sels biliaires ou les phospholipides, permettent aussi d'améliorer l'absorption de principes actifs peu hydrosolubles en facilitant leur solubilisation à des concentrations en dessous de leur CMC [Luner et al, 2001].

La digestion lipidique d'une forme orale est un processus dynamique et complexe durant lequel différentes phases peuvent être rencontrées. Rube et al ont réalisé la première tentative de suivi en temps réel de la distribution du principe actif présent au sein d'entités colloïdales en utilisant la spectrométrie par résonance paramagnétique électronique [Rube et al, 2006]. Cependant, la majorité des études faites à ce sujet n'ont décrit que des phénomènes de solubilisation du principe actif dans des systèmes formés à la suite du contact entre une forme orale et un milieu aqueux. Ces systèmes se présentent sous forme de **liquides colloïdaux simples**, de **structure lamellaire** ou de **structure cubique**. Au cours de la digestion de la formulation, ces trois formes peuvent être rencontrées et leur capacité à faire passer le principe actif à travers la barrière intestinale peut varier. Kossena et al ont formulé la cinnarizine, un antihistaminique faiblement hydrosoluble, avec des proportions différentes en acides gras et en monoglycérides. Ces mélanges ont été administrés à des rats dont la sécrétion biliaire a été bloquée. Une augmentation de la concentration sanguine en cinnarizine a été observée, lorsque le principe actif se trouve dissout dans un système à phase lamellaire. Par contre, en présence de sécrétion biliaire, cette concentration augmente pour le système à phase cubique et diminue pour le système à phase lamellaire. Ainsi, la composition de ces formes orales et leur sensibilité à la lipolyse influencent sensiblement l'absorption intestinale du principe actif [Kossena et al, 2005].

Au niveau du tractus gastro-intestinal, la **composition des formulations** peut faire varier les mécanismes de solubilisation du principe actif. Une étude sur l'impact de la concentration en lipides et la présence de structures colloïdales sur les phénomènes de solubilisation a été réalisée en utilisant de l'hydrocortisone et différents esters d'hydrocortisone comme principes actifs lipophiles. Lorsque les structures vésiculaires contiennent une forte quantité de lipides en C8, leur capacité de solubilisation est inférieure à celle de structures contenant des lipides à chaînes plus longues (C12 et

C18). De ce fait, la nature des composants ainsi que leurs proportions sont des paramètres importants pour obtenir une biodisponibilité optimale [Kossena et al, 2004].

Par conséquent, il apparaît évident que la capacité de solubilisation des structures colloïdales formées à l'issue de la dispersion et de la digestion des systèmes lipidiques puisse être dépendante de la quantité d'excipients lipidiques inclus, de leurs natures (surfactants, co-surfactants et co-solvants) et des lipides endogènes (sels biliaires, phospholipides) présents. Le choix du lipide (sensibilité à la lipolyse, longueur de chaîne, présence d'insaturation), de l'inclusion de surfactant, co-surfactant et co-solvant et du type de formulation (Type I, systèmes micellaires, SEDDS, SMEDDS®...) ont un grand impact sur la biodisponibilité de principe actif formulé [Porter et al, 2008].

### **2.2.3.3 Modèles *in vitro* de lipolyse intestinale**

Récemment, de nombreux modèles *in vitro* de dispersion et de lipolyse simulant l'environnement gastro-intestinal ont été développés afin de mieux prédire le profil de dissolution *in vivo* de principes actifs lipophiles [Dahan et al, 2007 ; Brogård et al, 2007]. Des milieux de dissolution reflétant fidèlement les conditions de lipolyse *in vivo* ont été largement décrits dans la littérature [Vertzoni et al, 2004 ; Kostewicz et al, 2004]. L'efficacité des systèmes lipidiques, au sens large du terme, ne se définit pas uniquement par leur composition, leur capacité de dispersion dans les fluides gastro-intestinaux ou leur effet sur des protéines responsables de résistance médicamenteuse. Il faut aussi tenir compte de leur comportement vis-à-vis de la lipolyse. Un bon modèle de lipolyse doit être capable de former les entités colloïdales obtenues à la suite de la dispersion et de la digestion des composants de la formulation. Ces entités sont notamment composées de surfactants endogènes (sels biliaires, phospholipides, cholestérol...), des composants de la formulation et de leurs produits de lipolyse.

Comparativement au test traditionnel de dissolution (voir section 2.1), les modèles actuels s'intéressent à la précipitation de la fraction solubilisée du principe actif en fonction du temps. Ces tests *in vitro* décrivent plus fidèlement les capacités de la formulation à maintenir la substance active à l'état solubilisé durant la dispersion au niveau de l'estomac et ultérieurement durant la digestion de la formulation par les fluides biliaires et pancréatiques. Porter et al ont décrit cette évaluation *in vitro* en deux étapes. La première consiste à étudier les propriétés dispersantes d'une formulation dans un milieu simulant les conditions acides de l'estomac (0,1 N HCl). D'un point de vue cinétique, l'efficacité de la dispersion est évaluée par la mesure de la taille des particules formées. Cette manière de procéder permet surtout de déceler des phénomènes de précipitation du principe actif lors de la phase de dispersion en prélevant des échantillons à des temps bien déterminés. Par la suite, ces échantillons sont centrifugés et le principe actif est dosé d'une part dans le surnageant et

d'autre par dans le culot. En pratique, la probabilité qu'il y ait précipitation dans le cas d'une formulation de type I et II est faible puisque la proportion en composés lipophiles est plus importante. Inversement, les formulations de type III et IV présentent plus de risques de précipitation puisqu'elles contiennent des quantités plus importantes de surfactants non-ioniques plus hydrophiles ainsi que des co-solvants [Porter et al, 2008]. La deuxième étape tient compte des changements possibles dans la capacité de solubilisation suite à la digestion de certains composés de la formulation et à l'interaction avec certains agents solubilisants endogènes (sels biliaires, phospholipides...). Ces changements sont étudiés à l'aide de modèles *in vitro* de lipolyse (Figure 7) [Porter et al, 2004 ; Goddeeris et al, 2007]. En général, l'étude de la lipolyse des formulations se fait à l'aide de fluides simulant les conditions intestinales puisque la majorité de la digestion lipidique a lieu au niveau de l'intestin. Cependant, ce choix n'est pas toujours justifié puisque la lipolyse est initiée au niveau de l'estomac par des lipases gastriques. De plus, dans le cas d'un traitement thérapeutique, de petites quantités de lipides contenues dans les systèmes lipidiques sont administrées. Par conséquent, l'effet de la lipolyse gastrique peut être significatif. Cet effet est d'autant plus amplifié lors de l'utilisation d'excipient comme le Labrasol® qui contient des glycérides à chaîne moyenne sensibles aux lipases gastriques [Fernandez et al, 2007].

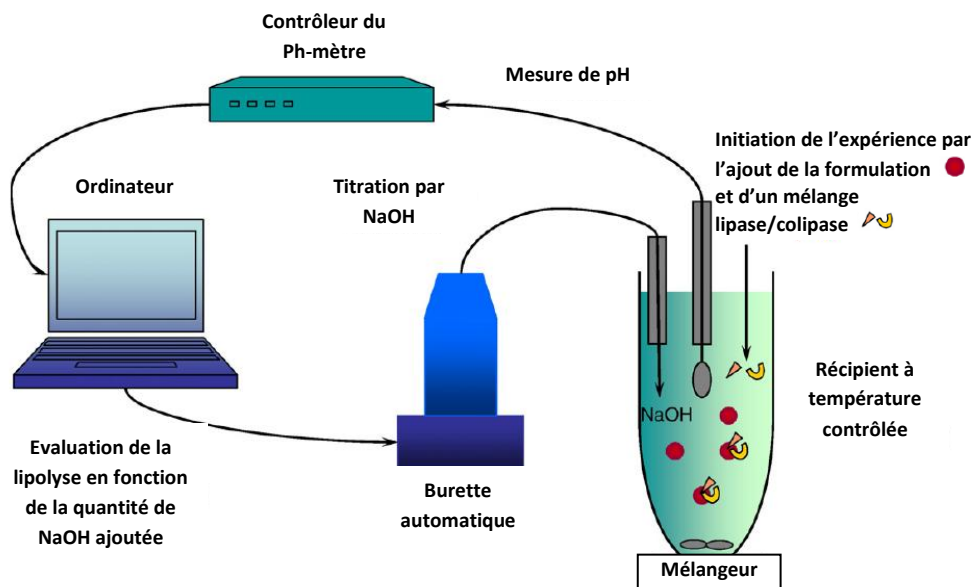


Figure 7 : Modèle de lipolyse pour l'évaluation *in vitro* de formulations lipidiques. Le principe de cette méthode consiste à utiliser un récipient contenant un milieu de digestion lipidique (sels biliaires, phospholipides, lipases...) stabilisé à 37°C ainsi que le système lipidique à tester. Au niveau de ce récipient, l'activité des lipases pancréatiques sur les lipides exogènes et endogènes libère des acides gras libres qui font chuter le pH. Cette chute de pH est ensuite titrée par pHmétrie et réajustée par l'ajout d'une quantité équimolaire de soude [Porter et al, 2008].

L'application des modèles de lipolyse sur les **systèmes lipidiques** (SEDDS, SMEDDS®...) permet de prédire leurs performances *in vivo*. En effet, une étude sur le danazol sous forme de SMEDDS® contenant des triglycérides à chaînes longues d'une part et des triglycérides à chaînes moyennes

d'autre part, a permis l'établissement d'une bonne corrélation *in vitro/in vivo*. Dans cette même étude, le danazol précipite fortement lorsqu'il est formulé avec des triglycérides à chaînes moyennes, alors qu'avec des triglycérides à chaînes longues, le principe actif reste majoritairement solubilisé. Lors du stade initial de dispersion, les deux formulations ont présenté des phénomènes de précipitation semblables suggérant que les processus de lipolyse les différencieraient principalement. Cette différence s'est confirmée par des expériences *in vivo* chez le chien montrant une meilleure biodisponibilité orale du danazol lorsqu'il est formulé avec des triglycérides à chaînes longues [Porter et al, 2004]. Des expériences similaires de lipolyse ont été aussi réalisées sur l'halofantrine, le danazol, le diazépam, la cinnarizine, et la griséofulvine formulés avec des triglycérides de longueurs de chaînes variées [Kaukonen et al, 2004]. Par contre, une étude s'est intéressée à l'impact de la nature du surfactant sur la solubilisation et la biodisponibilité orale de l'atovaquone sous forme de SEDDS. Lors des tests de lipolyse, aucune différence de solubilisation n'a été observée entre les deux formulations contenant des triglycérides à chaîne longue, de l'éthanol et du Cremophor® EL ou du Pluronic® L121. Pourtant, leurs propriétés auto-émulsifiantes étaient bien différentes. En accord avec les résultats de solubilisation, les biodisponibilités orales de l'atovaquone chez le chien pour ces deux formulations se sont révélées similaires. Ainsi, dans certains cas, la sensibilité à la lipolyse joue un rôle plus important par rapport à la composition de la formulation [Sek et al, 2006]. Par conséquent, il existe une bonne corrélation entre le profil de solubilité du principe actif durant une lipolyse *in vitro* et les modifications survenant *in vivo*.

La **dégradation des surfactants** peut avoir un impact sur les performances d'une formulation. En effet, tous les esters d'acide gras utilisés comme surfactants ne sont pas tous pris en charge de la même façon lors de la lipolyse. Par exemple, le Cremophor® RH40 est moins dégradé par les lipases que le Cremophor® EL. Actuellement, les explications de ces différences de sensibilité à la digestion ne sont pas évidentes. Mais des raisons stéréochimiques liées à la saturation des chaînes aliphatiques ou à la taille du motif polyéthylène glycol pourraient être incriminées. Une étude de digestion *in vitro* sur deux SMEDDS® qui diffèrent par la nature de leur surfactants (Cremophor® RH40 et Cremophor® EL), a montré une différence évidente dans leur pouvoir de solubilisation *in vitro*. Ainsi, les formulations contenant des surfactants peu sensibles à la lipolyse comme le Cremophor® RH40 présentent moins de risque de précipitation. Par la suite, des études de biodisponibilité *in vivo* ont effectivement montré que la biodisponibilité orale du danazol est bien meilleure avec le Cremophor® RH 40 qu'avec le Cremophor® EL [Cuiné et al, 2008]. Les enzymes pancréatiques responsables de la dégradation des surfactants n'ont pas été clairement identifiés mais la « pancreatic lipase-related protein 2 » et la « carboxyl ester hydrolase » joueraient un rôle important dans la digestion de certains excipients lipidiques polyéthoxylés [Fernandez et al, 2007].



## 2.3 Stratégie de formulation

Pour certaines substances actives, et en particulier pour les molécules lipophiles de classe II BCS, les systèmes lipidiques apportent des solutions efficaces et rapides à des problèmes de formulations. Ces difficultés correspondent généralement à la faible solubilité des molécules dans les fluides gastro-intestinaux. Bien que les potentiels qu'offrent les systèmes lipidiques soient connus depuis plusieurs années, l'étude des mécanismes entrant dans la mise à disposition des principes actifs n'a fait l'objet de recherches que récemment. A cette fin, une série de tests *in vitro* de dispersion et de digestion ont permis de réaliser beaucoup de progrès dans la compréhension des mécanismes de solubilisation.

Historiquement, la mise au point des formulations lipidiques auto-émulsifiantes et le choix des excipients reposaient principalement sur la solubilité de la substance à formuler, l'aisance qu'avait la formulation de se disperser dans un système aqueux et la taille des gouttelettes formées après le processus d'émulsification. Récemment, de nouveaux paramètres ont été pris en compte. La **digestion des excipients lipidiques** au niveau du tractus gastro-intestinal peut notamment amener à des problèmes de solubilité de principes actifs incorporés dans un système lipidique. Des études de lipolyse sont de plus en plus couramment menées afin d'enrichir les données concernant les prédictions *in vitro/in vivo*. En effet, la digestibilité des huiles utilisées dans les formulations est importante. L'utilisation d'huiles non-digestibles au sein de certaines formulations peut provoquer une diminution de l'absorption des principes actifs. Ceci peut s'expliquer par une rétention de ces derniers au sein de la phase huileuse diminuant de la sorte leur transfert vers la phase aqueuse luminale où l'absorption peut avoir lieu. L'utilisation d'huiles sensibles à la lipolyse comme les huiles de soja, de maïs et d'olive est généralement préférée et permet d'améliorer la biodisponibilité de principes actifs faiblement hydrosolubles [Stegemann et al, 2007 ; Porter et al, 2008].

Porter et al. suggèrent de prendre en compte sept principes généraux (Tableau 5) permettant de définir une stratégie appropriée pour la formulation d'un système lipidique. Cependant, les considérations toxicologiques et réglementaires ne sont pas prises en compte dans ces principes [Porter et al. 2008] :

Tableau 5 : Liste des 7 principes généraux que Porter et al proposent de suivre lors de la formulation d'un système lipidique [Cuiné et al, 2008 ; Porter et al, 2008]

	Principes	Tests associés
1	La <b>solubilité</b> du principe actif dans la formulation et son <b>maintien</b> sous forme solubilisée lors de sa dispersion au niveau de l'estomac et de sa digestion au niveau de l'intestin, sont des indicateurs critiques de la performance <i>in vivo</i> des formulations.	Lipolyse et dissolution
2	Les propriétés des <b>entités colloïdales</b> formées après contact de la formulation avec le contenu gastro-intestinal définissent les mécanismes de solubilisation du principe actif au niveau du site d'absorption. La solubilisation intestinale effective des colloïdes peut être améliorée ou atténuée par des interactions avec l'environnement biologique.	Lipolyse, dissolution et granulométrie
3	Les <b>SEDDS</b> composés de forte proportion de triglycérides et d'une quantité plus petite de surfactant et de co-solvant permettent, en général, une <b>solubilisation plus robuste</b> des principes actifs en termes de dispersion et digestion.	Lipolyse et dissolution
4	Pour les substances très lipophiles, les produits issus de la digestion de <b>triglycérides à chaîne longue</b> favorisent la solubilisation de ces substances dans des micelles mixtes ou dans des vésicules composées de sels biliaires et de produits de digestion. Ceci mène à une meilleure biodisponibilité qu'avec des triglycérides à chaîne moyenne, bien que des exceptions existent.	Lipolyse et perméabilité intestinale
5	Les <b>SMEDDS</b> <sup>®</sup> contenant une plus forte proportion de surfactants permettent une dispersion très fine. Ceci dépend beaucoup de la nature du surfactant. La performance <i>in vivo</i> de ces formulations contenant des <b>surfactants sensibles à la lipolyse</b> est réduite en comparaison de celles contenant moins de surfactants sensibles.	Lipolyse et perméabilité intestinale
6	Les formulations de <b>type IV</b> contenant un unique surfactant sont limitées par leur faible pouvoir dispersant. Mais cet inconvénient peut être surmonté par l'ajout d'un <b>co-surfactant</b> .	Dissolution et cytotoxicité
7	Les formulations de <b>types IV</b> contenant seulement des surfactants et des co-solvants pourraient être utiles dans les situations où la solubilité du principe actif est meilleure que dans un mélange incorporant des glycérides. Cependant, il faut faire attention aux formulations comportant une grande quantité de substances hydrophiles qui pourraient être responsables de <b>phénomène de précipitation</b> lors de la dispersion. Il en est de même pour les formulations comportant une grande quantité d'esters d'acide gras (surfactants) dont la digestion peut aussi amener à des phénomènes de précipitation. L'utilisation d'excipients résistants à la lipolyse est un critère propre aux formulations de type IV parce que, pour les SEDDS et les SMEDDS <sup>®</sup> , la lipolyse permet une meilleure solubilisation et absorption du principe actif.	Dissolution

De nombreux auteurs ont proposé des stratégies pour la formulation de principes actifs faiblement hydrosolubles à base d'excipients lipidiques. Ces stratégies gardent généralement la même ligne directrice. Dans un premier temps, la formulation d'une substance faiblement hydrosoluble se fait à l'aide d'excipients huileux (type I). Le recours aux surfactants ne survient qu'en cas d'échec. Au cas où le mélange surfactants/huiles ne suffirait pas pour obtenir une bonne solubilisation du principe actif ou à améliorer sa biodisponibilité, la mise au point de systèmes auto-émulsifiants (SEDDS, SMEDDS®, micelles) est nécessaire. Quel que ce soit le type de formulation, les sept principes mentionnés sur le Tableau 5 doivent être suivis afin de tenir compte des phénomènes de solubilité, de dispersion, de composition, d'absorption et de lipolyse. La Figure 8 récapitule les relations existantes entre les différents principes et une stratégie classique de formulation [Strickley et al, 2004].

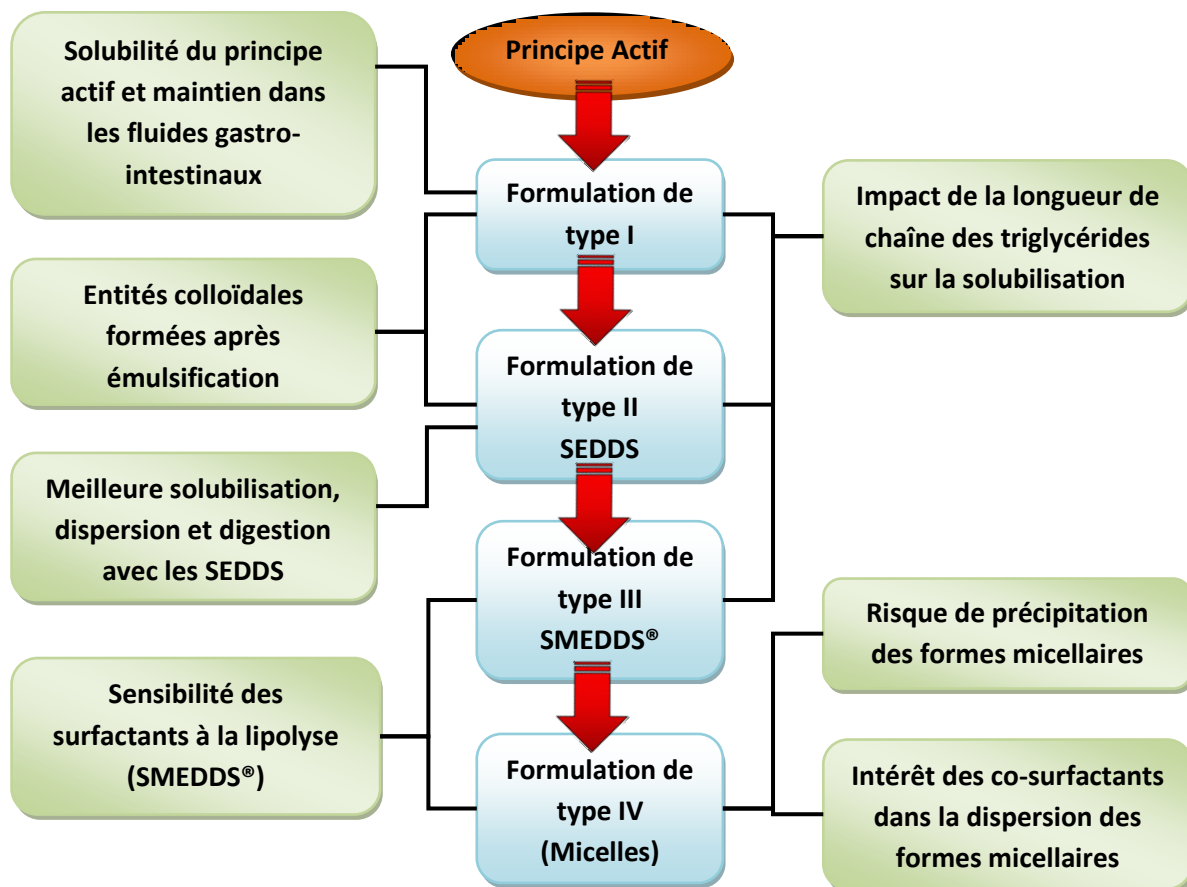


Figure 8 : Relations entre les principes émis par Porter dans la stratégie de formulation d'un système lipidique



# PARTIE EXPERIMENTALE

---

Les travaux réalisés au cours de mon travail doctoral ont porté principalement sur deux études.

La première étude a concerné l'évaluation de la cytotoxicité d'excipients commerciaux et de systèmes lipidiques de type II (SEDDS) et III (SMEDDS®). Nous nous sommes intéressés à leurs effets sur différentes infrastructures cellulaires comme la membrane plasmique, les jonctions serrées ou l'activité métabolique.

La seconde étude a été focalisée sur la mise en forme d'une substance de la classe IV BCS présentant des propriétés anticancéreuses intéressantes, l'orlistat.



# Chapitre 3: Evaluation de la cytotoxicité d'excipients utilisés dans les systèmes lipidiques

## 3.1 Introduction générale

Dans la formulation de systèmes lipidiques innovants destinés à solubiliser un principe actif peu hydrosoluble dans des nano-gouttelettes au niveau du tractus gastro-intestinal, un choix important d'excipients est disponible (voir section 1.2). Les surfactants non-ioniques sont les plus largement utilisés du fait de leur pouvoir solubilisant. Ils sont principalement représentés par des dérivés d'huile de ricin polyoxyéthylénés (Cremophor® EL) [Gelderblom et al, 2001], des hydrostéarates de PEG-15 (Solutol® HS15) [Buckingham et al, 1995], des polysorbates (Montanox®, Tween®) et des dérivés vitaminés (Vitamine E TPGS®) [Constantinides et al, 2006]. D'autres types d'excipients comme les co-solvants (PEG300) ou les excipients huileux (Labrafil® M1944CS) sont fréquemment utilisés pour leur propriété solubilisatrice (Tableau 1). Ces composés présentent des différences structurales impliquant aussi des activités biologiques diverses et variées comme des perturbations de la fluidité de la membrane plasmique ou des modifications de conformations de protéines membranaires (jonctions serrées...). Par conséquent, ces activités peuvent provoquer de potentiels effets indésirables. En effet, il a été rapporté dans la littérature que certains excipients peuvent présenter de tels effets. Par exemple, le Cremophor® EL [Gelderblom et al, 2001], le polysorbate 80 [Hirama et al, 2004], le Labrasol®, le Softigen® 767 [Cornaire et al, 2004] ou les poloxamères [Kabanov et al, 2003] sont connus pour exercer des effets toxiques comme des réactions d'hypersensibilité anaphylactiques ou de toxicité épithéliale.

Des mises en garde ont été faites ces dernières années quant à la rapide et large expansion des nanotechnologies. De nombreux impacts sur la santé et notamment sur l'appareil respiratoire ont été relevés [Nel et al, 2006 ; Oberdörster et al, 2005]. Par contre, peu d'études ont été menées sur l'assimilation des nanoparticules par le tractus gastro-intestinal et leur devenir dans l'organisme. Il a été admis que ces particules traversent le tractus pour être rapidement éliminées [Oberdörster et al, 2005]. Comme les systèmes lipidiques cités précédemment aboutissent à la formation de nanoparticules composées d'excipients lipidiques, l'étude des propriétés biologiques de ces entités sans y incorporer de principe actif permettrait d'apporter des éléments de réponses sur cette problématique de « nano-toxicité » par voie orale.

Afin de procéder à l'analyse toxicologique par voie orale de ces formulations, nous avons proposé un protocole d'évaluation de la cytotoxicité de solutions aqueuses d'excipients. Ce protocole a pour but de prédire la toxicité orale de systèmes lipidiques grâce à l'utilisation d'une lignée cellulaire issue

d'un adénocarcinome colique humain, les cellules Caco-2 (voir section 2.2.1.1.3) [Hilgers et al, 1990 ; Sambuy et al, 2005]. Quatre tests de cytotoxicité représentatifs des principaux paramètres de viabilité cellulaire ont été réalisés. Ils correspondent :

- Au dosage de la LDH dont la concentration extracellulaire augmente en cas de dommages au niveau de la membrane cellulaire. Le dosage de la LDH permet de déterminer efficacement la cytotoxicité de composés hydrosolubles (voir section 2.2.2.5.1) [Fotakis et al, 2006 ; Silva et al, 2006 ; Pohjala et al, 2007].
- A la perméabilité du LY, un marqueur de passage paracellulaire. Le LY permet d'évaluer indirectement l'état des jonctions serrées liant les cellules entre elles au niveau de la monocouche cellulaire. Son dosage possible par fluorescence permet une détection très fine des altérations survenues au niveau de ces jonctions (voir section 2.2.2.3) [Konishi et al, 2002].
- Au TEER qui reflète aussi l'état des jonctions serrées [Mukherjee et al, 2004]. Son suivi lors des différentes étapes du protocole permet surtout d'apprécier la réversibilité ou non de l'effet de certains excipients (voir section 2.2.2.2) [Ekelund et al, 2005].
- A l'activité métabolique cellulaire qui est mesurée à l'aide du test de viabilité au MTT (voir section 2.2.2.4.1) [Scudiero et al, 1988; Hansen et al, 1989].

Lors de cette étude, le protocole présenté précédemment est appliqué sur une série d'excipients couramment utilisés en formulation galénique. Des surfactants, des co-solvants et des excipients huileux de grade pharmaceutique ont été testés (Tableau 6) afin d'évaluer la sensibilité de notre protocole de cytotoxicité. Parallèlement aux tests menés sur des solutions contenant chacune qu'un seul excipient, six systèmes auto-émulsifiants (correspondant à des SEDDS et des SMEDDS® selon la classification de Pouton décrite dans la section 1.3.1) composés d'un surfactant non-ionique et d'une huile ont été réalisées afin d'étudier la cytotoxicité des nanoparticules formés après solubilisation dans une phase aqueuse.

## **3.2 Matériel et méthode**

### **3.2.1 Préparations des solutions d'excipients**

Afin de solubiliser un excipient, il faut utiliser un tampon aqueux compatible avec une bonne viabilité cellulaire. Ce dernier correspond à une solution de Hanks (HBSS : Hank's Buffered Saline Solution) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) à 15 mM de glucose, tamponnée par du MES (acide 2-(N-Morpholino)éthanesulfonique) (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Quentin Fallavier, France) et ajustée à un pH de 6,0. La liste des excipients testés aux cours de cette étude est reprise dans le Tableau 6. Des solutions mères de 100 g/L sont préparées dans des fioles jaugées pour chaque excipient, excepté



pour le Labrafil® M1944CS dont la solution a été préparée à 233 g/L. Cette exception s'explique par le fait que les solutions mères des formulations étudiées par la suite, ont contenu pour certaines jusqu'à 233 g/L de Labrafil® M1944CS. Enfin, les solutions mères des préparations contenant qu'un seul excipient ont été diluées 4 fois au dixième (en cascade) afin d'établir la gamme de concentrations à tester sur les cellules Caco-2. Cette gamme s'étend de 10 mg/L à 100 g/L, sauf pour celle du Labrafil® M1944CS qui va de 23,3 mg/L à 233 g/L.

**Tableau 6 : Liste des excipients étudiés suivant le protocole de cytotoxicité**

<b>Nom chimique</b>	<b>Nom commercial</b>	<b>Fonction</b>	<b>Source</b>
Hydroxystéarate de PEG-15	Solutol® HS15	Surfactant non-ionique	BASF, Ludwigshafen, Allemagne
PEG-35 d'huile de ricin	Cremophor® EL	Surfactant non-ionique	BASF, Ludwigshafen, Allemagne
PEG-35 d'huile de ricin, purifié	Cremophor® ELP	Surfactant non-ionique	BASF, Ludwigshafen, Allemagne
PEG-40 d'huile de ricin hydrogénée	Cremophor® RH40	Surfactant non-ionique	BASF, Ludwigshafen, Allemagne
Succinate de PEG-20 D- $\alpha$ -tocophérol	Vitamin E TPGS®	Surfactant non-ionique	Eastman, TN, USA
Mono-, di- et triglycérides et mono- et diesters de PEG	Labrafil® M1944CS	Surfactant non-ionique et excipient huileux	Gattefossé, Saint-Priest, France
Polysorbate 80	Montanox® 80	Surfactant non-ionique	Seppic, Paris-La-Défense, France
2-pyrrolidone	Solphor® P	Co-solvant	BASF, Ludwigshafen, Allemagne
Diéthylène glycol monoéthyléther	Transcutol® P	Excipient huileux	Gattefossé, Saint-Priest, France

Les compositions des six formulations lipidiques testées au cours de cette même étude sont reprises dans le Tableau 7. Dans un premier temps, un excipient huileux et un surfactant non-ionique sont mélangés à l'aide d'un barreau magnétique pendant environ 5 minutes afin d'obtenir un ensemble homogène. Ces formulations ne contiennent pas plus de deux types différents d'excipients afin de rendre possible l'interprétation des tests de cytotoxicité. Ainsi, aucun co-solvant n'a été utilisé pour améliorer la dispersion de ces systèmes. Par la suite, la même solution aqueuse utilisée précédemment (HBSS à pH 6,0) est ajoutée aux mélanges d'excipients afin d'obtenir des nanoparticules similaires à celles qui pourraient se former au niveau gastro-intestinal. Chaque solution mère ainsi obtenue présente un volume de 25 mL et chacune est diluée 4 fois au dixième. Pour chaque formulation, la solution mère est désignée par S5. Les solutions S4, S3, S2 et S1 sont

respectivement les dilutions au dixième des solutions S5, S4, S3 et S2. Les tests de cytotoxicité sont réalisés sur chacune de ces solutions.

**Tableau 7 : Composition des six formulations testées**

		<b>Surfactant non-ionique</b>	<b>Excipient huileux</b>
<b>Formulation 1</b>	Excipient	Cremophor® ELP	Labrafil® M1944CS
	Proportion au sein de la formulation	30% (m/m)	70% (m/m)
	Concentration de S5	100 g/L	233 g/L
	Concentration de S4	10 g/L	23,3 g/L
	Concentration de S3	1 g/L	2,33 g/L
	Concentration de S2	100 mg/L	233 mg/L
	Concentration de S1	10 mg/L	23,3 mg/L
<b>Formulation 2</b>	Excipient	Solutol® HS15	Labrafil® M1944CS
	Proportion au sein de la formulation	30% (m/m)	70% (m/m)
	Concentration de S5	100 g/L	233 g/L
	Concentration de S4	10 g/L	23,3 g/L
	Concentration de S3	1 g/L	2,33 g/L
	Concentration de S2	100 mg/L	233 mg/L
	Concentration de S1	10 mg/L	23,3 mg/L
<b>Formulation 3</b>	Excipient	Vitamine E TPGS®	Labrafil® M1944CS
	Proportion au sein de la formulation	30% (m/m)	70% (m/m)
	Concentration de S5	100 g/L	233 g/L
	Concentration de S4	10 g/L	23,3 g/L
	Concentration de S3	1 g/L	2,33 g/L
	Concentration de S2	100 mg/L	233 mg/L
	Concentration de S1	10 mg/L	23,3 mg/L
<b>Formulation 4</b>	Excipient	Cremophor® RH40	Labrafil® M1944CS
	Proportion au sein de la formulation	30% (m/m)	70% (m/m)
	Concentration de S5	100 g/L	233 g/L
	Concentration de S4	10 g/L	23,3 g/L
	Concentration de S3	1 g/L	2,33 g/L
	Concentration de S2	100 mg/L	233 mg/L
	Concentration de S1	10 mg/L	23,3 mg/L
<b>Formulation 5</b>	Excipient	Cremophor® RH40	Labrafil® M1944CS
	Proportion au sein de la formulation	40% (m/m)	60% (m/m)
	Concentration de S5	133 g/L	200 g/L
	Concentration de S4	13,3 g/L	20 g/L
	Concentration de S3	1,33 g/L	2 g/L
	Concentration de S2	133 mg/L	200 mg/L
	Concentration de S1	13,3 mg/L	20 mg/L
<b>Formulation 6</b>	Excipient	Vitamine E TPGS®	Labrafil® M1944CS
	Proportion au sein de la formulation	70% (m/m)	30% (m/m)
	Concentration de S5	233 g/L	100 g/L
	Concentration de S4	23,3 g/L	10 g/L
	Concentration de S3	2,33 g/L	1 g/L
	Concentration de S2	233 mg/L	100 mg/L
	Concentration de S1	23,3 mg/L	10 mg/L

### 3.2.2 Culture cellulaire

Les cellules Caco-2 (HTB-37) a été obtenues au passage 18 de l'American Type Culture Collection (LGC/ATCC, Molsheim, France).

Cultivées à 37°C dans des incubateurs (JOUAN IG150, Saint Herblain, France) où règne une atmosphère à 95 % d'humidité relative et à 5 % de CO<sub>2</sub>, les cellules ont été utilisées du passage 21 à 28. Elles sont mises en culture jusqu'à environ 80-90 % de confluence sur des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> dans du milieu de culture qui est composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) à 10 % de sérum de bœuf foetal (inactivé pendant 30 minutes à 56°C), à 1 % d'acides aminés non essentiels, à 100 unités/mL de pénicilline G et à 100 µg/mL de Streptomycine (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA). Le milieu est changé tous les deux jours.

Pour les tests de la libération de LDH, du TEER et de la perméabilité au LY, les cellules Caco-2 sontensemencées à une densité de 6×10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> sur des membranes poreuses de type Millicell® (Millipore, Molsheim, France). Ces membranes présentent des pores de 0,4 µm de diamètre et une surface de 1,13 cm<sup>2</sup>. Au bout de 21 à 25 jours de culture, la maturation et l'intégrité de la monocouche cellulaire sont évaluées par la mesure du TEER (voir section 2.2.2.2). Ce contrôle se fait à l'aide d'un voltmètre Millicell®ERS (Millipore, Molsheim, France). Seules les monocouches présentant un TEER au dessus de 300 Ω.cm<sup>2</sup>, sont retenues pour les tests de cytotoxicité [Sambuy et al, 2005 ; Hidalgo et al, 2001 ; Artursson et al, 2001].

Pour le test au MTT, les cellules Caco-2 sontensemencées à une densité de 4×10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> dans des plaques à 96 puits. Après ensemencement, ces plaques sont incubées à 37°C, 24 heures avant le test.

### 3.2.3 Evaluation de la cytotoxicité

La première étape du protocole consiste à mesurer le TEER initial des monocouches cellulaires et la libération de la LDH. A la sortie de l'incubateur, le milieu de culture des cellules est remplacé par de l'HBSS. Les monocouches sont remises à incuber à 37°C avant d'effectuer la mesure de TEER. Les monocouches retenues pour les tests (TEER supérieur à 300 Ω.cm<sup>2</sup>), sont incubées pendant 2 heures avec la solution d'excipients à étudier, à 37°C et sous une agitation orbitale de 50 tpm. Les témoins négatifs mis en place correspondent à des solutions d'HBSS dépourvues d'excipients. Après cette incubation, le surnageant cellulaire est prélevé et la LDH y est dosée à l'aide du kit Enzyline™ LDH Optimisé 10 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) et d'un automate CX5 (Beckman Coulter, Villepinte, France). La libération totale de LDH a été obtenue par une lyse cellulaire initiée par une solution à

10% de dodécylsulfate de sodium. Les résultats de la libération de LDH sont exprimés en pourcentage de la lyse cellulaire totale.

Lors de la deuxième étape, la perméabilité du LY du sens apical vers le sens basolatéral a été évaluée en présence d'un gradient de pH (pH de 6,0 au niveau apical et de 7,4 au niveau basolatéral). Une solution contenant 0,04% (m/v) de LY (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Quentin Fallavier, France) est introduite dans le compartiment apical alors qu'une solution d'HBSS tamponnée à pH 7,4 avec 10 mM de HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) est ajoutée dans le compartiment basolatéral. Des prélèvements sont réalisés du côté basolatéral à 15, 30, 60, 90 et 120 minutes. Le volume basolatéral est maintenu constant par l'ajout du même volume d'HBSS frais après chaque prélèvement. Comme pour le test à la LDH, cette étude de perméabilité se déroule à 37°C et sous une agitation orbitale à 50 tpm. Le LY dans les échantillons obtenus sont dosées par absorption UV à la longueur d'onde de 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-2401PC (Shimadzu, Kyoto, Japon). Les résultats sont présentés en perméabilités apparentes ( $P_{app}$ ) exprimée en  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  et son calcul se réalise à l'aide de l'Équation 1 :

**Équation 1 : formule de la perméabilité apparente**

$$P_{app} = \frac{dC_r}{dt} \frac{1}{A \times C_0}$$

Avec :

- $\frac{dC_r}{dt}$  : pente de la concentration cumulative de la substance étudiée dans le compartiment basolatéral en fonction du temps ( $\mu\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$ )
- A : surface de la monocouche ( $\text{cm}^2$ )
- $C_0$  : concentration ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) de la substance étudiée dans le compartiment apical au temps 0

La troisième étape consiste à faire une deuxième mesure du TEER pour étudier les effets immédiats des excipients sur l'intégrité de la monocouche et à évaluer la réversibilité de ces effets. Dans un premier temps, les cellules sont préalablement incubées pendant 30 minutes dans de l'HBSS avant de réaliser la mesure du TEER. Par la suite, l'HBSS est remplacé par du milieu de culture et les cellules sont ré-incubées à 37°C dans cet état pendant 3 heures. Une mesure finale du TEER a lieu après cette période et permet d'estimer l'état de récupération des cellules (voir section 2.2.2.2.2).

Parallèlement à ces 3 derniers tests, les phénomènes de métabolisation du MTT ont été étudiés sur des plaques à 96 puits. Lors de ce test, les cellules Caco-2 ont été mises en contact pendant 4 heures avec les solutions à tester. Après cette période de contact, les cellules sont rincées avec de l'HBSS.

200  $\mu$ L de DMEM et 20  $\mu$ L d'une solution à 5 mg/mL de MTT (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA) sont ajoutés dans chaque puits. Une nouvelle incubation de 3 heures à 37°C est nécessaire pour permettre la réduction du MTT en formazan. Chaque puits est ensuite vidé délicatement et les cristaux violets de formazan sont solubilisés avec 100  $\mu$ L de DMSO. Les résultats sont donnés par une lecture de l'intensité de la coloration qui est réalisée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques Bio-Rad Model 550 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Le MTT pouvant être réduit de façon non spécifique, ce réactif a aussi été incubé en l'absence de cellules avec toutes les solutions d'excipients pendant 3 heures afin de déceler toutes les réactions indésirables. Les résultats sont exprimés en pourcentages de viabilité par rapport à un témoin négatif.

Dans le cadre de ce protocole, chaque solution a été testée trois fois.

### **3.2.4 Granulométrie laser**

La granulométrie laser a servi pour mesurer les tailles et les indices de polydispersité des différents systèmes colloïdaux formés à la suite du contact de la formulation avec la phase aqueuse. Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcester, U.K.). Cet appareil est équipé d'un laser He-Ne de 4mW fonctionnant à la longueur d'onde de 633 nm. Les données recueillies ont été traitées à l'aide du logiciel Dispersion Technology Software 5.10.

### **3.2.5 Statistiques**

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$ ESM. Ils sont analysés par one-way ANOVA et le test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls a été utilisé pour déterminer le niveau de signification statistique ( $p=0,05$ ) des différences observées.

## **3.3 Résultats**

Les résultats de cette étude seront présentés en deux parties. La première partie reprend l'ensemble des résultats obtenus lors des études de cytotoxicité avec les excipients seuls. La deuxième partie reprend l'ensemble des résultats des six formulations lipidiques décrites précédemment.

### **3.3.1 Etudes de cytotoxicité sur les excipients seuls**

Afin d'avoir une vue générale des propriétés biologiques de chaque excipient, les résultats de perméabilité au LY, de la libération de LDH, de MTT et de TEER ont été regroupés dans les figures 9 à 17.

Certains excipients ont un effet sur la libération de la LDH, sur la perméabilité du LY et sur le métabolisme (MTT). En effet, le polysorbate 80 (Figure 9) induit significativement une augmentation à la fois de la LDH à 10 g/L et de la perméabilité au LY à 100 g/L. Toutefois une baisse des activités

métaboliques est observée à partir de 1 g/L. Les résultats de TEER montrent une chute brutale du TEER à 100 g/L signifiant que les cellules ne sont plus viables à cette concentration. Le Cremophor® EL (Figure 11), pour sa part, donne des résultats similaires de TEER, de LY et de LDH. La baisse des activités métaboliques ne survient qu'à 100 g/L. Les résultats de la Figure 14 montrent que le Solutol® HS15 affecte les jonctions serrées et le métabolisme à 1 g/L ainsi que l'intégrité membranaire à 100 g/L.

Dans d'autres cas, les excipients n'affectent que deux paramètres de cytotoxicité. Le Soluphor® P (Figure 13) et le Transcutol® P (Figure 16) n'exercent pas d'effet sur la membrane plasmique (LDH). Par contre, ils affectent le métabolisme cellulaire et les jonctions serrées à partir de 10 g/L. Il en est de même pour la Vitamine E TPGS® (Figure 15). Toutefois, ses effets sur le métabolisme et les jonctions serrées ne sont observés qu'à 100 g/L.

Enfin, le Cremophor® ELP et le Cremophor® RH40 se présentent comme les produits les mieux tolérés au niveau cellulaire. En effet, le Cremophor® ELP (Figure 12) ne provoque pas de hausse de la libération de la LDH et de la perméabilité apparente du LY. Le métabolisme cellulaire se trouve atteint à une concentration de 100 g/L. Le Cremophor® RH40 (Figure 10), pour sa part, ne montre aucun signe de cytotoxicité quel que soit le test utilisé dans ce protocole.

Les tests de réduction non spécifique du MTT avec les excipients étudiés n'ont révélé aucune interférence, excepté pour le Labrafil® M1944CS. Cet excipient est capable de réduire le MTT en formazan en l'absence de cellules. Ce test ne peut donc pas être utilisé pour évaluer la cytotoxicité de cet excipient huileux. De plus, le Labrafil® M1944CS (Figure 17) augmente significativement la perméabilité au LY à partir d'une concentration de 233 g/L. Cette observation reste relativement subjective parce qu'à cette concentration, une séparation de phase est visible à l'œil nu et limite le contact des cellules avec l'excipient qui se trouve en surface.

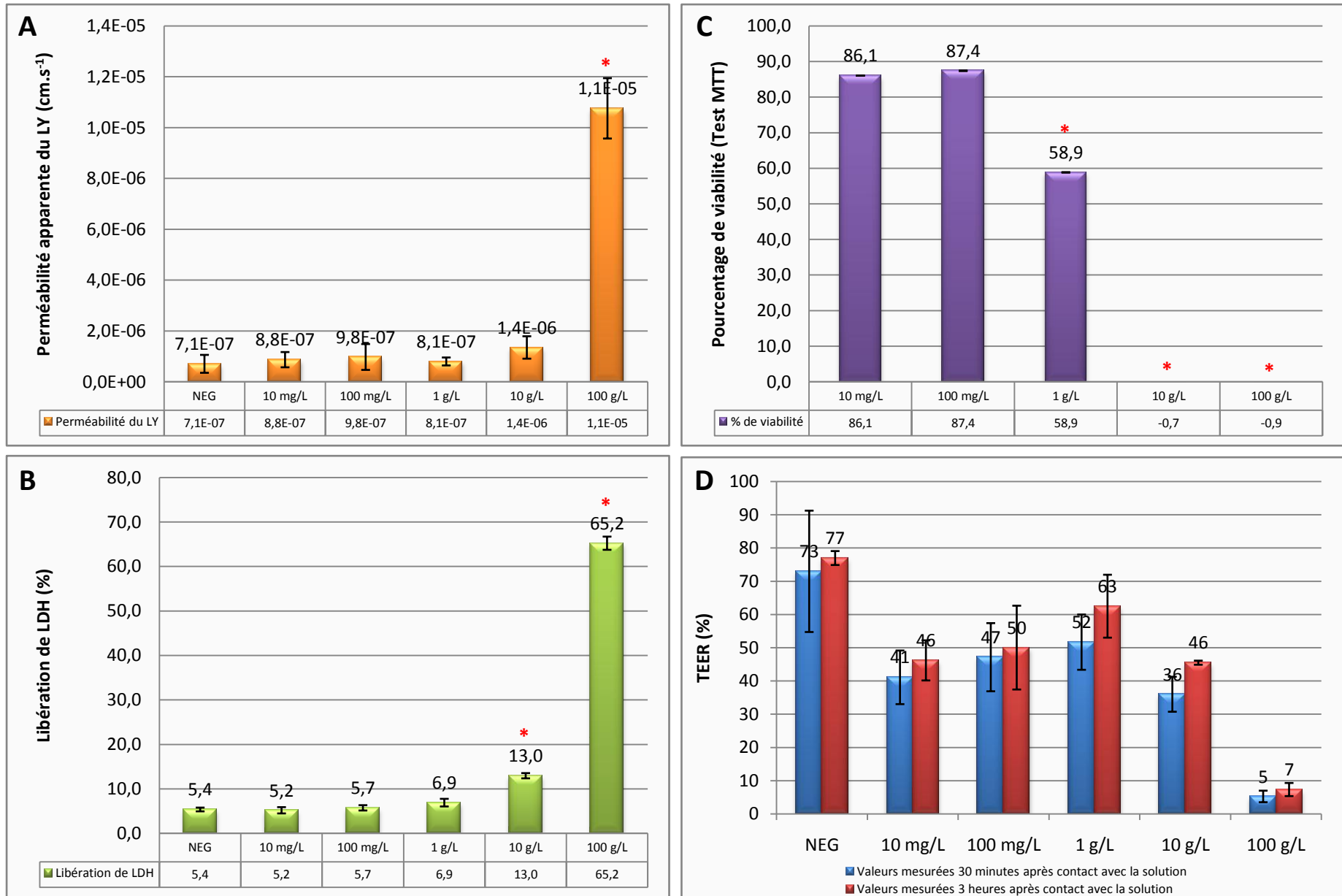


Figure 9 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le polysorbate 80. Les barres représentent des moyennes  $\pm$ ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (\* p<0,05).

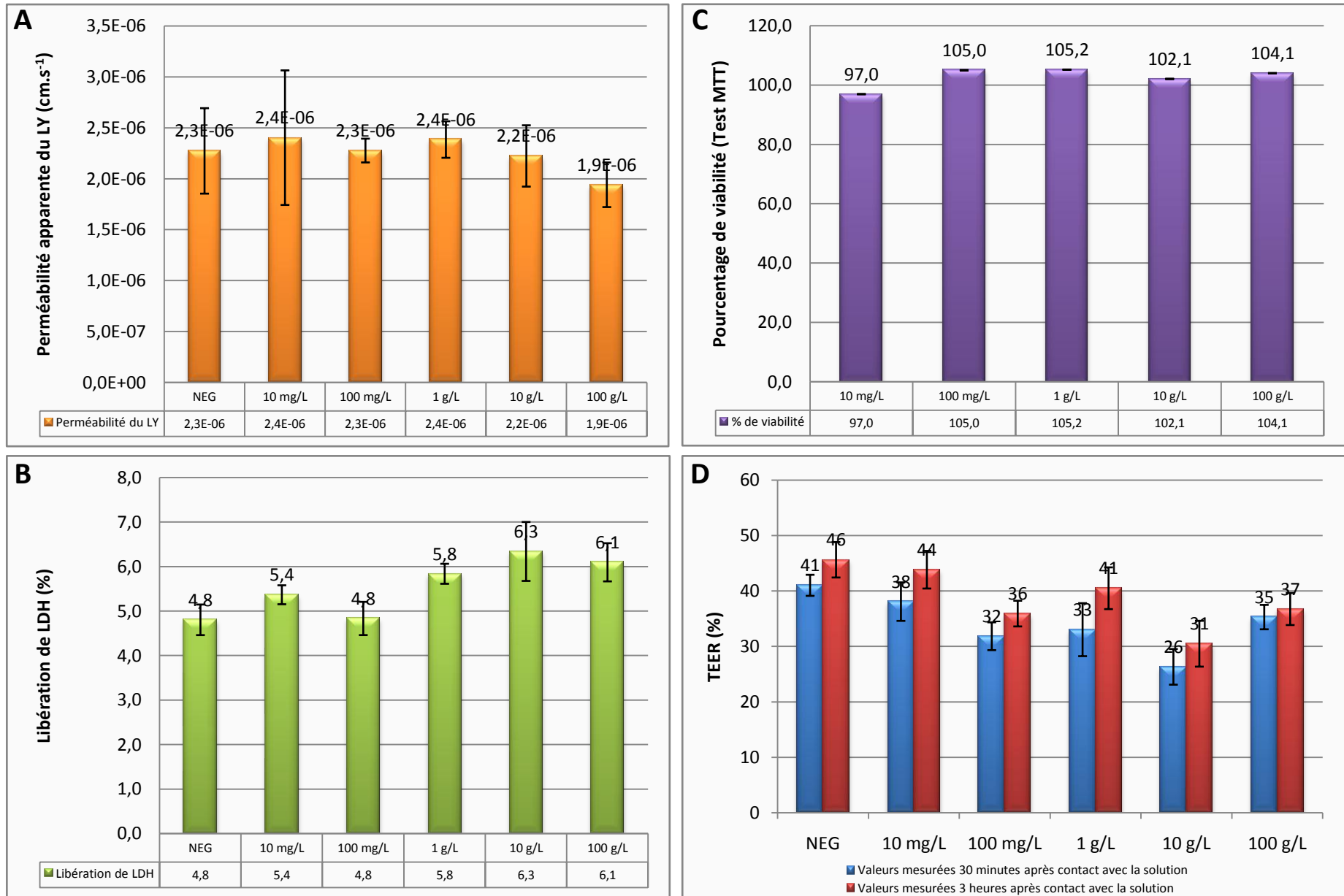


Figure 10 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Cremophor® RH40. Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôlée (\* p<0,05).



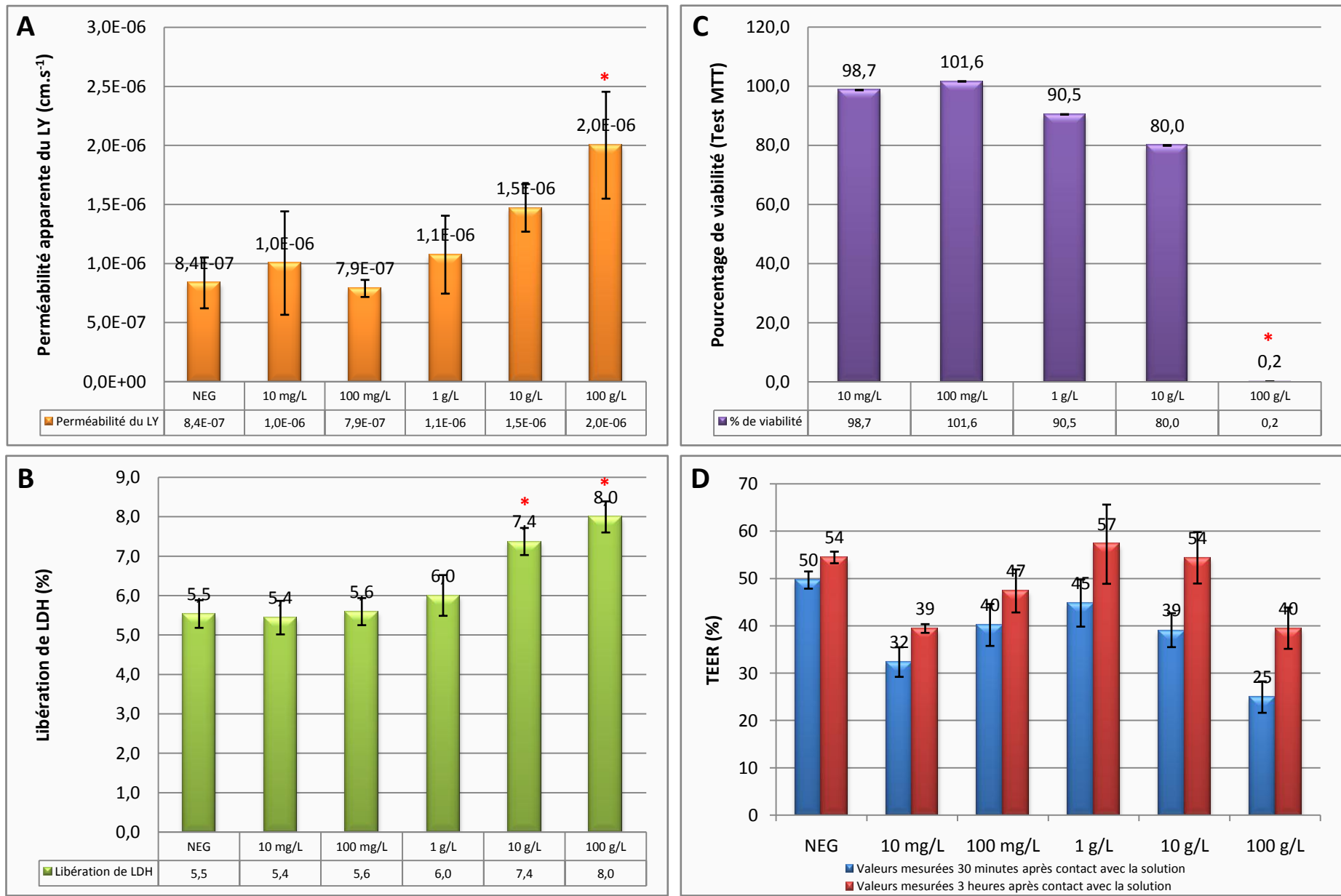


Figure 11 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Cremophor® EL. Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (\* p<0,05).

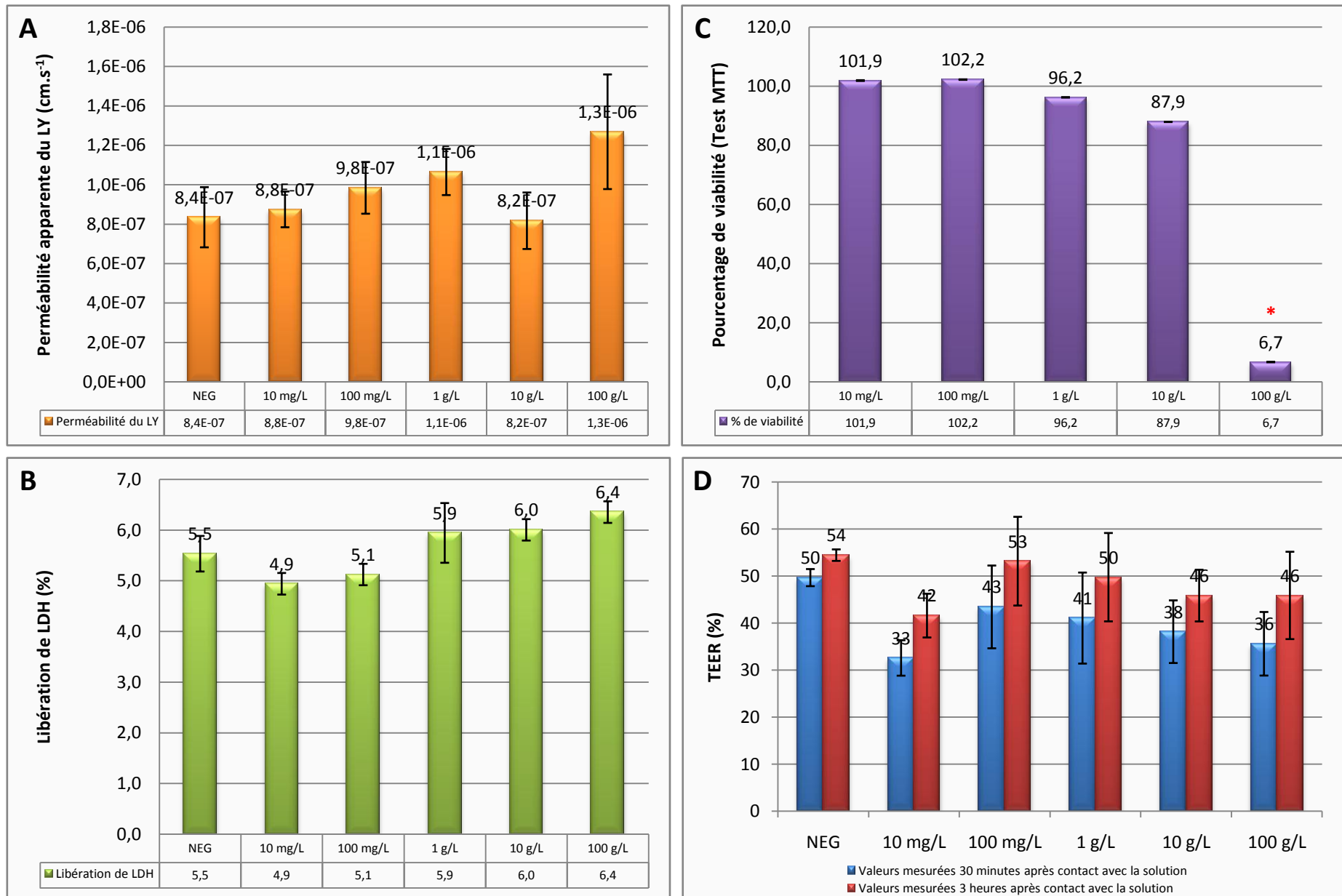


Figure 12 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Cremophor® ELP. Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôlée (\* p<0,05).

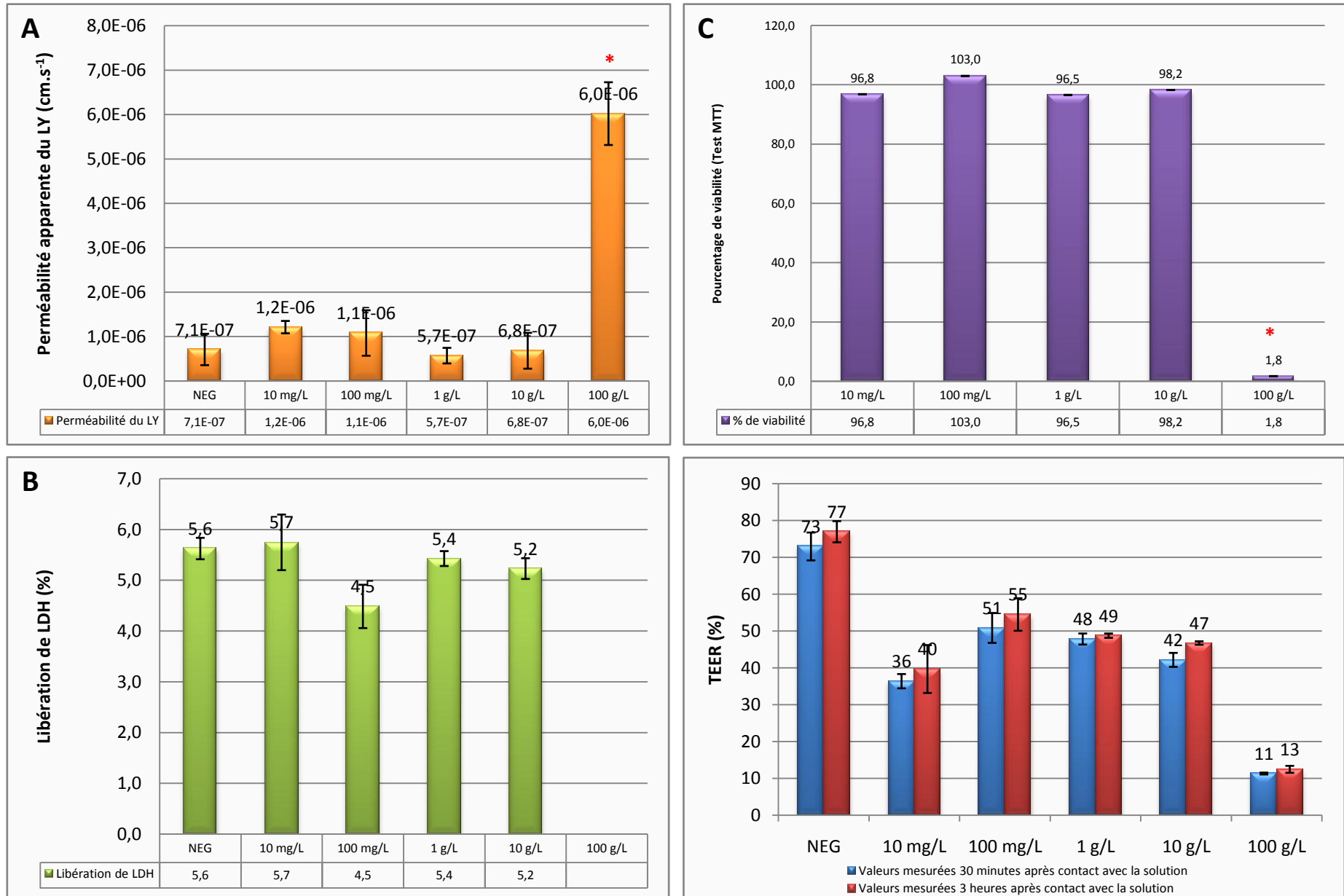


Figure 13 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Soluphor® P. Les barres représentent des moyennes  $\pm$  ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôlée (\*  $p < 0,05$ ).

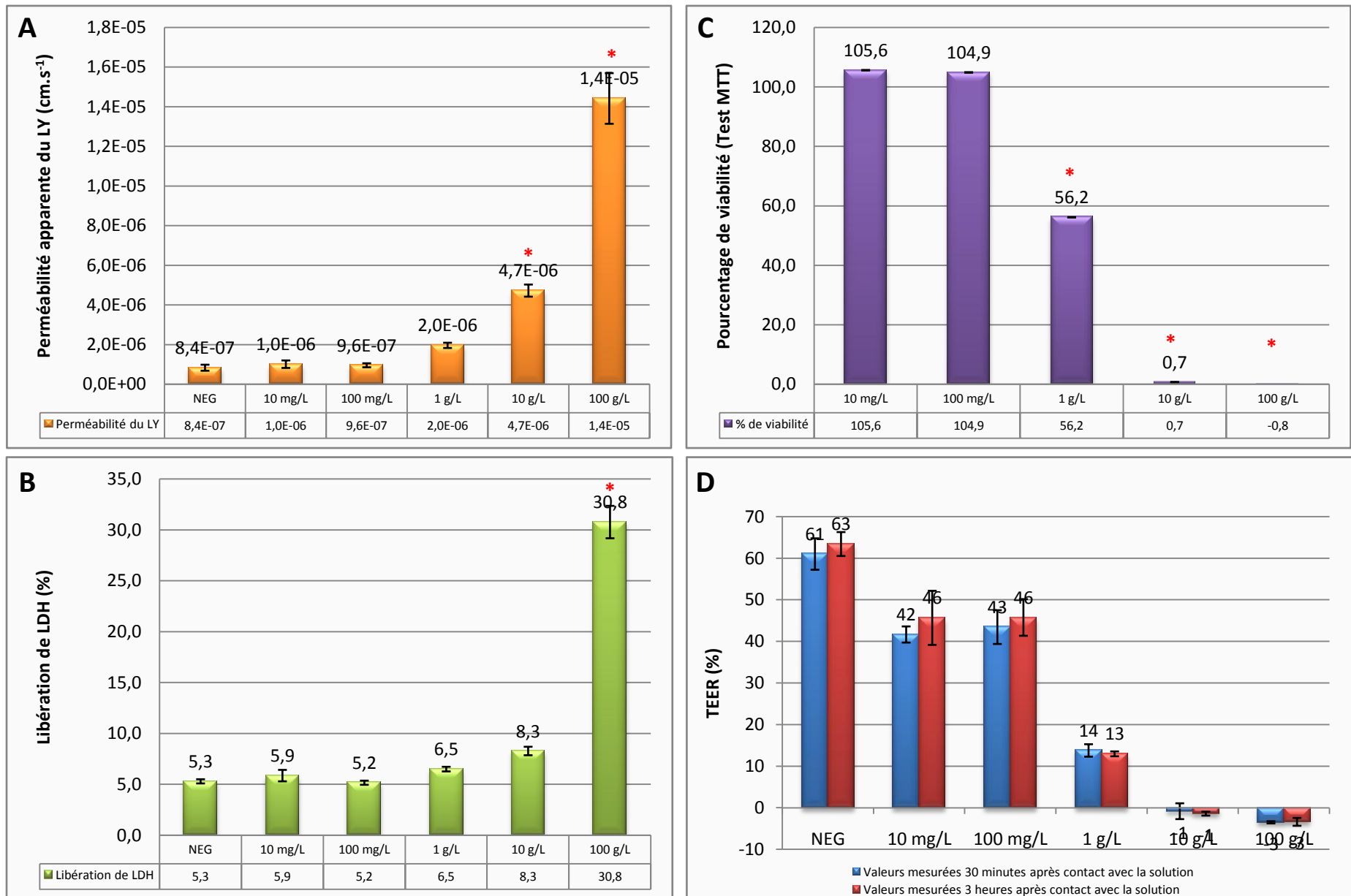


Figure 14 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Solutol® HS15. Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (\* p<0,05).

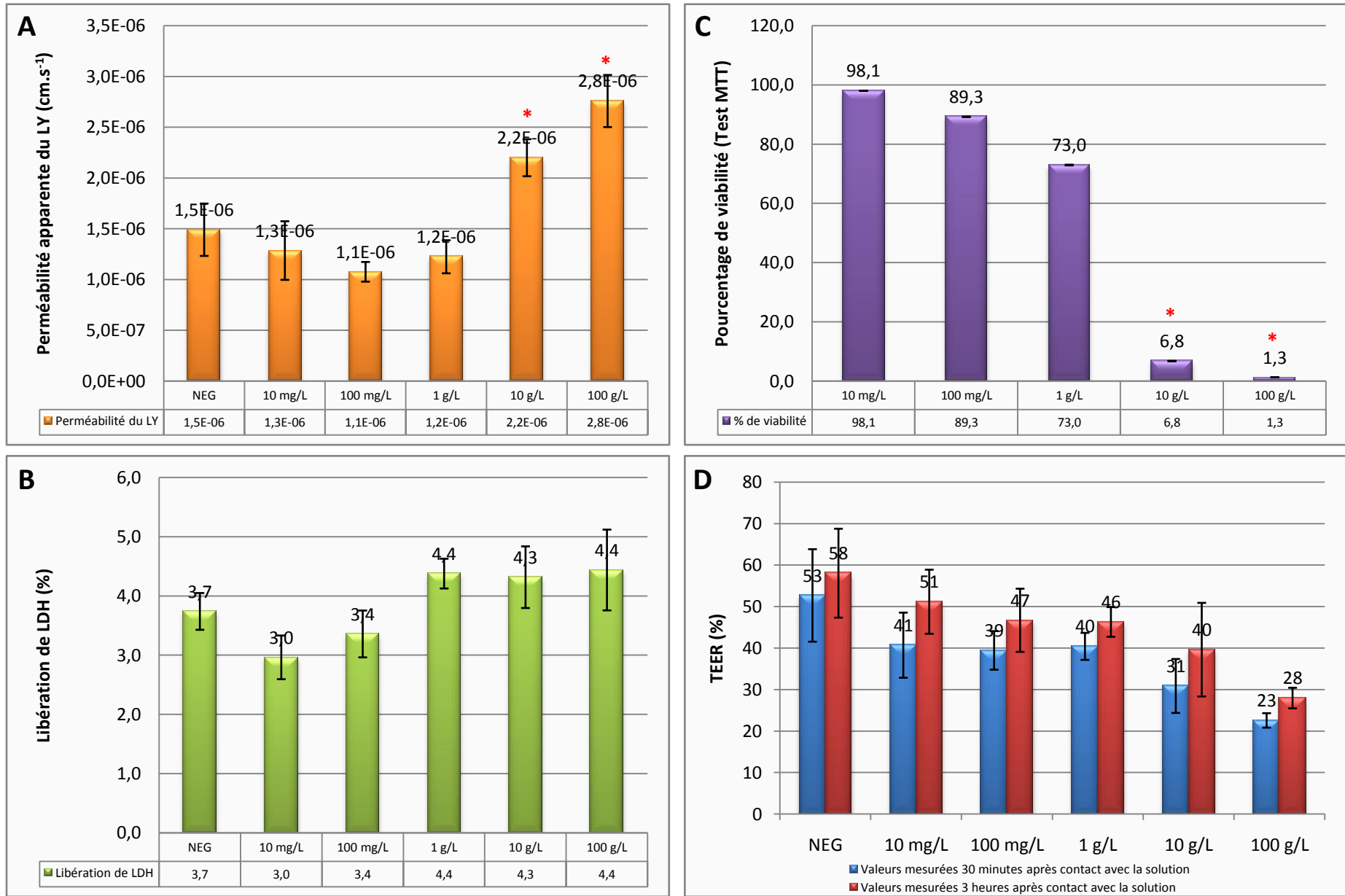


Figure 15 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour la Vitamine E TPGS®. Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (\* p<0,05).

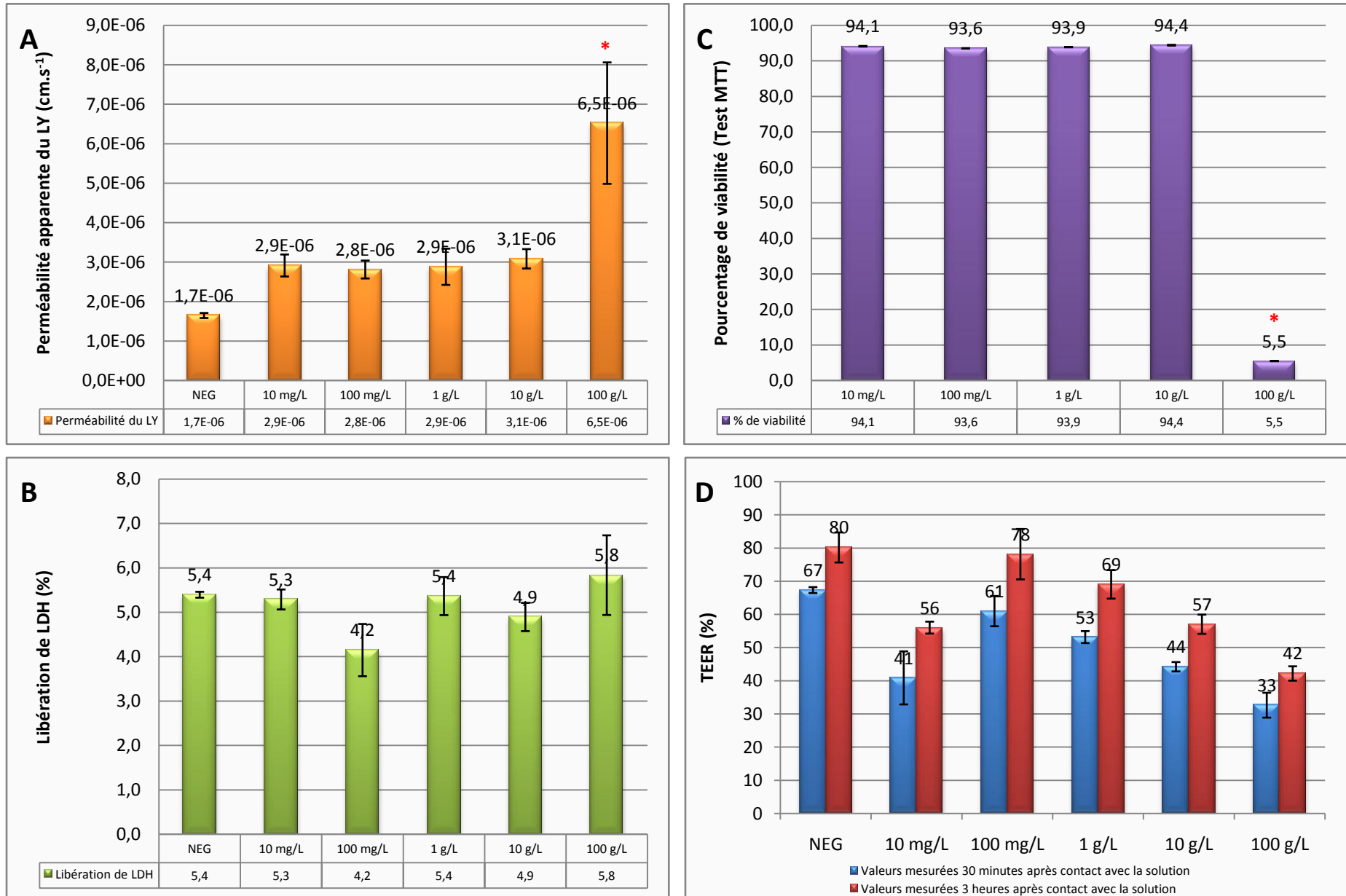


Figure 16 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Transcutol® P. Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôlée (\* p<0,05).

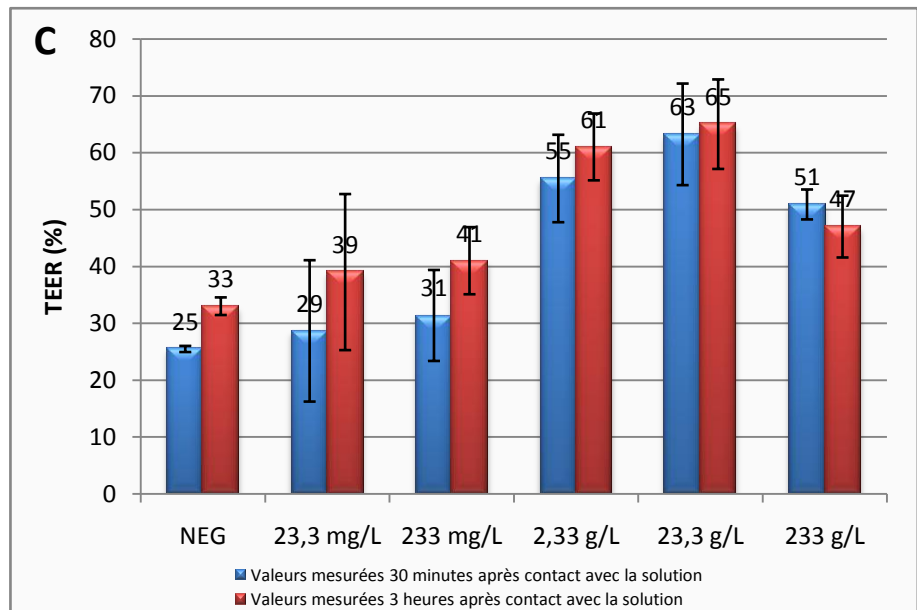
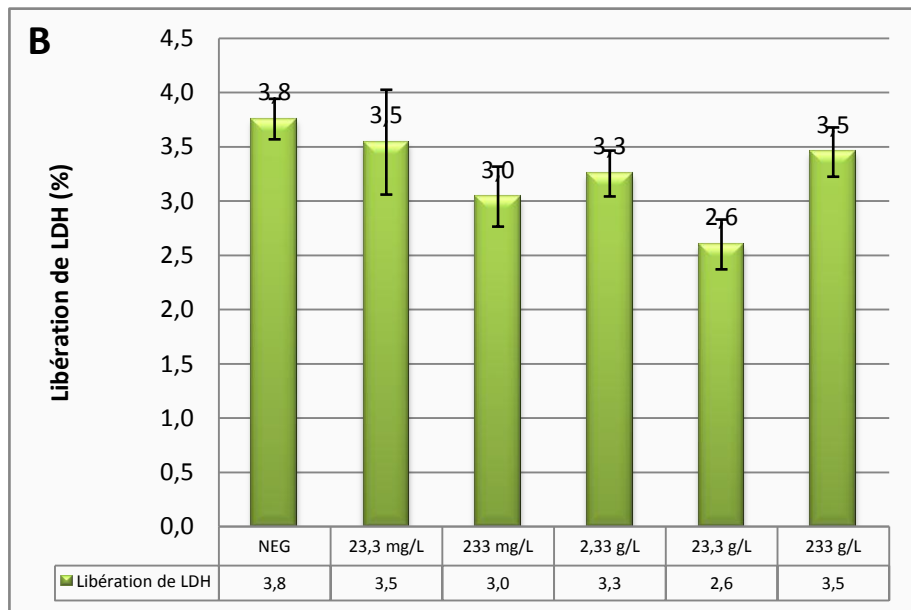
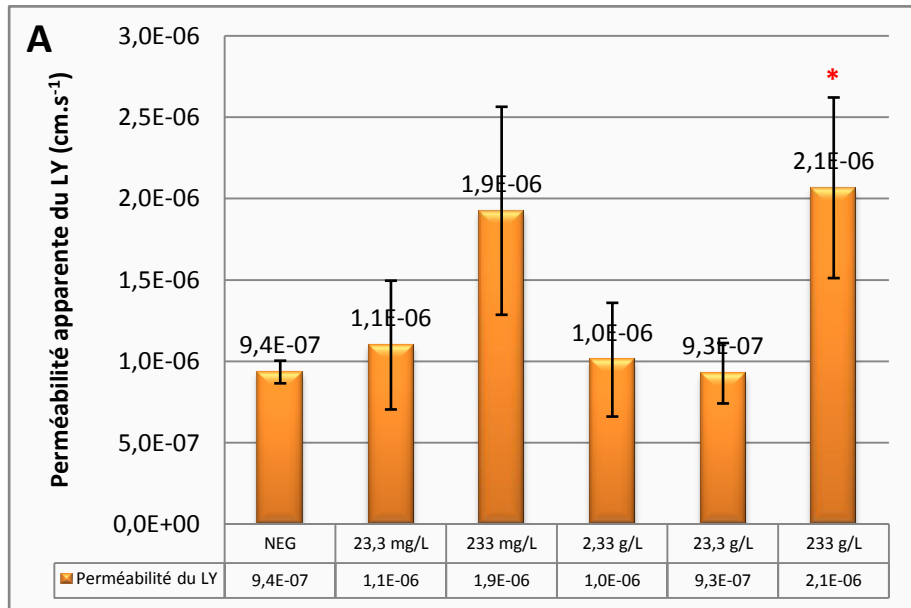


Figure 17 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), du MTT (C) et du TEER (D) pour le Labrafil® M1944CS. Les barres représentent des moyennes  $\pm$  ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (\* p<0,05).

### 3.3.2 Etudes de cytotoxicité de systèmes lipidiques

Par rapport aux études de cytotoxicité réalisées sur les excipients seuls, les résultats de celles réalisées sur des systèmes lipidiques ne comportent pas de test sur le métabolisme cellulaire puisque l'excipient huileux utilisé, le Labrafil® MS1944CS, réagit avec le MTT (voir section 2.2.2.2.4). Ainsi, les données de cytotoxicité obtenues pour les six formulations se limitent à celles de LDH, de LY et de TEER. Par contre, des informations de granulométrie sont présentées.

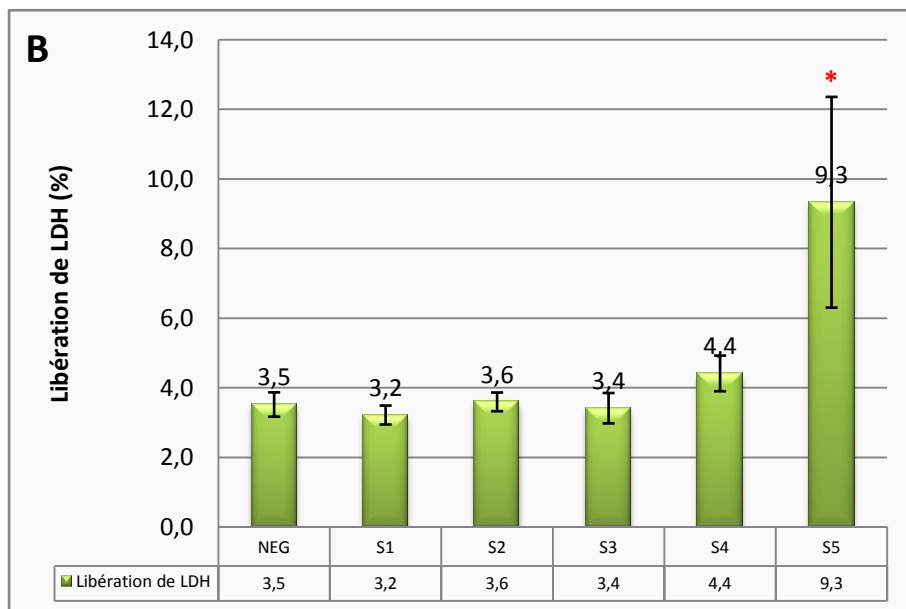
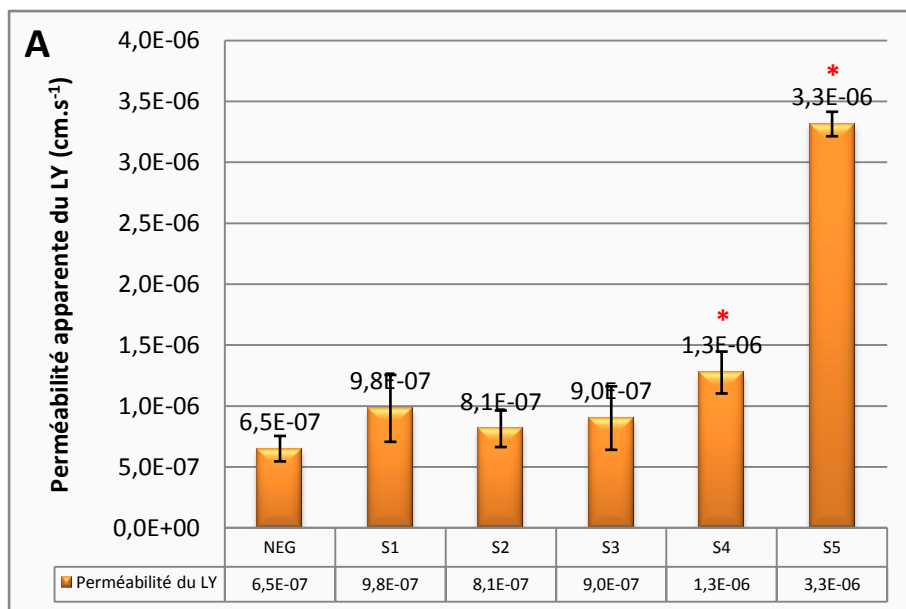
La perméabilité au LY augmente significativement pour les solutions S4 et S5 des formulations 1 (Figure 18) et 2 (Figure 19). Quant à la libération de LDH, elle augmente également pour ces deux formulations mais à partir des solutions S5 et S4 respectivement. Enfin, la formulation 6 (Figure 23) affecte significativement les jonctions serrées pour les solutions de S1 à S5, alors que la libération de LDH ne se trouve augmentée que pour S5.

Les formulations 3 (Figure 20), 4 (Figure 21) et 5 (Figure 22) ne créent pas de dégâts au niveau de la membrane plasmique. Dans les trois cas, la perméabilité au LY est augmentée avec la solution S5.

De manière générale, la taille des particules diminue avec les dilutions jusqu'à atteindre un plateau lorsque les émulsions présentent un indice de polydispersité bas (de 0 à 0,2). Ceci est particulièrement vrai pour les formulations 1, 2, 4 et 5. Les formulations 3 et 6 présentent des indices de polydispersité bien au dessus de 0,2 signifiant la présence d'une population de particules de tailles hétérogènes. Ces formulations conduisent à la formation de particules de tailles élevées allant de 178,4 nm à 2,7 µm, alors que les quatre autres formulations forment des gouttelettes de 60 à 100 nm.

Pour les cellules traitées avec la solution mère S5 des formulations 2 et 3, la LDH n'a pas pu être détectée lors de son dosage. Cet inconvénient peut être lié à la dénaturation de l'enzyme causée par la forte concentration d'excipients présents dans les solutions S5. Cette concentration est effectivement d'environ 333 g/L soit 3 fois plus élevée que celle utilisée lors des tests avec les excipients seuls.





**C**

	Diamètre (nm)		Indice de polydispersité	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
<b>S1</b>	66,8	0,1	0,107	0,021
<b>S2</b>	64,8	0,2	0,110	0,015
<b>S3</b>	65,6	0,2	0,077	0,009
<b>S4</b>	68,8	0,3	0,103	0,022
<b>S5</b>	336,8	1,6	0,455	0,013

**D**

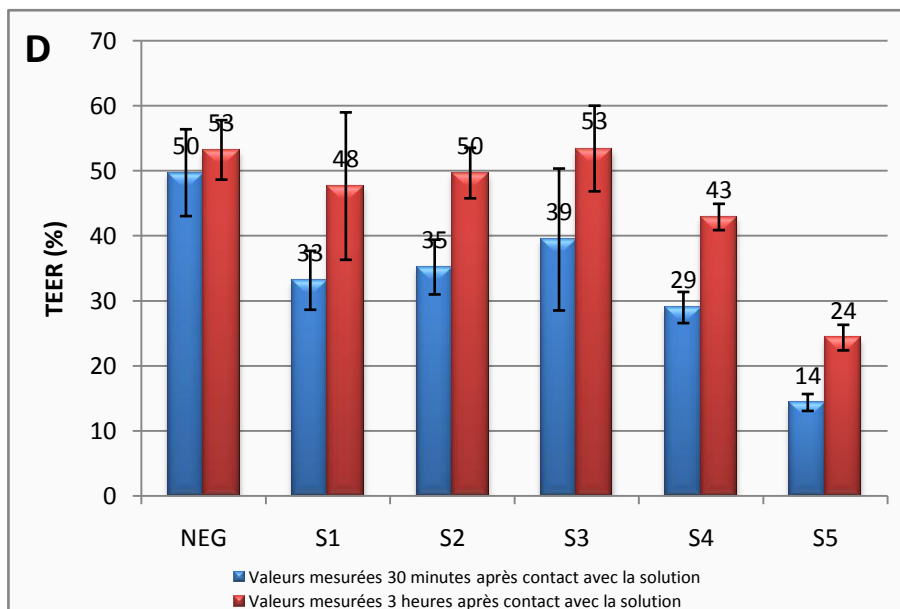
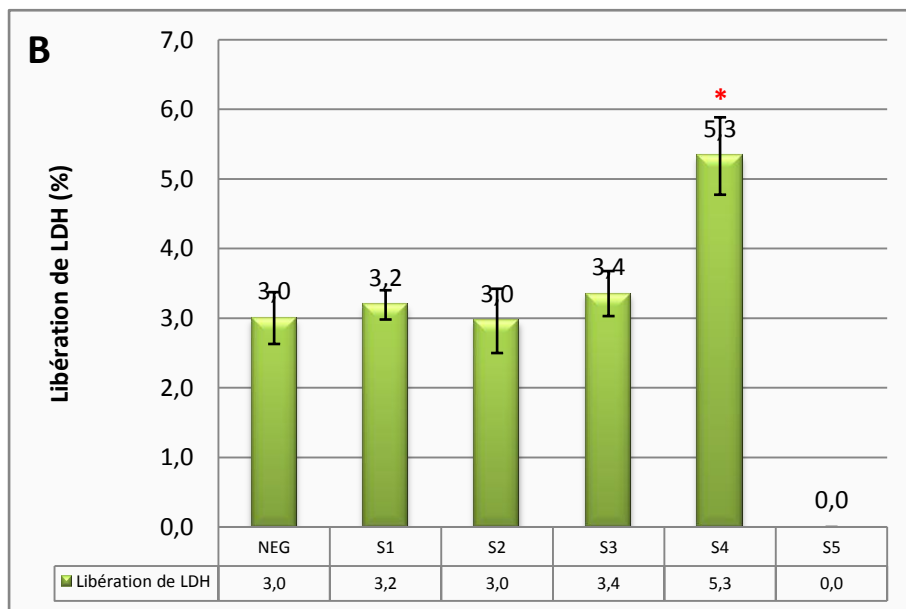
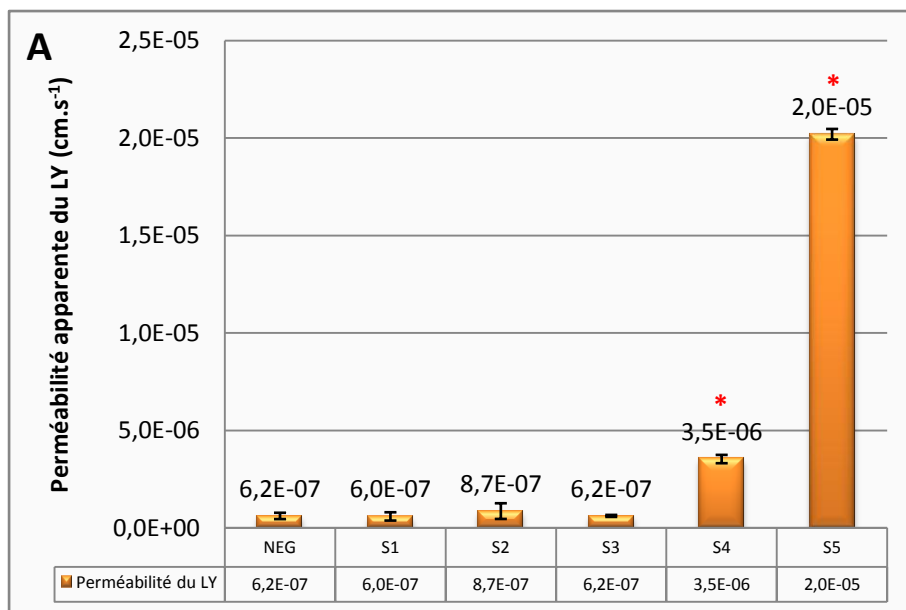


Figure 18 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 1 (70% (m/m) Labrafil® M1944CS et 30% (m/m) Cremophor® ELP). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (\* p<0,05).



**C**

	Diamètre (nm)		Indice de polydispersité	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
<b>S1</b>	60,5	0,6	0,086	0,008
<b>S2</b>	61,6	1,0	0,073	0,007
<b>S3</b>	60,8	8	0,060	0,011
<b>S4</b>	64,0	0,2	0,120	0,013
<b>S5</b>	871,6	37,3	0,201	0,025

**D**

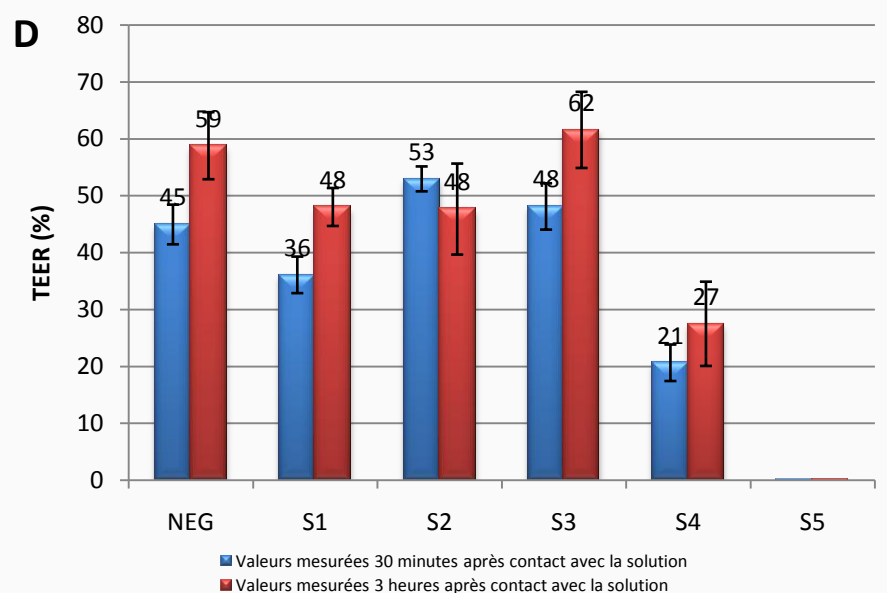
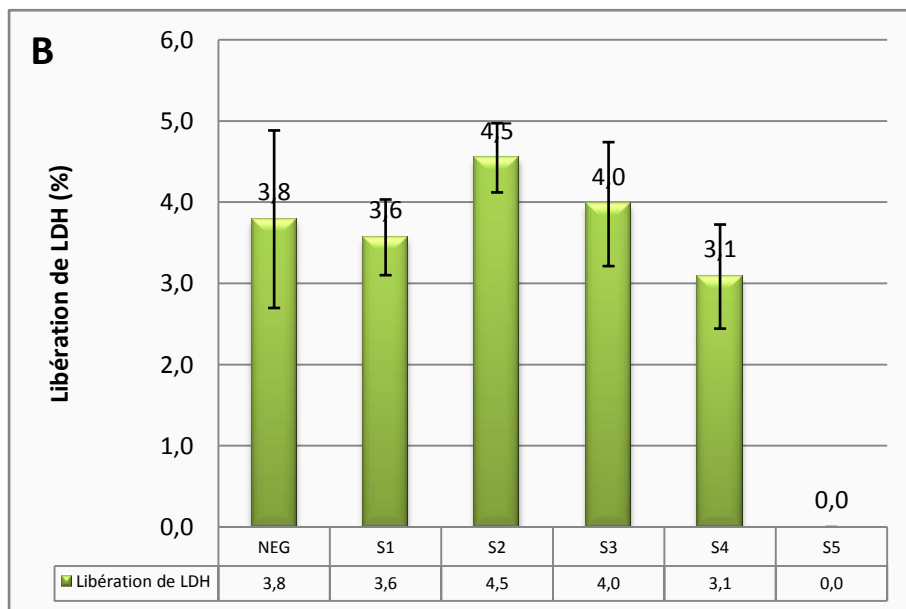
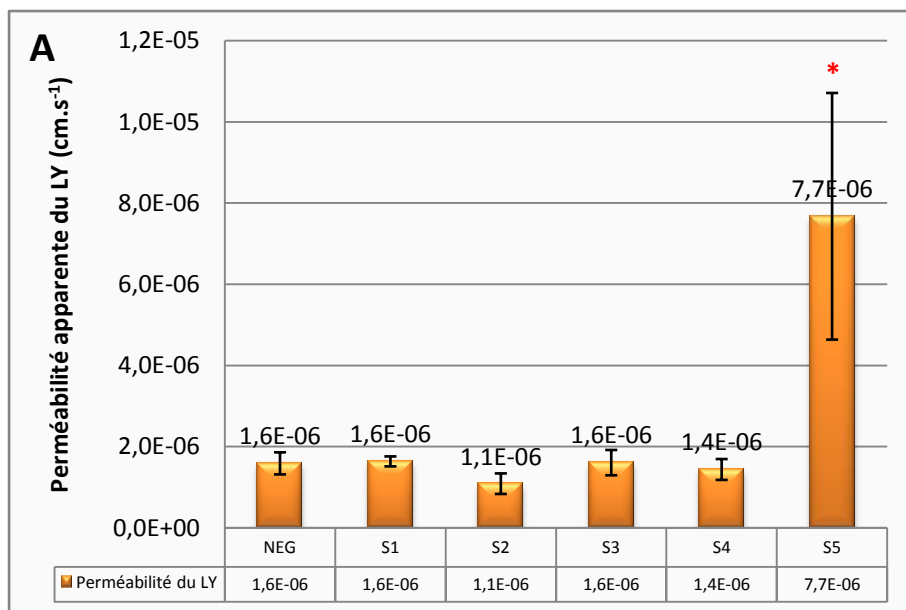


Figure 19 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 2 (70% (m/m) Labrafil® M1944CS et 30% (m/m) Solutol® HS15). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (\* p<0,05).



**C**

	Diamètre (nm)		Indice de polydispersité	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
<b>S1</b>	178,4	10,1	0,284	0,009
<b>S2</b>	279,3	38,6	0,414	0,098
<b>S3</b>	268,2	13,6	0,501	0,146
<b>S4</b>	323,1	29,0	0,429	0,027
<b>S5</b>	2730,3	217,8	0,975	0,022

**D**

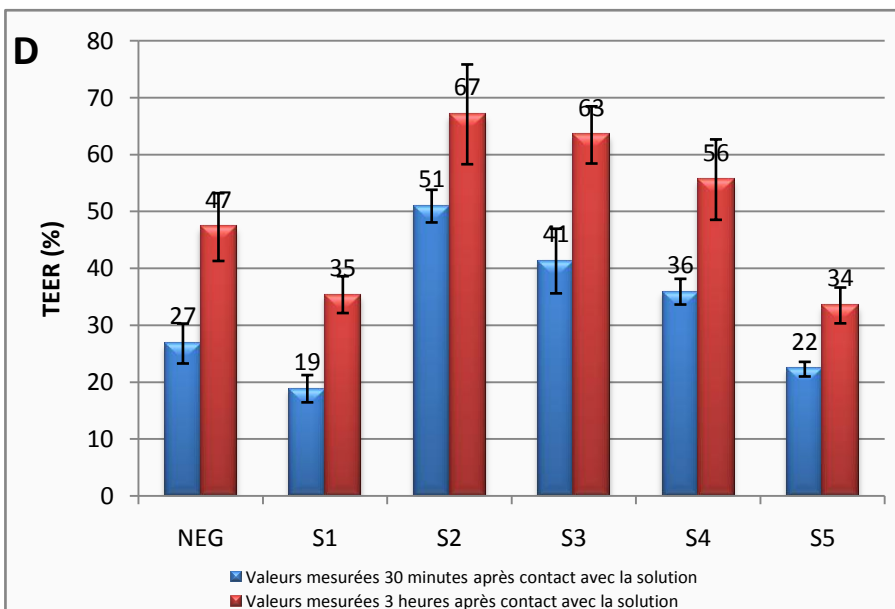
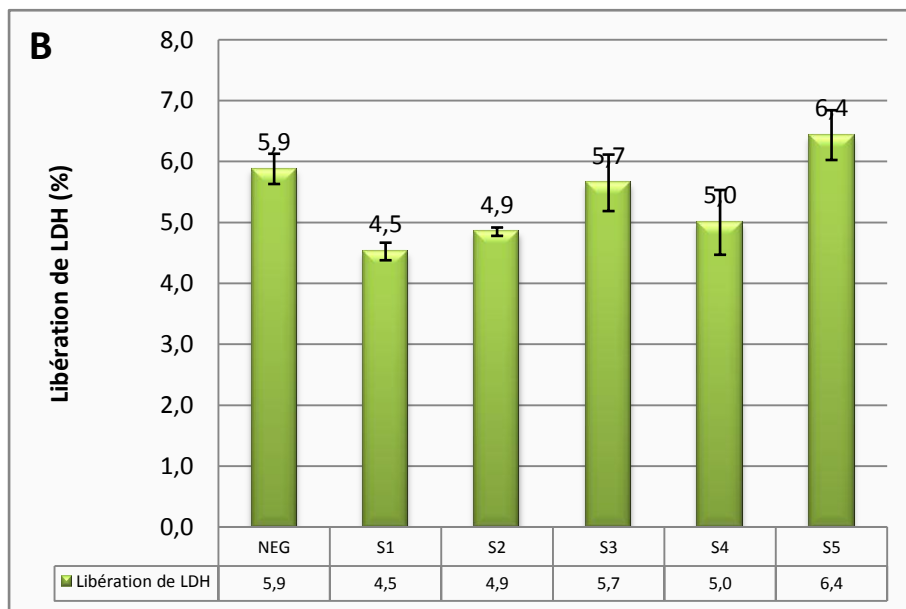
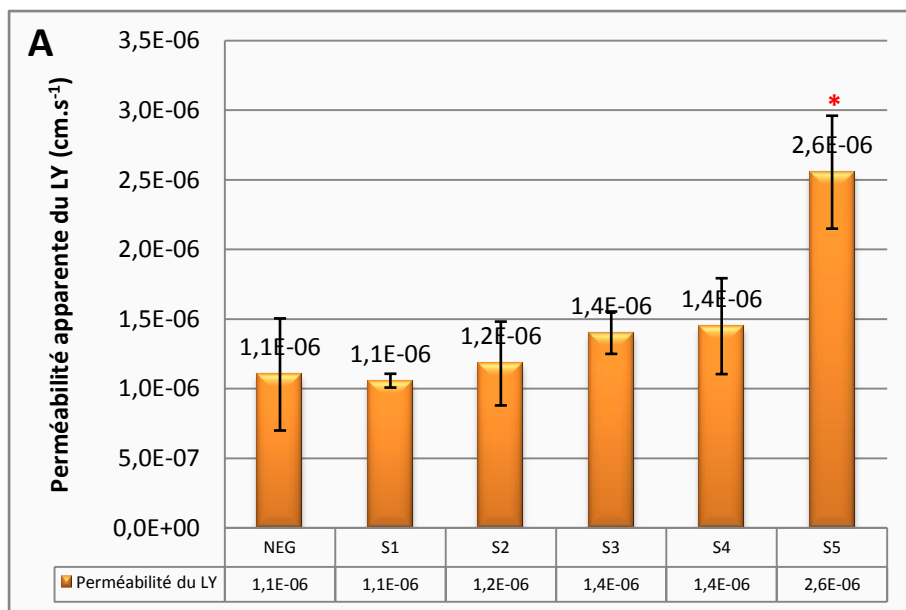


Figure 20 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 3 (70% (m/m) Labrafil® M1944CS et 30% (m/m) vitamine E TPGS). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (\* p<0,05).



**C**

	Diamètre (nm)		Indice de polydispersité	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
<b>S1</b>	103,9	0,2	0,100	0,014
<b>S2</b>	99,0	0,5	0,091	0,017
<b>S3</b>	100,3	0,3	0,075	0,019
<b>S4</b>	105,7	0,4	0,127	0,006
<b>S5</b>	701,0	1,6	0,263	0,029

**D**

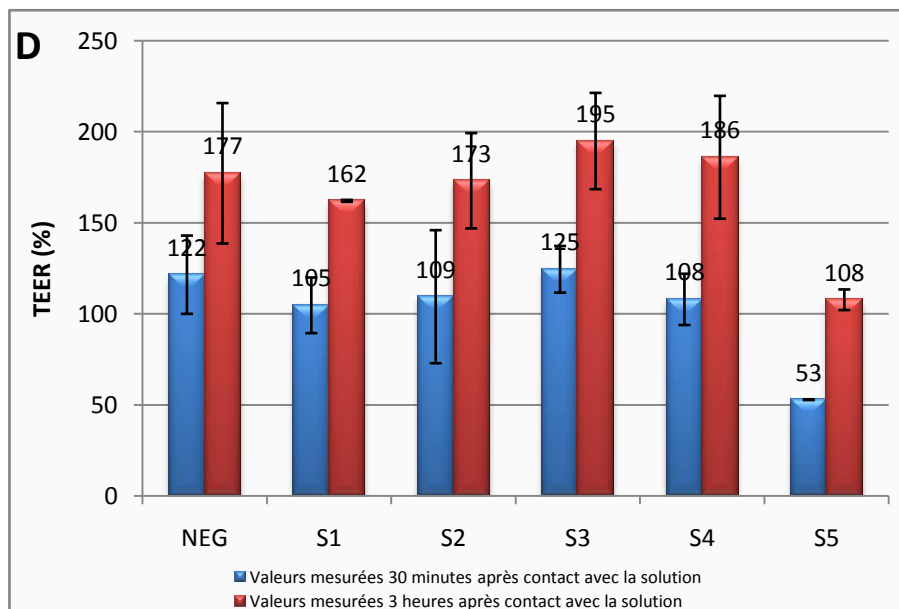
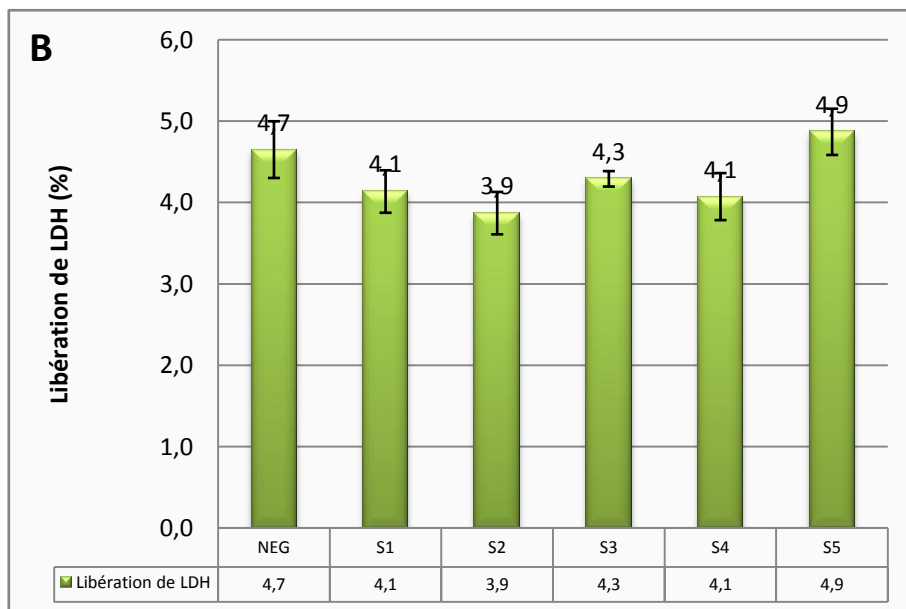
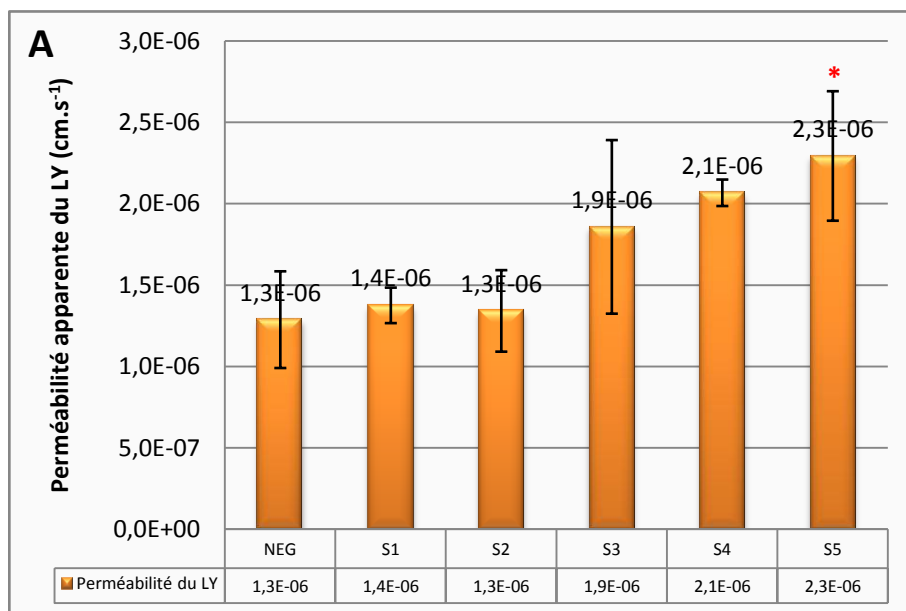


Figure 21 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 4 (70% (m/m) Labrafil® M1944CS et 30% (m/m) Cremophor® RH40). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôlée (\* p<0,05).



**C**

	Diamètre (nm)		Indice de polydispersité	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
<b>S1</b>	67,4	0,8	0,133	0,009
<b>S2</b>	57,7	0,5	0,143	0,044
<b>S3</b>	117,5	41,8	0,188	0,053
<b>S4</b>	120,0	42,2	0,217	0,073
<b>S5</b>	263,0	137,2	0,446	0,165

**D**

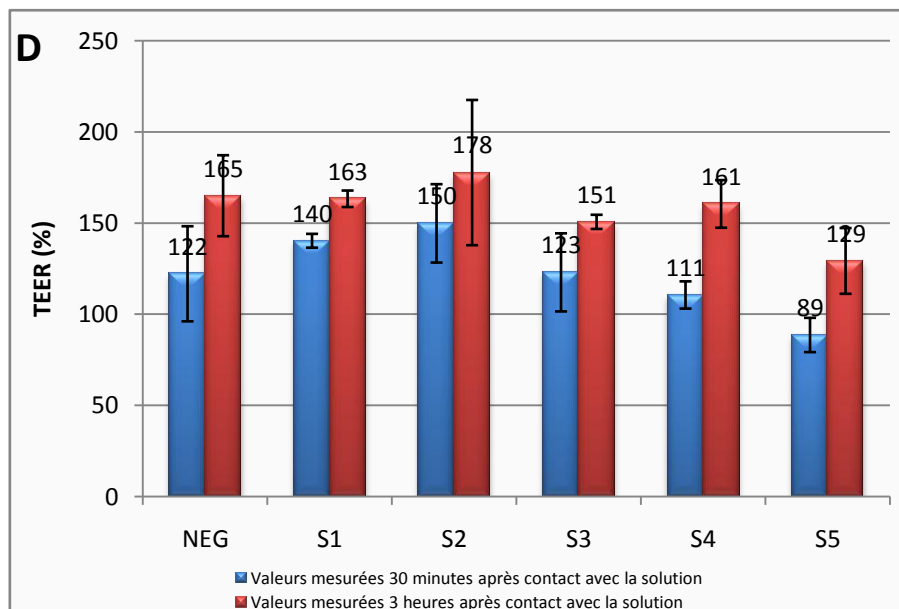
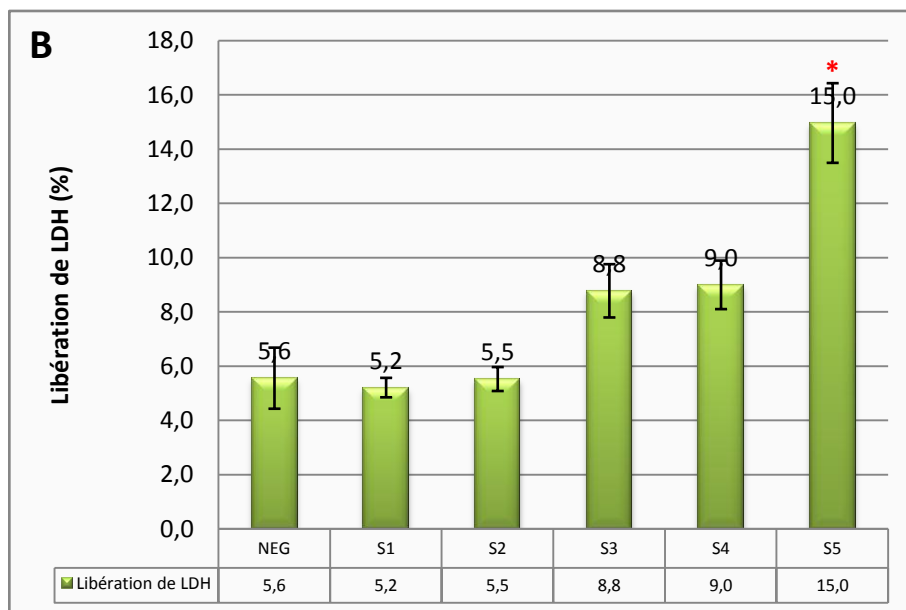
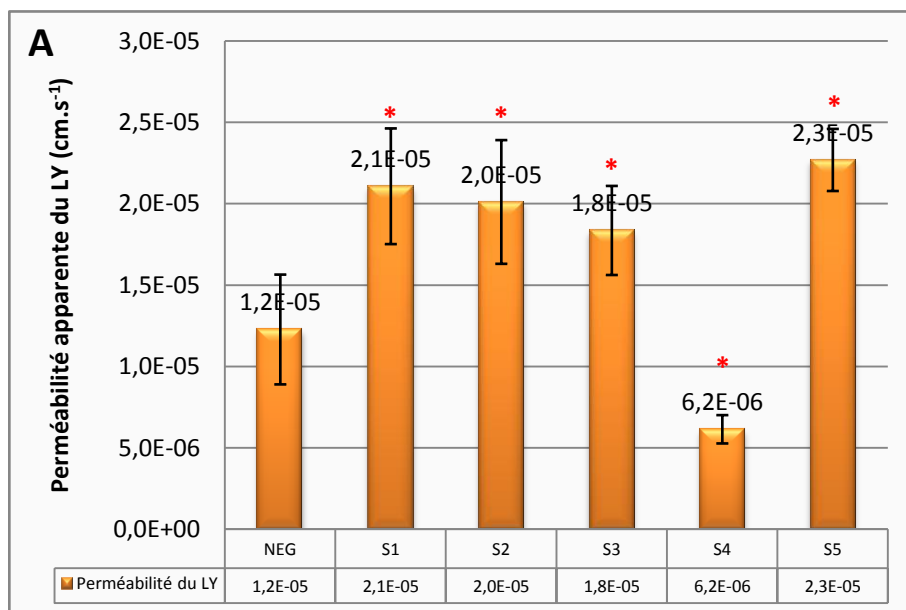


Figure 22 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 5 (60% (m/m) Labrafil® M1944CS et 40% (m/m) Cremophor® RH40). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (\* p<0,05).



**C**

	Diamètre (nm)		Indice de polydispersité	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
<b>S1</b>	222,7	9,4	0,294	0,035
<b>S2</b>	240,5	20,3	0,326	0,038
<b>S3</b>	211,9	4,3	0,513	0,120
<b>S4</b>	225,0	8,1	0,509	0,138
<b>S5</b>	428,8	2,3	0,597	0,092

**D**

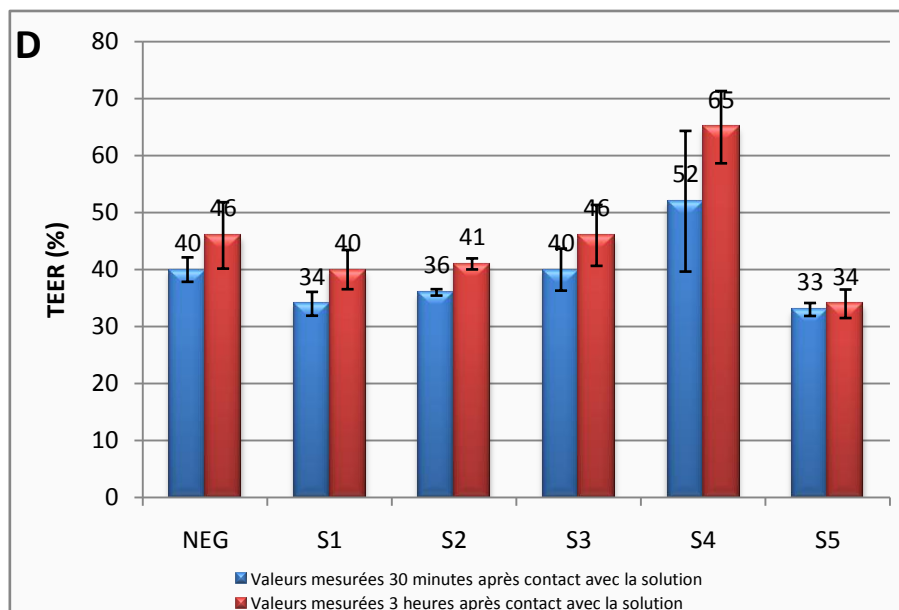


Figure 23 : Résultats des tests de perméabilité au LY (A), de la libération de LDH (B), de granulométrie (C) et du TEER (D) pour la formulation 6 (30% (m/m) Labrafil® M1944CS et 70% (m/m) Vitamine E TPGS®). Les barres représentent des moyennes ± ESM, n=3. Les astérisques indiquent la signification en comparaison avec la solution contrôle (\* p<0,05).

### 3.4 Discussion

Comme de plus en plus de candidats médicaments et de principes actifs liposolubles présentent une faible biodisponibilité lors d'une administration par voie orale, le développement de systèmes lipidiques est largement encouragé. Les surfactants non ioniques utilisés présentent généralement des structures chimiques, des valeurs de HLB et des valeurs de CMC très variées. D'autres agents solubilisants sont utilisables comme les co-solvants qui facilitent la dispersion de la formulation au sein des fluides gastro-intestinaux. Grâce à cette diversité d'excipients, l'optimisation d'une formulation est possible par un choix approprié d'excipients. Cependant, cette même diversité peut aussi être responsable d'effets biologiques variés et parfois imprévisibles. En effet, certains excipients peuvent entraîner des effets cytotoxiques. Par conséquent, développer un protocole capable d'évaluer la cytotoxicité d'un excipient et de déterminer la concentration à laquelle elle se manifeste, peut s'avérer utile. Ceci est d'autant plus vrai lorsque certains produits comme le Cremophor® EL [Gelderblom et al, 2001] ou le polysorbate 80 [Shelley et al, 1995 ; HIRAMA et al, 2004], sont connus pour leurs effets cytotoxiques. Afin de tester ce protocole, nous avons étudié un excipient lipophile, sept surfactants non ioniques et un co-solvant commercialement disponibles et présentant des propriétés physicochimiques différentes (Tableau 6).

Les études de cytotoxicité menées sur ces différents excipients ont apporté des résultats qui sont repris dans le Tableau 8. Il est important de préciser que la concentration d'excipient de 100 g/L utilisée dans notre protocole représente des conditions d'études extrêmes et non réalistes dans le cadre d'une administration par voie orale. En effet, pour atteindre une telle concentration, il faudrait ingérer 20 g d'excipient en considérant que le volume des fluides gastro-intestinaux soit de 200 mL. Avec le polysorbate 80, le Soluphor® P et le Solutol® HS15A, les cellules sont d'ailleurs complètement lysées. Les résultats obtenus à cette concentration n'ont qu'un intérêt informatif et ne peuvent être utilisés objectivement dans la détermination de la cytotoxicité. Par conséquent, l'interprétation de nos résultats se base essentiellement sur les concentrations allant de 10 mg/L à 10 g/L.

Les résultats obtenus avec le Labrafil® M1944CS sont tout aussi subjectifs parce que cet excipient seul n'arrive pas à former un mélange monophasique stable au contact d'une solution aqueuse. En effet, à 100 g/L, une séparation de phase apparaît rapidement avec le Labrafil® M1944CS se trouvant au dessous de l'HBSS. De ce fait, il en résulte un mauvais contact de l'excipient avec les monocouches cellulaires. Cette séparation peut s'expliquer par sa faible HLB qui est de 3-4. Par conséquent, le champ d'application de notre protocole se limite à l'étude d'excipients hydrosolubles et ne s'étend pas à celle d'excipients peu hydrosolubles dans l'eau comme le Labrafil® M1944CS.

Des résultats intéressants ont été obtenus avec les autres excipients. Il a été notamment observé que certains produits comme le Cremophor® EL induisent plutôt des dégâts superficiels au niveau membranaire et des jonctions serrées, alors que d'autres comme le Soluphor® P, provoquent des dégâts plus profonds en atteignant le métabolisme. Le Solutol® HS15, la Vitamine E TPGS® et le polysorbate 80 causent des dommages qui sont à la fois superficiels et internes. Les résultats obtenus avec le Cremophor® ELP permettent de justifier la présence de l'étude du métabolisme cellulaire dans notre protocole d'étude. En effet, cet excipient n'affecte pas l'intégrité membranaire ni celle des jonctions serrées même à la concentration de 100 g/L. Pourtant, les tests MTT montrent que leur activité métabolique est diminuée. La combinaison du test MTT avec ceux de la LDH, du LY et du TEER est donc justifiée dans le cadre de ce protocole et permet d'avoir une vue générale sur les risques de cytotoxicité d'un excipient. Ce protocole peut donc permettre de mieux comprendre et interpréter les mécanismes par lesquels les excipients exercent leur toxicité.

**Tableau 8 : Synthèse des résultats des tests de cytotoxicité pour les excipients seuls**

	<b>Perméabilité paracellulaire (LY)</b>	<b>Intégrité membranaire (LDH)</b>	<b>Métabolisme (MTT)</b>
Polysorbate 80	Augmentation à partir de 100g/L	<b>Diminution à partir de 10g/L</b>	<b>Diminution à partir de 1g/L</b>
Cremophor® RH40	Pas d'effets	Pas d'effets	Pas d'effets
Cremophor® EL	Augmentation à partir de 100g/L	<b>Diminution à partir de 10g/L</b>	Diminution à partir de 100g/L
Cremophor® ELP	Pas d'effets	Pas d'effets	Diminution à partir de 100g/L
Soluphor® P	Augmentation à partir de 100g/L	Pas d'effets	<b>Diminution à partir de 1g/L</b>
Solutol® HS15	<b>Augmentation à partir de 10g/L</b>	Diminution à partir de 100g/L	<b>Diminution à partir de 1g/L</b>
Vitamine E TPGS®	<b>Augmentation à partir de 10g/L</b>	Pas d'effets	<b>Diminution à partir de 10g/L</b>
Transcutol® P	Augmentation à partir de 100g/L	Pas d'effets	Diminution à partir de 100g/L
Labrafil® M1944CS	Augmentation à partir de 100g/L	Pas d'effets	-

Ce même protocole a aussi été appliqué à six formulations composées de Labrafil® M1944CS et à différents surfactants non ioniques (Tableau 7). Cette étude permet d'apporter des éléments de réponses à une problématique récente concernant l'impact des nanoparticules sur la santé humaine [Nel et al, 2006 ; Oberdörster et al, 2005]. Peu d'études sur une potentielle cytotoxicité des nanoparticules formées après dispersion d'une formulation orale lipidique dans les fluides gastro-



intestinaux ont été menées et des données expérimentales sont nécessaires pour étayer cette problématique. Les six formulations étudiées ont toutes montré d'une manière ou d'une autre une cytotoxicité (élévation de la LDH et/ou de la perméabilité au LY) principalement avec les solutions fortement concentrées (S4 et S5). Néanmoins, il est important de noter que la concentration en excipients des solutions S5 est environ 3 fois supérieure à la plus forte concentration appliquée lors de l'étude des excipients seuls (de 100 à 233 g/L pour les solutions contenant un seul excipient et de 333 g/L pour les solutions S5 issues des formulations étudiées – voir Tableau 7). Il n'est pas évident d'utiliser les résultats des solutions S5 pour conclure quant à la toxicité vis-à-vis de l'épithélium intestinal. Ces résultats permettent principalement de différencier les excipients bien tolérés par les cellules à des concentrations plus faibles (de l'ordre de 1 g/L) et d'établir un classement parmi ces excipients. A titre d'exemple, le Cremophor® RH40 et le Cremophor® EL ne provoquent pas une diminution de l'activité métabolique cellulaire. Toutefois, cette dernière diminue avec le Cremophor® EL à partir d'une concentration de 100 g/L, alors qu'à la même concentration, elle reste normale avec le Cremophor® RH40. Enfin, l'inconvénient majeur dans l'étude de ces formulations est de ne pas avoir de données sur l'activité métabolique des cellules puisque le Labrafil® M1944CS réduit le MTT en formazan.

Dans le cadre de cette étude, les phénomènes de cytotoxicité dont les résultats sont récapitulés dans le Tableau 9, peuvent avoir deux origines. La première est liée directement à la composition du système lipidique et à la cytotoxicité propre de chaque excipient. La seconde correspond à la polydispersité des particules obtenues en solution aqueuse. En effet, certaines formulations comme la 3 et la 6, ne permettent pas l'obtention d'émulsions monodisperses, stables et reproductibles. Ces systèmes montrent d'ailleurs une cytotoxicité vis-à-vis des jonctions serrées en augmentant le passage paracellulaire. D'après ces observations, une forte polydispersité pourrait être responsable de réarrangements importants au niveau de ces jonctions. La nature des excipients utilisés est également un facteur important. Les formulations contenant du Cremophor® RH40 (4 et 5) ne présentent aucun signe de cytotoxicité. Ces résultats étaient prévisibles puisque les études préliminaires sur le Cremophor® RH40 n'ont montré aucun signe apparent de dégâts cellulaires. Par contre, la formulation 2 contenant un excipient cytotoxique, le Solutol® HS15, entraîne une augmentation de la LDH et de la perméabilité au LY. Le Cremophor® ELP seul ne perturbe pas la perméabilité paracellulaire. Au sein de la formulation 1, une augmentation de passage du LY est observée avec les solutions S4 et S5. Cet effet peut être attribué au Labrafil® M1944CS dont les résultats de cytotoxicité (en lien avec les observations faites quant à sa faible hydrosolubilité) montrent des atteintes au niveau des jonctions serrées. Par conséquent, l'étude de ces formulations

peut permettre une détermination indirecte de la cytotoxicité d'excipients non solubles dans l'eau comme le Labrafil® M1944CS.

**Tableau 9 : Synthèse des résultats des tests de cytotoxicité pour les six formulations**

	<b>Perméabilité paracellulaire (LY)</b>	<b>Intégrité membranaire (LDH)</b>	<b>Polydispersité</b>
Formulation 1	<b>Augmentation à S4 et S5</b>	Diminution à S5	Faible
Formulation 2	<b>Augmentation à S4 et S5</b>	<b>Diminution à S4</b>	Faible
Formulation 3	Augmentation à S5	Pas d'effets	<b>Elevée</b>
Formulation 4	Augmentation à S5	Pas d'effets	Faible
Formulation 5	Augmentation à S5	Pas d'effets	Faible
Formulation 6	<b>Augmentation de S1 à S5</b>	Diminution à S5	<b>Elevée</b>

A partir des mesures de granulométrie, les six formulations étudiées peuvent être caractérisées et classées selon le système de Pouton (voir section 1.3.1) [Pouton et al, 2006]. Ces formulations sont toutes formées d'un mélange d'huile et de surfactant qui leur confèrent des propriétés auto-émulsifiantes. Les formulations 3 et 6 contenant de la Vitamine E TPGS® correspondent à des SEDDS qui forment typiquement des émulsions dont la taille des particules est comprise entre 100 et 300 nm. Les formulations 1, 2, 4 et 5 contenant du Solutol® HS15, du Cremophor® ELP ou du Cremophor® RH40 correspondent à des SMEDDS® qui, après dispersion, forment des particules de taille inférieure à 100 nm [Pouton et al, 2006]. Comme mentionnés précédemment, les risques de toxicité suite à une administration de nanoparticules par voie orale sont peu connus [Oberdörster et al, 2005]. Notre étude a permis d'apporter des éléments de réponse à ce sujet. En effet, la formulation 6 qui donne lieu à la formation de particules de grande taille exprime une forte cytotoxicité, alors que les formulations 4 ou 5 formant de plus fines particules n'en présentent pas. D'après nos résultats, la toxicité d'un système lipidique ne dépend pas particulièrement de la taille des particules mais plutôt de la nature des excipients la composant et, dans une moindre mesure, de la polydispersité des entités colloïdales formées après émulsification.

D'après ces résultats de cytotoxicité, une comparaison de ces essais peut être faite. En accord avec les données de la littérature, le test MTT semble être le plus sensible dans la détection d'effets cytotoxiques [Pohjala et al, 2007], tandis que le TEER qui ne reflète que l'intégrité des jonctions serrées, présente la plus faible sensibilité [Mukherjee et al, 2004]. La libération de LDH, plus adaptée à l'étude des liposomes [Lappalainen et al, 1994], et la perméabilité au LY n'ont permis d'apprécier qu'une sensibilité intermédiaire. Par conséquent, notre protocole se présente comme un ensemble de tests de cytotoxicité complémentaires avec des degrés différents de sensibilité permettant l'évaluation d'excipients pharmaceutiques hydrosolubles et de formulations lipidiques.

Il a été rapporté dans la littérature que le polysorbate 80 est un excellent promoteur d'absorption [Nerurkar et al, 1996] tout en présentant des effets indésirables évidents [Shelley et al, 1995 ; Hirama et al, 2004]. Ces observations permettent de conclure que la frontière séparant les effets cytotoxiques des effets promoteurs d'absorption d'un excipient n'est pas toujours claire. Notre étude a tenté de mieux comprendre les mécanismes amenant à ces effets. La dégradation de la membrane plasmique ou des jonctions serrées peut améliorer le passage à travers la barrière intestinale. A partir d'un certain seuil de dégradation, certains excipients, en plus d'améliorer l'absorption, exercent une cytotoxicité. Par conséquent, une amélioration de l'absorption par l'usage d'excipients est souvent corrélée à des phénomènes importants de cytotoxicité. Il ne faut donc pas négliger les éventuels effets indésirables de vecteurs contenus dans une formulation par rapport à ceux des principes actifs. Le protocole décrit dans cette étude peut s'avérer utile dans le développement de formulations destinées à la voie orale en facilitant le choix des excipients appropriés à la formulation.

### **3.5 Conclusion**

En conclusion, notre étude a permis de montrer que les excipients pharmaceutiques à une concentration bien définie, peuvent induire des dommages cellulaires de natures variées comme des désordres jonctionnels, membranaires ou enzymatiques. Notre protocole a été mis au point en tenant compte de ces éléments. Il combine des tests de cytotoxicité spécifiques (MTT, LDH, LY et TEER) permettant de déterminer de façon sensible les éventuels effets biologiques d'une substance inconnue ou d'une nouvelle formulation.

En fait, les effets indésirables liés aux formulations sont souvent sous-estimés (nano-toxicité...) et les notions de cytotoxicité et de promotion d'absorption peuvent souvent être amalgamées et ainsi créent des confusions. Par conséquent, le protocole proposé peut être utilisé pour solutionner ces points en permettant le développement, la caractérisation et l'optimisation de systèmes lipidiques destinés à application thérapeutique par voie orale.

# Chapitre 4: Mise au point d'une formulation orale pour une substance lipophile, l'orlistat

## 4.1 Introduction générale

Mis sur le marché en 1998, l'orlistat est une substance active appartenant à la classe des inhibiteurs des lipases gastro-intestinales. Indiquée dans le traitement à long terme de l'obésité, elle se caractérise par sa faible biodisponibilité par voie orale et par son action localisée au niveau intestinal. Pour une efficacité optimale, l'orlistat est associé à un régime hypocalorique et hypolipidique. A la posologie de 3 gélules contenant chacune 120 mg de principe actif par jour, ce traitement permet une perte de poids tout en diminuant les facteurs de risques cardio-vasculaires ainsi que l'incidence du diabète chez des patients à haut risque [Padwal et al, 2007]. Ce médicament est commercialisé par les laboratoires Roche sous le nom de Xénical® (120 mg par gélule) et par GlaxoSmithKline sous le nom de Alli® (60 mg par gélule).

La faible biodisponibilité par voie orale de l'orlistat s'explique par son caractère lipophile. En effet, sa solubilité dans l'eau est inférieure à 1 mg par 100 mL. Ainsi, dans sa forme commerciale, l'absorption systémique de l'orlistat est négligeable (concentration inférieure à 5 ng/L). L'orlistat traverse très difficilement les barrières biologiques [Zhi et al, 1995]. Ceci peut s'expliquer par la présence de longues chaînes hydrocarbonées dans sa structure chimique (Figure 24). L'orlistat inhibe les lipases gastriques et pancréatiques en formant une liaison covalente avec un résidu sérine du site actif de l'enzyme [Lucas et al, 2001]. Cette inhibition permet de réduire d'environ 30 % l'absorption des matières grasses provenant de l'alimentation en limitant l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres et monoglycérides. En conséquence de ce mécanisme d'action, l'élimination des graisses alimentaires se fait dans les selles. [Padwal et al, 2007]

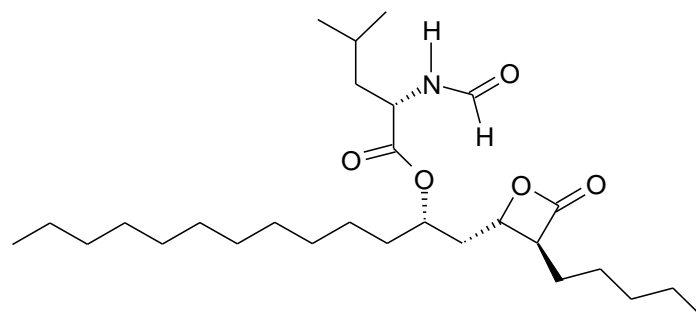
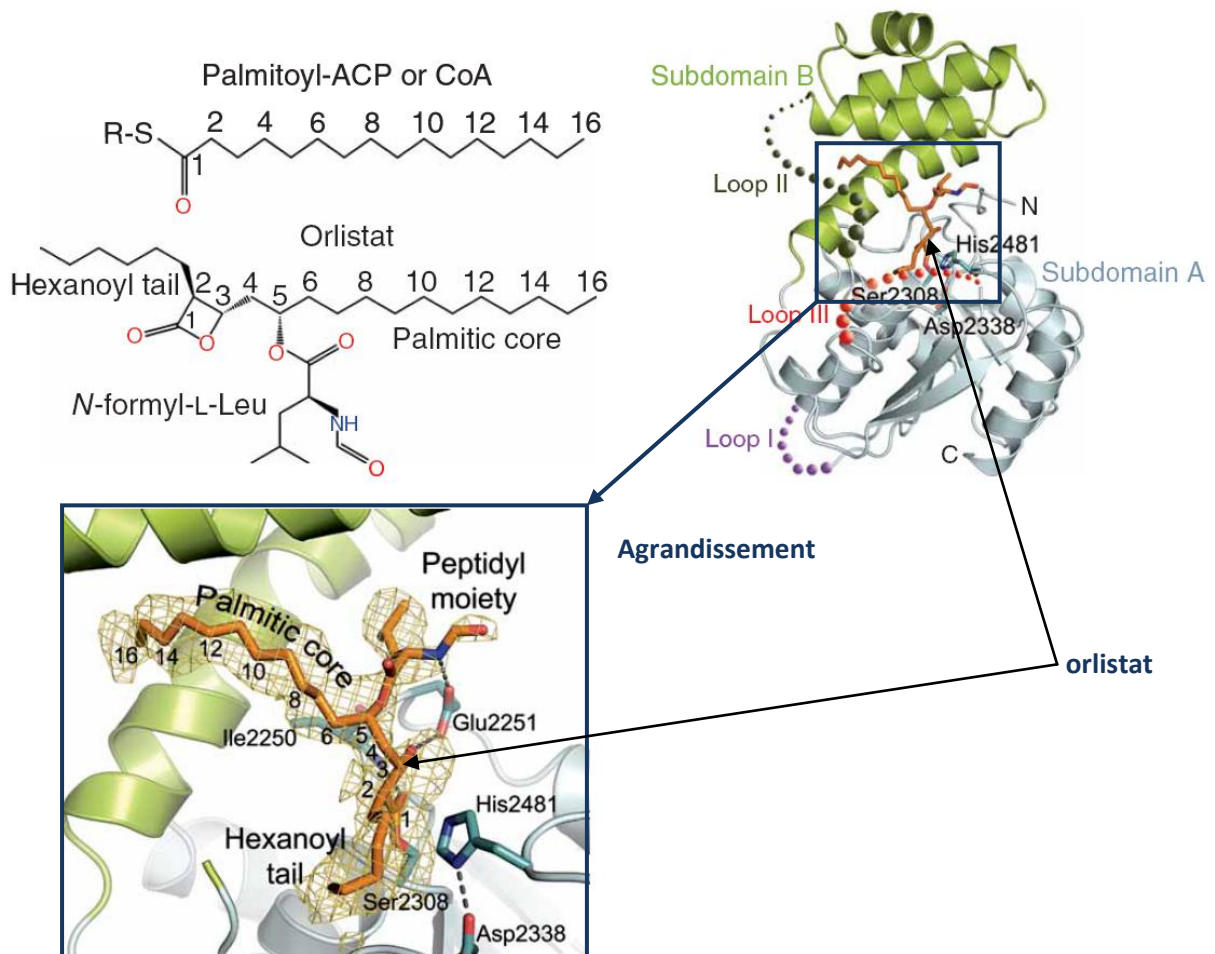


Figure 24: Structure chimique de l'orlistat

Des études récentes ont souligné une forte activité inhibitrice de l'orlistat sur l'acide gras synthase (AGS). Cette enzyme homo-dimérique permet la formation *de novo* d'acide palmitique (acide gras

polyinsaturé en C16), précurseur de nombreux acides gras endogènes. C'est à partir d'acétyl-CoA, de malonyl-CoA et de NADPH que l'AGS synthétise l'acide palmitique. Physiologiquement, sa présence et son activité sont normales dans le foie, le tissu adipeux et les glandes mammaires. Cependant, cette enzyme est surexprimée dans les cellules tumorales. Elle se présente donc comme une cible thérapeutique potentielle et intéressante dans les traitements anticancéreux [Kridel et al, 2004 ; Lupu et al, 2006]. Comme mentionné avec les lipases, l'orlistat est capable d'inhiber spécifiquement l'AGS en agissant au niveau de son domaine thioestérase (Figure 25) [Pemble et al, 2007].



**Figure 25 : Représentation tridimensionnelle du complexe formé par le domaine thioestérase de l'AGS et l'orlistat**

Des études ont montré qu'en inhibant l'AGS, l'orlistat peut exercer une activité anti-tumorale sur les cancers de la prostate, du colon [Kridel et al, 2004] ou du sein [Menendez et al, 2005]. Menendez et al ont testé l'association de l'orlistat et du trastuzumab, un anticorps monoclonal dirigé contre les récepteurs HER2-neu, dans le cadre d'un traitement du cancer du sein. Ils ont observé que cette co-administration permettait d'obtenir une activité anti-tumorale synergique par rapport à l'administration de ces substances seules [Menendez et al, 2006].

Pharmacologiquement, l'orlistat interfère avec la prolifération cellulaire. Cette molécule est capable d'induire la mort cellulaire par apoptose des cellules tumorales en provoquant un stress au niveau du réticulum endoplasmique, site majeur de la synthèse de phospholipides au niveau cellulaire. Ce stress a pour origine l'inhibition de l'AGS par l'orlistat [Little et al, 2007]. Une étude récente sur la lignée cellulaire murine de mélanome métastatique B16-F10, a montré une inhibition spécifique de l'activité de l'AGS par l'orlistat. Ceci a eu pour conséquence une réduction significative de la prolifération cellulaire et une accélération de l'apoptose [Carvalho et al, 2008]. Ainsi, l'orlistat peut se révéler être un candidat intéressant dans le traitement de nombreux cancers. Cependant, sa formulation actuelle destinée à traiter l'obésité ne permet pas un passage systémique suffisant que pour générer une activité anti-tumorale. L'utilisation des systèmes lipidiques, décrits précédemment, devraient permettre d'augmenter la biodisponibilité par voie orale de cette substance active.

Au sein de notre laboratoire, des travaux ont été réalisés afin de formuler l'orlistat de manière à améliorer son absorption par voie orale. Des travaux pluridisciplinaires ayant impliqué quatre laboratoires différents, se sont déroulés en cinq étapes :

- Etape 1 : Des études d'inhibition de croissance de l'orlistat sur deux lignées de cellules immortalisées issues d'un adénocarcinome colorectal ont été réalisées afin de confirmer l'effet anticancéreux de l'orlistat et de déterminer la concentration à laquelle elle exerce son effet.
- Etape 2 : Une validation de la méthode analytique de dosage de l'orlistat par chromatographie liquide a été entreprise pour permettre de quantifier de très faibles concentrations.
- Etape 3 : Des études de perméabilité de l'orlistat incorporé dans des systèmes lipidiques auto-émulsifiants ont été réalisées à l'aide d'un modèle *in vitro* de barrière intestinale basé sur l'utilisation de cellules Caco-2. Ces études ont permis d'évaluer l'efficacité de ces formulations.
- Etape 4 : Des études de cytotoxicité des différentes formulations ont été réalisées afin d'évaluer leur sécurité d'emploi et de déceler d'éventuels dégâts cellulaires.
- Etape 5 : Enfin, grâce à un granulomètre laser, des mesures de tailles ont été déterminées sur les différentes espèces colloïdales issues des différentes formulations testées.

## **4.2 Matériel et méthode**

### **4.2.1 Etudes d'inhibition de croissance**

Les études d'inhibition de croissance ont été réalisées sur deux lignées cellulaires issues d'un adénocarcinome humain. Il s'agit des cellules SW480 et SW620. Elles ont été prélevées chez le même

patient mais à des stades différents du développement de son cancer. Les cellules SW480 proviennent d'un prélèvement au stade primaire du développement de l'adénocarcinome et les cellules SW620 d'un prélèvement de métastases. Les SW480 se développant moins vite que les SW620, ces cellules sont moins sensibles à l'activité des anticancéreux. Inversement, les SW620 se multiplient moins vite en présence d'un agent anticancéreux.

Les lignées de cellules SW480 et SW620 ont été obtenues respectivement aux passages 11 et 91 de l'American Type Culture Collection (LGC/ATCC, Molsheim, France). Les conditions de culture ont été identiques pour les deux lignées. Cultivées à 37°C dans des incubateurs où règne une atmosphère à 95% d'humidité relative et à 5% de CO<sub>2</sub>, les SW480 ont été utilisées au passage 18 et les SW620 au passage 98. Le milieu utilisé est composé de DMEM à 25mM de glucose supplémenté avec 3 % de sérum de cheval (inactivé pendant 30 minutes à 56°C), 1% d'acides aminés non essentiels, 100 unités/mL de pénicilline G, 100 µg/mL de Streptomycine 5 µg/mL de transferrine, 5 ng/mL de Sélénium et 10 µg/mL d'insuline.

Pour les tests d'inhibition de croissance, les cellules ont étéensemencées à une densité de  $4 \times 10^3$  cellules/puits (200 µL/puits) sur des plaques à 96 puits. Les cellules sont mises en contact avec des solutions d'orlistat à différentes concentrations 24 heures après l'ensemencement. Le milieu est aspiré puis remplacé par le milieu contenant le produit à tester. Les courbes de croissance sont établies sur neuf jours pendant lesquels une mesure de la croissance est réalisée le 1<sup>er</sup>, 3<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> jour.

Pour réaliser une mesure, les cellules doivent être « fixées » (tuées). Cette opération consiste à rajouter 50 µL d'acide trichloracétique à 50 % (la concentration finale dans le puits étant de 10 %) dans chaque puits. La plaque est mise à 4°C pendant une heure. Après cette période, le milieu est enlevé par inversion de la plaque qui est ensuite rincée cinq fois à l'eau. Enfin, la plaque est laissée à sécher sur papier absorbant. La coloration des différentes plaques est effectuée le même jour en fin d'étude de croissance. Dans chaque puits, 125 µL d'une solution à 0,04 % de sulforhodamine B dans une solution à 1 % d'acide acétique (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Quentin Fallavier, France) ont été ajoutés. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les plaques sont lavées cinq fois à l'acide acétique à 1%. Après séchage, 200 µL de tampon TRIS pH 10,5 sont ajoutés dans chaque puits. Enfin, une lecture d'absorbance est réalisée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Shimadzu, Kyoto, Japon).

La gamme de concentrations utilisée a été préparée à partir d'orlistat provenant de deux sources différentes. L'orlistat a été obtenu soit directement par Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Quentin Fallavier, France) soit par extraction liquide (éthanol) du Xénical® (Roche, Bale, Suisse).

Ces tests d'inhibition ont été réalisés au sein du Laboratoire de Prévention Nutritionnelle du Cancer (Professeur Francis RAUL et Madame Francine GOSSE) à l'Institut de Recherche Contre les Cancers de l'Appareil Digestif (IRCAD) à Strasbourg.

#### 4.2.2 Validation de la méthode chromatographique de dosage de l'orlistat

L'orlistat provenant de chez Sigma-Aldrich est utilisé pour la validation de la méthode de dosage. Le dosage de cette substance a été réalisé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Le matériel utilisé correspond à un système chromatographique liquide de type Varian (Palo Alto, CA, USA) qui comporte un injecteur automatique ProStar 410, deux pompes ProStar Dynamax 210 et d'un détecteur 1200 L triple quadripolaire équipé d'une chambre d'ionisation par électrospray (ESI-MS-MS). Le logiciel utilisé pour l'acquisition et le traitement des données correspond à la version 6,8 du Varian MS Workstation.

Les solutions d'orlistat sont préparés en dissolvant le principe actif dans du méthanol. Environ 10 mg d'orlistat ont été pesés directement dans une fiole jaugée de 10,0 mL. La masse exacte en milligramme servira à calculer la concentration de la solution mère (SM) qui sera d'environ 2 mM. Cette solution est diluée au centième pour avoir la solution SM'. Par la suite, une gamme d'étalonnage est réalisée. Les volumes indiqués dans le Tableau 10 sont prélevés dans les solutions correspondantes pour établir cette gamme. Le volume d'injection de chacune de ces solutions est de 20 µL.

**Tableau 10 : Volumes prélevés pour préparer la gamme d'étalonnage de l'orlistat**

Solutions de la gamme d'étalonnage Volumes des solutions utilisées pour la préparation de la gamme	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
<b>SM' (µL)</b>	500	200	100	-	-	-	-	-
<b>S1 (µL)</b>	-	-	-	1000	-	-	-	-
<b>S2 (µL)</b>	-	-	-	-	200	-	-	-
<b>S3 (µL)</b>	-	-	-	-	-	200	-	-
<b>S4 (µL)</b>	-	-	-	-	-	-	200	-
<b>S5 (µL)</b>	-	-	-	-	-	-	-	200
<b>Volume de méthanol ajouté (µL)</b>	1500	1800	1900	1800	1800	1800	1800	1800



Les échantillons sont analysés de façon isocratique et la séparation se fait sur une colonne phényle de type Zorbax Eclipse XDB-phényl (250 mm×3.0 mm, 5 µm, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) à une température de 20±2°C. La phase mobile est composée de 15 % d'une solution aqueuse d'acide acétique à 0,1 % (v/v) et de 85 % d'acétonitrile. Le débit utilisé au moment de la séparation est de 1,0 mL/min. Avant son utilisation, la phase mobile est filtrée par une membrane en nylon de 0,45 µm de taille de pores. Le temps d'analyse est de 6 minutes par échantillon. En sortie de colonne, seul 20 % (200 µL/min) de la phase mobile ont été dirigés vers le spectromètre de masse (split).

L'acétonitrile, le méthanol et l'acide acétique (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Quentin Fallavier, France) utilisés sont de grade analytique. La phase aqueuse est préparée à partir d'eau ultrapure fournie par un système de purification Synergie® UV (Millipore, Molsheim, France).

Les paramètres du spectromètre de masse ont été définis par infusion et par introduction directe d'une solution méthanolique d'orlistat à 5 µM à l'aide d'une vanne Rhéodyne de 5 µl. Ces paramètres sont présentés ci-dessous :

- Le mode d'ionisation du spectromètre ESI-MS-MS est réglé en mode ion positif.
- La tension de l'aiguille de nébulisation est réglée à 5000 V.
- La pression et la température de l'azote utilisé comme gaz séchant sont respectivement de 20 psi et de 300°C.
- La pression du gaz de nébulisation est réglée sur 47 psi.
- La température de la source est de 50°C.
- La transition  $m/z$  518 →  $m/z$  518 est sélectionnée pour la quantification.
- L'énergie de collision est de 10 eV.
- La tension du détecteur est réglée sur 1700 V.

Au cours de l'analyse, l'éluant (20 % soit 200 µL/min) en sortie de colonne a été tout d'abord dirigé vers les déchets. Cette opération permet d'éviter la contamination du détecteur en éliminant la première fraction chargée de sels. Ces sels ont un temps de rétention inférieurs à 4 minutes. Après ces 4 minutes, l'éluant a été redirigé vers le spectromètre de masse grâce à une vanne automatisée à 6 voies placée en amont du détecteur. La substance étudiée présente un temps de rétention d'environ 4,6 minutes qui correspond à la transition  $m/z$  518→ $m/z$  518 de l'orlistat.

Une validation de la méthode de dosage de l'orlistat a été effectuée. Pour cela, la spécificité, la linéarité, la fidélité et le seuil de détection de notre méthode analytique ont été déterminés.

Ces travaux ont été rendus possibles grâce à l'aide du Professeur Eric MARCHIONI et le Docteur Minjie ZHAO qui m'ont aidé à rechercher et mettre au point la méthode de dosage de l'orlistat afin

de pouvoir traiter nos échantillons avec leur matériel au sein du laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

#### 4.2.3 Préparation des systèmes lipidiques renfermant l'orlistat

L'orlistat provenant de chez Sigma-Aldrich a été utilisé dans huit formulations incorporant un seul (Tableau 11) ou plusieurs excipients (huile, surfactant, solvant) (Tableau 12) afin d'étudier l'impact de leur composition sur la perméabilité *in vitro* du principe actif au travers d'une monocouche de cellules Caco-2.

La phase aqueuse utilisée pour former les émulsions ou les systèmes micellaires à partir des différentes formulations, correspond à de l'HBSS à 15 mM de glucose, tamponnée avec 20 mM de MES et ajustée à pH 6,0.

Tableau 11 : Solutions préparées à partir des quatre formulations comportant qu'un seul excipient

		Excipients
<b>Formulation ELP</b>	Excipients	Cremophor® ELP
	Concentration dans la solution mère	7,2 g/L
<b>Formulation EL</b>	Excipients	Cremophor® EL
	Concentration dans la solution mère	7,2 g/L
<b>Formulation L</b>	Excipients	Labrafil® M1944CS
	Concentration dans la solution mère	1 g/L
<b>Formulation P</b>	Excipients	PEG300
	Concentration dans la solution mère	1,8 g/L

**Tableau 12 : Solutions préparées à partir des quatre formulations comportant une association d'excipients**

		<b>Surfactant non ionique</b>	<b>Co-solvent</b>	<b>Excipient huileux</b>
<b>Formulation A</b>	Excipient	Cremophor® ELP	-	Labrafil® M1944CS
	Proportion au sein de la formulation	30% (m/m)	-	70% (m/m)
	Concentration dans la solution mère	3 g/L	-	7 g/L
<b>Formulation B</b>	Excipient	Cremophor® ELP	PEG300	Labrafil® M1944CS
	Proportion au sein de la formulation	72% (m/m)	18% (m/m)	10% (m/m)
	Concentration dans la solution mère	7,2 g/L	1,8 g/L	1 g/L
<b>Formulation C</b>	Excipient	Cremophor® EL	PEG300	Labrafil® M1944CS
	Proportion au sein de la formulation	72% (m/m)	18% (m/m)	10% (m/m)
	Concentration dans la solution mère	7,2 g/L	1,8 g/L	1 g/L
<b>Formulation D</b>	Excipient	Cremophor® ELP	-	Labrafil® M1944CS
	Proportion au sein de la formulation	88% (m/m)	-	12% (m/m)
	Concentration dans la solution mère	7,2 g/L	-	1 g/L

L'orlistat est pesé directement dans une fiole jaugée. Par la suite, les excipients ont été rajoutés dans la même fiole. L'ensemble est ensuite homogénéisé à l'aide d'un barreau magnétique pendant un minimum de 5 minutes. Enfin, tout en maintenant l'agitation, la phase aqueuse correspondant à de l'HBSS pH 6,0 est progressivement ajoutée au mélange jusqu'à atteindre un volume de 25 mL. Les concentrations des excipients contenus dans une telle solution sont proches de celles obtenues dans le cadre d'une administration orale d'une forme pharmaceutique. La concentration finale des solutions en orlistat est de 100 µM.

#### **4.2.4 Culture cellulaire**

La lignée de cellules Caco-2 (HTB-37) a été obtenue au passage 18 de l'American Type Culture Collection (LGC/ATCC, Molsheim, France).

Cultivées à 37°C dans des incubateurs où règne une atmosphère à 95% d'humidité relative et à 5 % de CO<sub>2</sub>, les cellules ont été utilisées du passage 21 au 29. Elles sont cultivées jusqu'à environ 90 % de confluence dans des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> dans du milieu de culture qui est composé de DMEM à 10 % de sérum de bœuf fœtal (inactivé pendant 30 minutes à 56°C), à 1 % d'acides aminés non essentiels, à 100 unités/mL de pénicilline G et à 100 µg/mL de Streptomycine. Le milieu est changé tous les deux jours.

Pour les tests de perméabilité, les cellules Caco-2 sontensemencées à une densité de  $6 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur des membranes poreuses de type Millicell®. Ces membranes présentent des pores de 0,4 µm de diamètre et une surface de 1,13 cm<sup>2</sup>. Au bout de 21 à 25 jours de culture, la maturation et l'intégrité de la monocouche cellulaire sont évaluées par la mesure du TEER (voir section 2.2.2.2.2). Ce contrôle se fait à l'aide d'un voltmètre Millicell®ERS. Seules les monocouches présentant un TEER au dessus de 300 Ω.cm<sup>2</sup>, sont retenues pour les tests de perméabilités. Après ces tests, une dernière mesure du TEER est effectuée afin de s'assurer de l'intégrité de la monocouche [Sambuy et al, 2005 ; Hidalgo et al, 2001 ; Artursson et al, 2001].

#### **4.2.5 Test de perméabilité *in vitro***

Les tests de perméabilité *in vitro* utilisés lors de cette étude sont basés sur l'utilisation de cellules Caco-2. Seul le passage du côté apical vers le côté basolatéral a été étudié. Un gradient de proton a été instauré lors du test avec un pH de 6,0 au niveau du compartiment apical et un pH de 7,4 au niveau du compartiment basolatéral. La phase aqueuse décrite dans la section 4.2.1 a été utilisée pour remplir le compartiment apical. Le compartiment basolatéral contient une solution correspondant à de l'HBSS tamponnée avec 10 mM d'HEPES. La solution contenant l'orlistat a été introduite au niveau apical. Les monocouches ont été pré-incubées avec cette solution pendant une heure à 37°C avant le début du test de perméabilité. Par la suite, des prélèvements de 200 µL ont été effectués au niveau basolatéral à 15, 30, 60, 90 et 120 minutes. Le volume du compartiment basolatéral a été maintenu constant par l'ajout de tampon frais après chaque prélèvement. Toutes les études de perméabilité se sont déroulées à 37°C et sous une agitation orbitale de 50 tours par minute. Chaque essai a été réalisé trois fois.

L'évaluation de la perméabilité de l'orlistat a été réalisée en comparant les résultats des différentes formulations par rapport à une solution contrôle contenant la même concentration d'orlistat. Cette solution est composée de la phase aqueuse décrite dans la section 4.2.1 (HBSS à pH 6.0). Cette solution contenait 1% de DMSO (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Quentin Fallavier, France) nécessaire à une bonne solubilisation de l'orlistat.

Les perméabilités apparentes de l'orlistat (Papp) ont été calculées à l'aide de l'Équation 1 (page 76).

#### **4.2.6 Tests de cytotoxicité**

Trois tests de cytotoxicité ont été effectués lors de cette étude :

- Mesure de la libération de LDH
- Evaluation de la perméabilité apparente du LY
- Mesure du TEER

La libération de la LDH dans le surnageant est utilisée comme indicateur de lésions des membranes cellulaires. Au niveau du compartiment apical, 200 µL de surnageant sont prélevés à la fin du test de perméabilité. La LDH est quantifiée à l'aide du kit Enzyline™ LDH Optimisé 10 et d'un automate CX5. Ces travaux ont été rendus possibles par le Professeur Jean-Marc LESSINGER et son équipe qui ont traité nos échantillons au sein de leur laboratoire au Centre de Chirurgie Orthopédique et de la Main de Strasbourg.

La quantité totale de LDH libérées est obtenue à l'aide d'une solution à 10% de dodécylsulfate de sodium qui permet d'obtenir une lyse cellulaire complète. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport à la lyse totale des cellules.

Le LY est un marqueur du passage paracellulaire (voir section 2.2.2.2.3). Il permet d'évaluer l'intégrité des jonctions serrées qui contribuent à l'étanchéité de la monocouche cellulaire. L'étude de sa perméabilité est réalisée après le test de transport de l'orlistat au travers de la membrane poreuse. Une solution à 0,04% (m/v) de LY est introduite dans le compartiment apical et de l'HBSS dans le compartiment basolatéral. Le test s'étend sur 2 heures pendant lesquelles des prélèvements de 200µL sont effectués au niveau basolatéral à 15, 30, 60, 90 et 120 minutes. L'ajout de tampon frais après chaque prélèvement permet de maintenir le volume du compartiment basolatéral constant. Les échantillons sont dosés par absorption UV à la longueur d'onde de 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-2401PC. Comme pour l'orlistat, les résultats sont exprimés en perméabilité apparente (Équation 1).

Au total, trois mesures de TEER ont été effectuées. Elles ont pour but d'évaluer l'intégrité de la monocouche cellulaire et de déceler des atteintes au niveau des jonctions serrées. La première, réalisée avant le test de perméabilité à pour but de vérifier la bonne maturation et l'intégrité des monocouches de cellules Caco-2. La deuxième a lieu juste après le test de perméabilité du LY. Elle a pour but d'évaluer les effets potentiels qu'auraient les formulations sur l'intégrité de la monocouche. Le milieu de transport (HBSS) est ensuite remplacé par du milieu de culture. Après une phase d'incubation de 12 heures, la troisième mesure est réalisée. Dans le cas d'une diminution du TEER à la deuxième mesure, une ré-augmentation de la valeur du TEER au moment de la troisième mesure signifie que les lésions de la monocouche (perte d'intégrité) sont réversibles. Inversement, si le TEER ne change pas ou diminue, les lésions sont irréversibles.

#### **4.2.7 Granulométrie laser**

Comme pour l'étude précédente, la granulométrie laser a servi pour mesurer les tailles et les indices de polydispersité des différentes entités colloïdales formées à la suite du contact des formulations avec la phase aqueuse. Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS équipé d'un

laser He-Ne de 4mW fonctionnant à la longueur d'onde de 633 nm. Les données recueillies ont été traitées à l'aide du logiciel Dispersion Technology Software 5.10.

#### **4.2.8 Statistiques**

Les résultats de perméabilité et de cytotoxicité ont été présentés sous forme de moyennes  $\pm$ écart-type. Ils sont analysés par one-way ANOVA et le test de comparaison multiple de Student-Newman-Heuls a été utilisé pour déterminer la signification statistique ( $p=0.05$ ) des différences observées.

### **4.3 Résultats**

#### **4.3.1 Etudes d'inhibition de croissance sur les cellules SW480 et SW620**

Les résultats des études d'inhibition de croissance sur les cellules SW620 sont représentés à la Figure 26. Au 6<sup>ème</sup> jour, l'orlistat provenant des laboratoires Roche inhibe la croissance cellulaire de 53 % à la concentration de 100  $\mu$ M, alors qu'à la même concentration, la même molécule provenant de chez Sigma-Aldrich ne l'inhibe que de 12 %. Cette dernière ne présente de bons effets inhibiteurs (84 %) qu'à la concentration de 200  $\mu$ M. Les raisons de cette différence peuvent avoir plusieurs explications. La principale résiderait dans la présence de certains excipients comme le laurylsulfate de sodium dans la solution obtenue après extraction du principe actif à partir des gélules de Xénical®. Néanmoins, ces résultats permettent de définir approximativement une concentration d'utilisation de l'orlistat à laquelle elle serait capable d'exercer un effet anticancéreux.

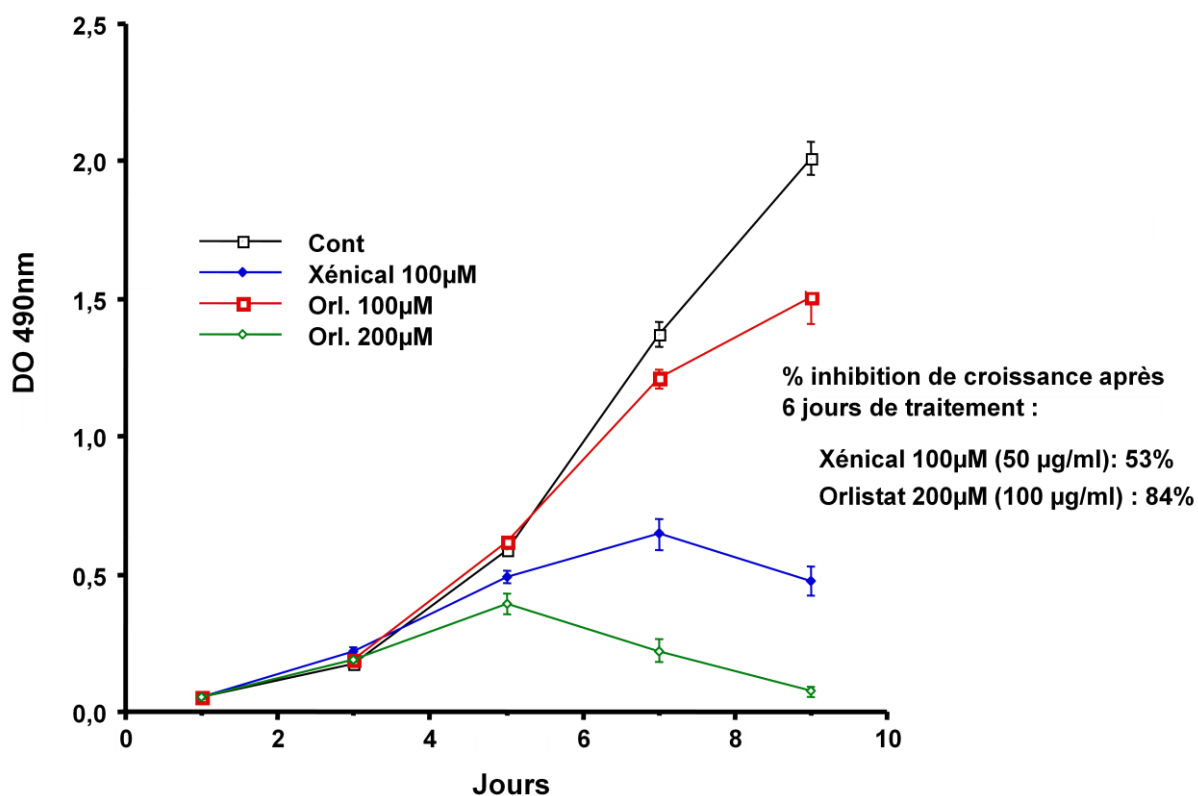


Figure 26 : Résultats des tests d'inhibition de croissance sur les cellules SW620 traitées avec l'orlistat (Roche et Sigma-Aldrich)

Les résultats des études d'inhibition de croissance sur les cellules SW480 représentés à la Figure 27 confirment les observations faites avec les cellules SW620. L'orlistat provenant de Roche (57 %) présente aussi un meilleur pouvoir inhibiteur que l'orlistat provenant de chez Sigma-Aldrich (29 %) à la concentration de 100 µM. Un fort pouvoir inhibiteur de la part du produit Sigma-Aldrich (73 %), n'est obtenu qu'à 200 µM. Ces résultats confirment que la concentration active de l'orlistat est de 100 µM. Mais ils révèlent surtout qu'il y a une différence d'activité entre les produits Sigma-Aldrich et Roche. Ainsi, l'origine de la matière première aura un impact certain sur des études ultérieures d'inhibition de croissance.

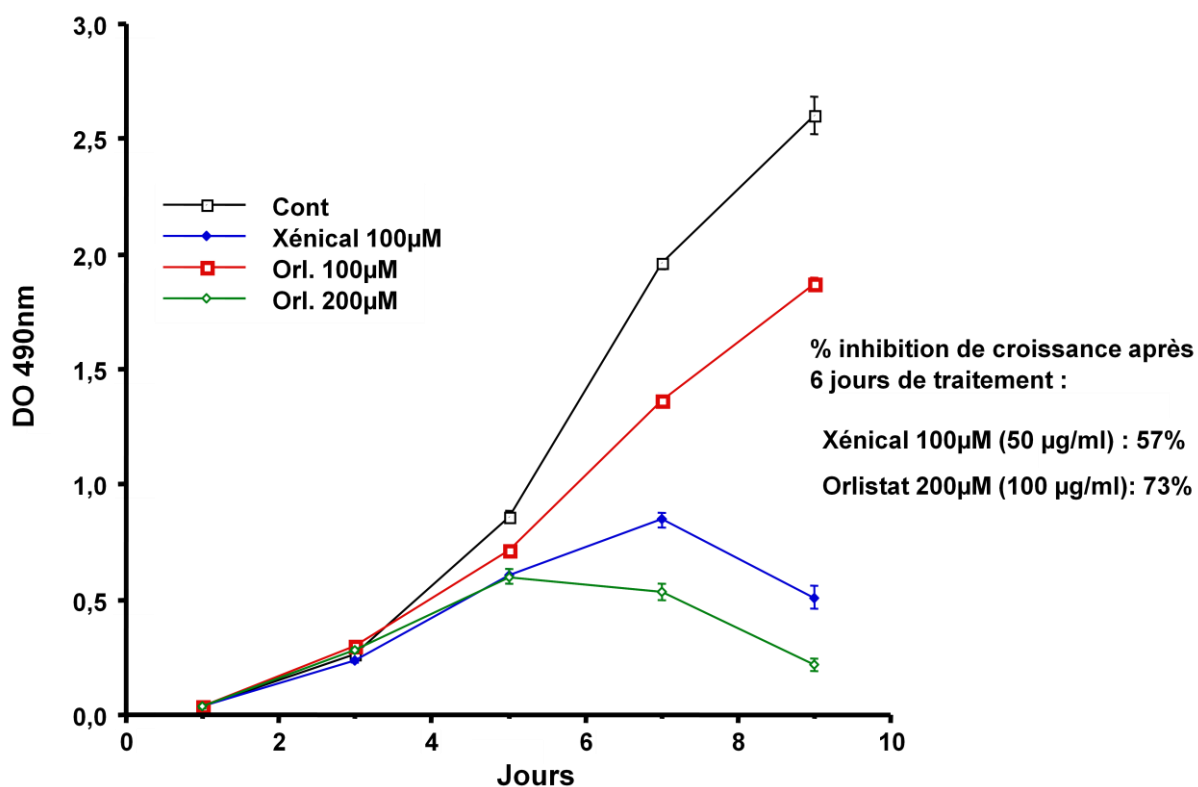


Figure 27 : Résultats des tests d'inhibition de croissance sur les cellules SW480 traitées avec l'orlistat (Roche et Sigma-Aldrich)

### 4.3.2 Validation de la méthode analytique de dosage

#### 4.3.2.1 Analyse du spectre de masse

Avant de commencer la mise au point de la méthode de dosage, il est nécessaire de chercher les paramètres d'analyses adéquats au niveau de la masse. A partir d'injections directes d'une solution d'orlistat de référence, celle-ci a d'abord été analysée en masse simple, puis en mode MS-MS.

Les résultats des injections directes de la solution de référence sont représentés à la Figure 28. Le chromatogramme représente trois pics correspondant chacun à une injection d'orlistat. Sur le spectre de masse 1A, les pics du bruit de fond ainsi que ceux des ions moléculaires sont représentés. L'orlistat ne semble pas se fragmenter. Le spectre 2A correspond à un agrandissement du spectre 1A. Il permet de mieux isoler les deux pics qui nous intéressent c'est-à-dire à celui de masse 496 ( $495 + 1$ ) et de masse 518 ( $495 + 23$ ). Le pic à 496 correspond à la masse de l'orlistat protonée au niveau de son azote. Le pic à 518 correspond aussi à la masse de l'orlistat mais additionnée par celle d'un ion sodium. Enfin, le spectre 3A représente le bruit de fond propre au détecteur. Par conséquent, les pics observés à 157, 213, 198 et 235 ne correspondent pas à des fragments de l'orlistat.

Le choix de l'ion moléculaire pour mettre au point la méthode de dosage s'est porté sur celui affichant une masse de 518 parce que ce pic montre une meilleure sensibilité ( $6,4 \times 10^7$ ) que celle du 496 ( $5,4 \times 10^7$ ).



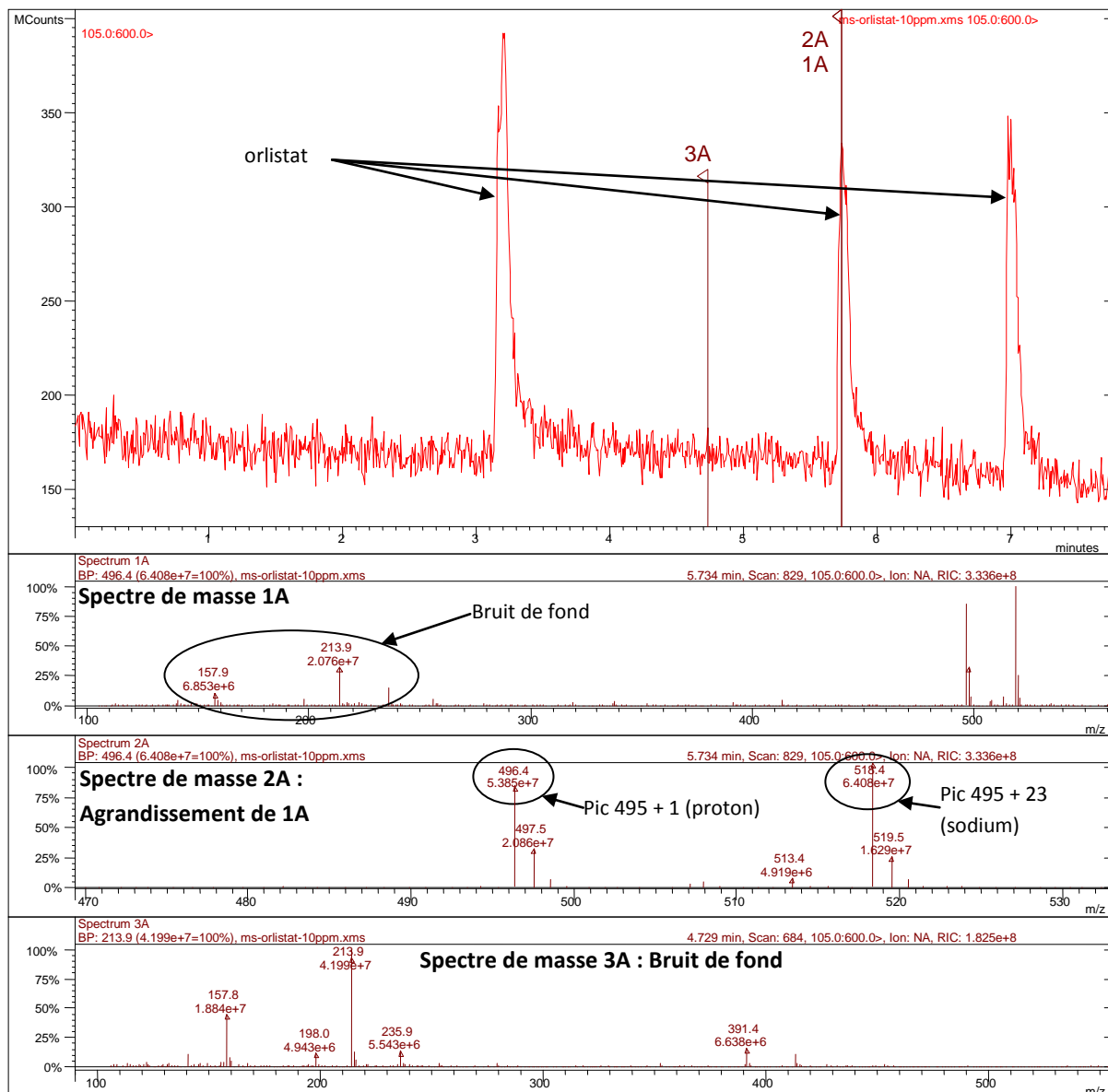


Figure 28 : Spectre de masse de l'orlistat

#### 4.3.2.2 Spécificité

Afin d'évaluer la spécificité de la méthode de dosage décrite à la section 4.2.2, il est important de s'assurer que le milieu dans lequel l'orlistat sera dosé n'interfère pas en présentant des signaux au même temps de rétention. Par conséquent, l'HBSS qui sera utilisé dans les tests de perméabilité est analysé avec la méthode de dosage de l'orlistat. Les chromatogrammes d'une solution d'HBSS simple et d'une solution à 0,96  $\mu\text{M}$  d'orlistat sont représentés à la Figure 29. Ils montrent bien que l'HBSS ne présente pas d'interférence dans le dosage de l'orlistat.

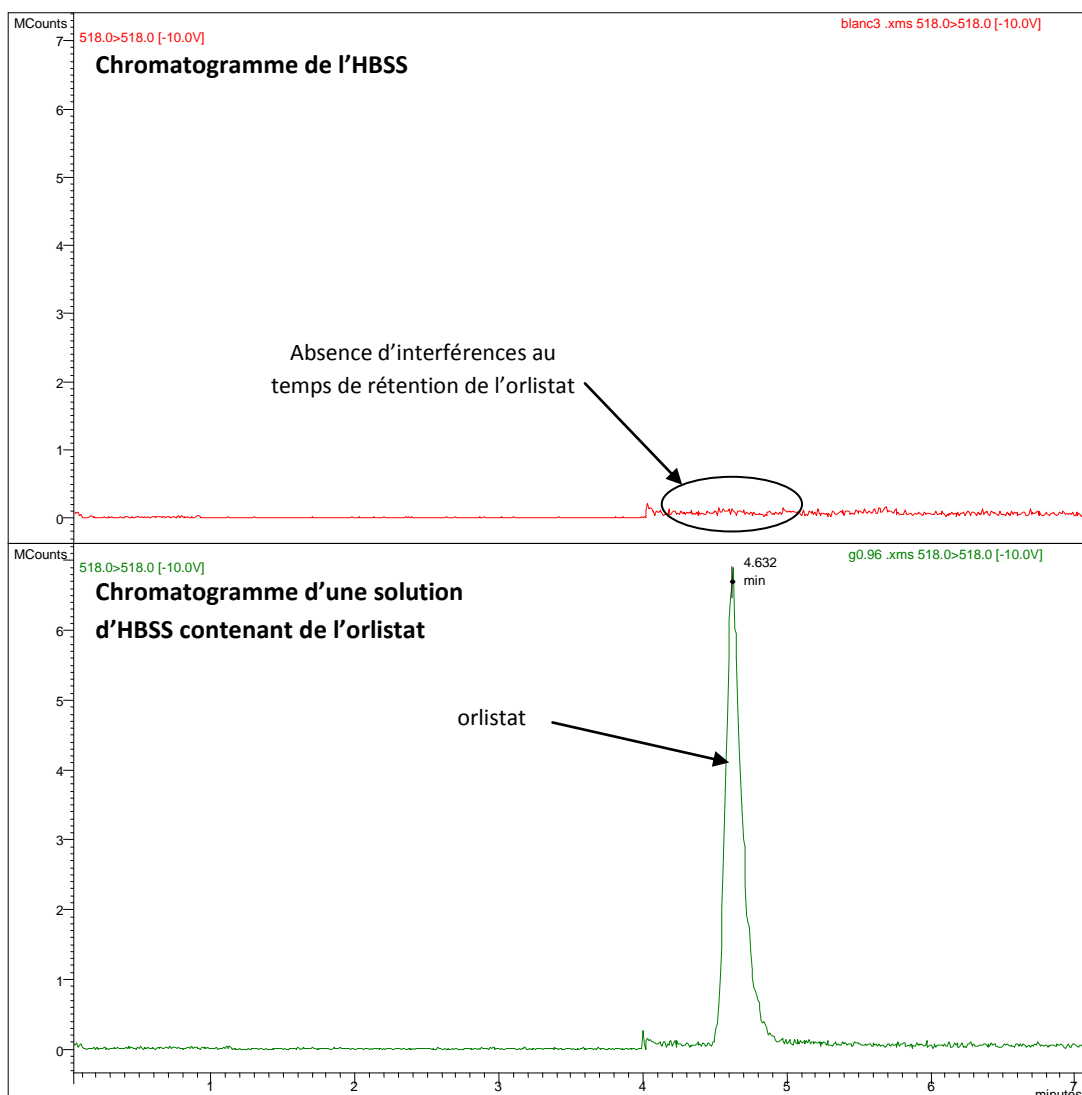


Figure 29 : Chromatogramme de masse de la transition  $m/z$  518  $\rightarrow$   $m/z$  518 d'une solution d'HBSS simple et d'une solution d'HBSS à 0,96  $\mu$ M d'orlistat.

#### 4.3.2.3 Linéarité

La linéarité de la méthode de dosage a été évaluée sur trois jours pendant lesquelles deux gammes différentes d'orlistat ont été analysées par jour. Les différentes solutions de la gamme de référence de l'orlistat ont été réalisées en utilisant du méthanol comme agent solvant. L'autre gamme de solutions est préparée à partir du tampon utilisé lors des études des perméabilités, l'HBSS. Ainsi, chaque jour, deux nouvelles gammes sont préparées et analysées par chromatographie liquide. Les résultats de ces analyses du premier, deuxième et troisième jour sont repris respectivement dans le Tableau 13, le Tableau 14 et le Tableau 15. Les courbes de linéarité correspondantes sont représentées à la Figure 30.

Pour la gamme de référence, la moyenne en pourcentage des concentrations calculées par rapport aux concentrations théoriques en orlistat sur trois jours est de 101,2 % avec un coefficient de

variation de 4,2 %. La droite moyenne obtenue à partir de ces trois séries de résultats a pour équation «  $y = 4,89 \times 10^7 x + 9,19 \times 10^5$  » avec  $R^2 = 0,999$ . Quant à la gamme préparée à partir d'HBSS, la moyenne des pourcentages est de 102,3 % avec un coefficient de variation de 4,5 %. La droite moyenne obtenue à partir de ces trois séries de résultats a pour équation «  $y = 4,86 \times 10^7 x + 1,13 \times 10^6$  » avec  $R^2 = 0,999$ .

Les tests statistiques utilisés au cours l'étude de la linéarité dans notre méthode de dosage sont représentés dans le Tableau 16. Toutes les droites d'étalonnage présentées à la Figure 30 sont linéaires avec un coefficient de corrélation supérieur ou égal à 0,99. Six tests différents ont été mis en place :

- Le test statistique de comparaison des ordonnées à l'origine avec zéro donne des valeurs inférieures à la valeur théorique autorisée ( $p=0,05$ ) aussi bien pour les solutions de référence que pour les solutions à tester. Ces résultats montrent que les droites d'équation «  $y = 4,89 \times 10^7 x + 9,19 \times 10^5$  » et «  $y = 4,86 \times 10^7 x + 1,13 \times 10^6$  » passent statistiquement par zéro.
- Le test d'homogénéité des variances (Cochran) donne des valeurs de 0,704 pour la référence et de 0,840 pour la solution à tester. Ces valeurs sont légèrement supérieures à la valeur critique qui est de 0,516 ( $p=0,05$ ). Les variations ne sont pas homogènes dans l'ensemble. Elles concernent essentiellement les solutions à faible concentration.
- Pour les deux gammes d'étalonnage, en utilisant un test de Fisher, il est possible de conclure à l'existence d'une pente au risque de 5%.
- Le test de comparaison des pentes des droites d'ajustement démontrent que les deux pentes sont statistiquement similaires. Il en est de même pour le test de comparaison des ordonnées à l'origine. Par conséquent, la présence d'HBSS n'a pas d'influence sur le dosage de l'orlistat.

En conséquence, la méthode mise au point pour le dosage de l'orlistat est linéaire, malgré l'hétérogénéité des variances observée avec le test de Cochran.

**Tableau 13 : Résultats de l'analyse chromatographique pour l'étude de linéarité du premier jour**

<b>Référence : Gamme 1 préparée avec du méthanol</b>				<b>Gamme 1 préparée avec de l'HBSS</b>				
Concentration théorique (µM)	Surface de pic	Concentration calculée (µM)	%	Concentration théorique (µM)	Surface de pic	Concentration calculée à partir de la référence (µM)	%	
0,019 (S8)	2796000	0,017	90,9	0,020	2848000	0,019	92,9	
0,048 (S7)	4310000	0,050	104,7	0,050	4527000	0,055	109,9	
0,096 (S6)	6651000	0,101	105,1	0,100	6801000	0,104	104,2	
0,192 (S5)	11010000	0,195	101,7	0,200	11320000	0,202	101,0	
0,480 (S4)	23540000	0,467	97,2	0,500	25840000	0,516	103,3	
0,960 (S3)	46500000	0,964	100,4	1,000	47460000	0,985	98,5	
1,920 (S2)	90700000	1,921	100,0	2,000	92900000	1,968	98,4	
4,800 (S1)	230400000	4,946	103,0	5,000	241090000	5,18	103,5	
			<b>Moyenne</b>				<b>Moyenne</b>	<b>101,2</b>
			<b>Ecart-type</b>				<b>Ecart-type</b>	<b>5,4</b>
			<b>Coefficient de variation (%)</b>				<b>Coefficient de variation (%)</b>	<b>5,3</b>

**Tableau 14 : Résultats de l'analyse chromatographique pour l'étude de linéarité du deuxième jour**

<b>Référence : Gamme 2 préparée avec du méthanol</b>				<b>Gamme 2 préparée avec de l'HBSS</b>				
Concentration théorique (µM)	Surface de pic	Concentration calculée (µM)	%	Concentration théorique (µM)	Surface de pic	Concentration calculée à partir de la référence (µM)	%	
0,021 (S8)	2186000	0,021	102,1	0,019	2217000	0,022	112,8	
0,052 (S7)	3607000	0,050	96,6	0,048	3610000	0,050	103,8	
0,103 (S6)	6302000	0,104	101,2	0,096	6194000	0,102	106,3	
0,206 (S5)	11920000	0,218	105,7	0,192	11080000	0,201	104,6	
0,515 (S4)	26170000	0,506	98,2	0,480	24850000	0,479	99,8	
1,030 (S3)	51760000	1,023	99,3	0,960	48100000	0,949	98,9	
2,060 (S2)	103300000	2,065	100,2	1,920	94950000	1,896	98,7	
5,150 (S1)	255500000	5,141	99,8	4,800	245000000	4,929	102,7	
			<b>Moyenne</b>				<b>Moyenne</b>	<b>103,5</b>
			<b>Ecart-type</b>				<b>Ecart-type</b>	<b>5,1</b>
			<b>Coefficient de variation (%)</b>				<b>Coefficient de variation (%)</b>	<b>4,9</b>

**Tableau 15 : Résultats de l'analyse chromatographique pour l'étude de linéarité du troisième jour**

<b>Référence : Gamme 3 préparée avec du méthanol</b>				<b>Gamme 3 préparée avec de l'HBSS</b>				
Concentration théorique (µM)	Surface de pic	Concentration calculée (µM)	%	Concentration théorique (µM)	Surface de pic	Concentration calculée à partir de la référence (µM)	%	
0,023 (S8)	2218000	0,025	109,2	0,024	2286000	0,026	107,8	
0,057 (S7)	3980000	0,061	108,3	0,061	4142000	0,065	106,6	
0,113 (S6)	6790000	0,119	105,6	0,121	7052000	0,125	103,1	
0,226 (S5)	12080000	0,229	101,3	0,242	12710000	0,242	100,0	
0,565 (S4)	28150000	0,562	99,4	0,605	30470000	0,610	100,8	
1,130 (S3)	54380000	1,105	97,8	1,210	57980000	1,179	97,5	
2,260 (S2)	110800000	2,273	100,6	2,420	118100000	2,424	100,2	
5,650 (S1)	281400000	5,805	102,7	6,050	291100000	6,006	99,3	
			<b>Moyenne</b>				<b>Moyenne</b>	<b>102,3</b>
			<b>Ecart-type</b>				<b>Ecart-type</b>	<b>3,8</b>
			<b>Coefficient de variation (%)</b>				<b>Coefficient de variation (%)</b>	<b>3,7</b>

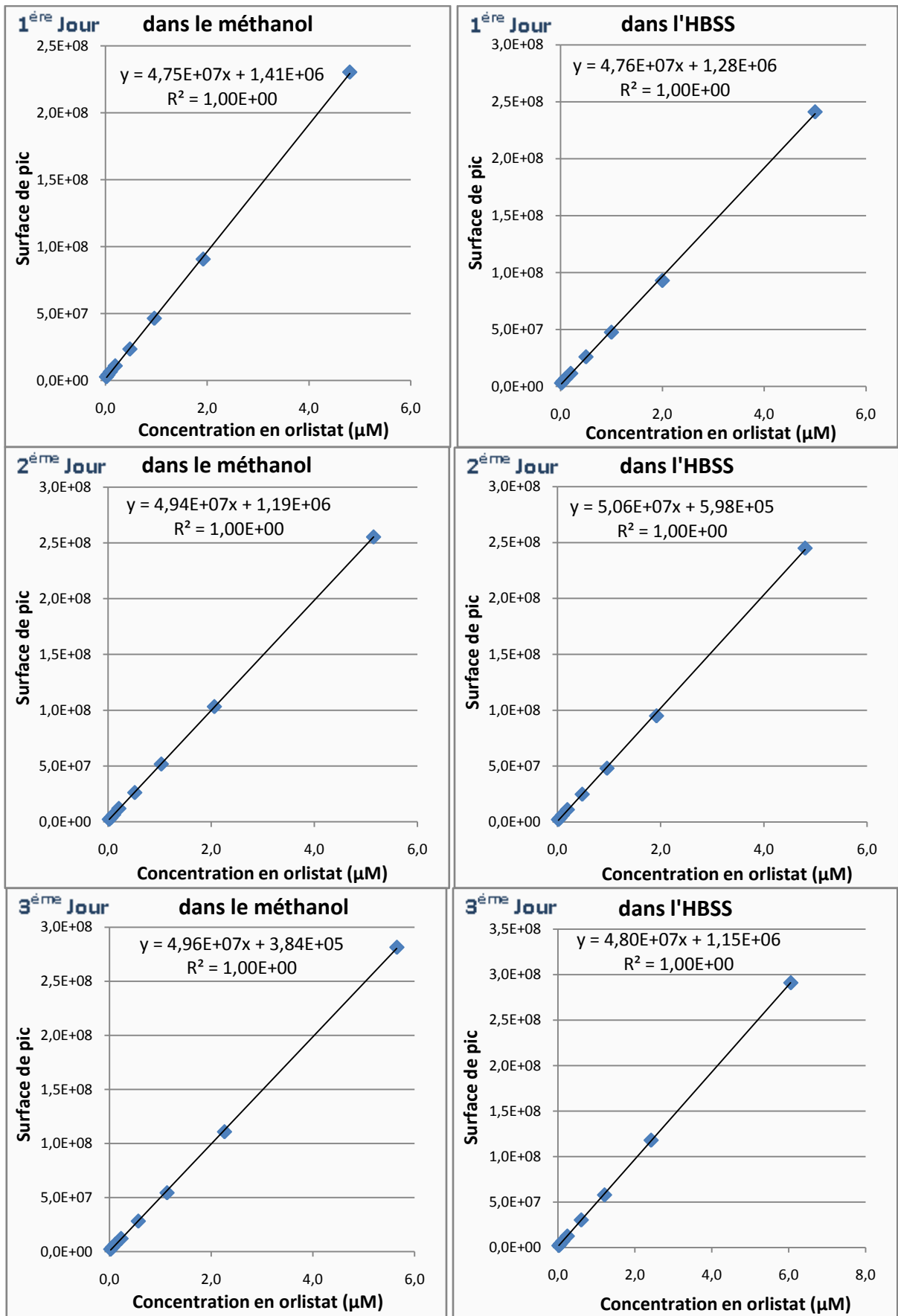


Figure 30 : Courbes de linéarité obtenues sur les trois jours de solutions d'orlistat préparées à partir de méthanol ou d'HBSS

Tableau 16 : Tests statistiques utilisés dans la détermination de la linéarité de la méthode de dosage

	Référence : préparation de la gamme dans du méthanol	Solutions à tester : préparation de la gamme dans de l'HBSS	Valeur théorique, au risque de 5 %
Pente des droites d'ajustement	48939974	48560079	-
Ordonnée à l'origine des droites d'ajustement	919399	1134148	-
Coefficient de corrélation	1,000	0,999	
<b>Test de comparaiosn des ordonnées à l'origine par rapport à zéro</b>	1,902	1,599	2,069
<b>Test d'homogénéité des variances (Cochran)</b>	<b>0,704</b>	<b>0,840</b>	0,516
<b>Test de l'existence des pentes (Fisher)</b>	616	406	4,35
<b>Test de comparaison des ordonnées à l'origine</b>		0,250	2,069
<b>Test de comparaison des pentes des droites d'ajustement</b>		0,910	2,069

#### 4.3.2.4 Fidélité

La fidélité de la méthode de dosage proposée a été déterminée à partir d'une solution d'HBSS contenant de l'orlistat. Six analyses consécutives sont réalisées par jour pendant trois jours. Les concentrations calculées ont été déterminées à partir de la solution S5 de la gamme d'étalonnage. Le Tableau 17 représente les résultats de ces analyses.

Tableau 17 : Résultats de l'analyse chromatographique pour l'étude de fidélité

	Essai	Surface de pic	Concentration calculée (µM)
<b>1<sup>er</sup> jour</b> <b>Concentration</b> <b>théorique : 0,200 µM</b>	1	11510000	0,201
	2	11690000	0,204
	3	11320000	0,197
	4	11510000	0,201
	5	11660000	0,203
	6	11690000	0,204
<b>2<sup>ème</sup> jour</b> <b>Concentration</b> <b>théorique : 0,192 µM</b>	1	11480000	0,198
	2	11500000	0,199
	3	11520000	0,199
	4	11370000	0,196
	5	11400000	0,197
	6	11480000	0,198
<b>3<sup>ème</sup> jour</b> <b>Concentration</b> <b>théorique : 0,242 µM</b>	1	13010000	0,243
	2	12790000	0,239
	3	12890000	0,241
	4	13060000	0,244
	5	13020000	0,244
	6	13173000	0,246

**Coefficient de variation de répétabilité : 0,98 %**

**Coefficient de variation de reproductibilité : 1,70 %**

Le test d'homogénéité des variances intragroupes (Test de Cochran) a fourni une valeur de 0,54, inférieure à la valeur théorique au risque de 5 % qui est de 0,75. De plus, les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité sont inférieurs à 5 %. Par conséquent, l'ensemble des variances des trois groupes peut être considéré comme homogène.

#### **4.3.2.5 Seuil de détection**

Pour déterminer le seuil de détection de la méthode de dosage, plusieurs solutions très diluées en orlistat ont été analysées. La Figure 31 représente le chromatogramme d'une solution à 0,01 µM d'orlistat. Le seuil de détection de notre méthode est de 5 nM.

Comme le seuil de quantification correspond à  $\frac{10}{3}$  fois le seuil de détection, notre méthode de dosage est capable de doser l'orlistat jusqu'à une concentration d'environ 17 nM.

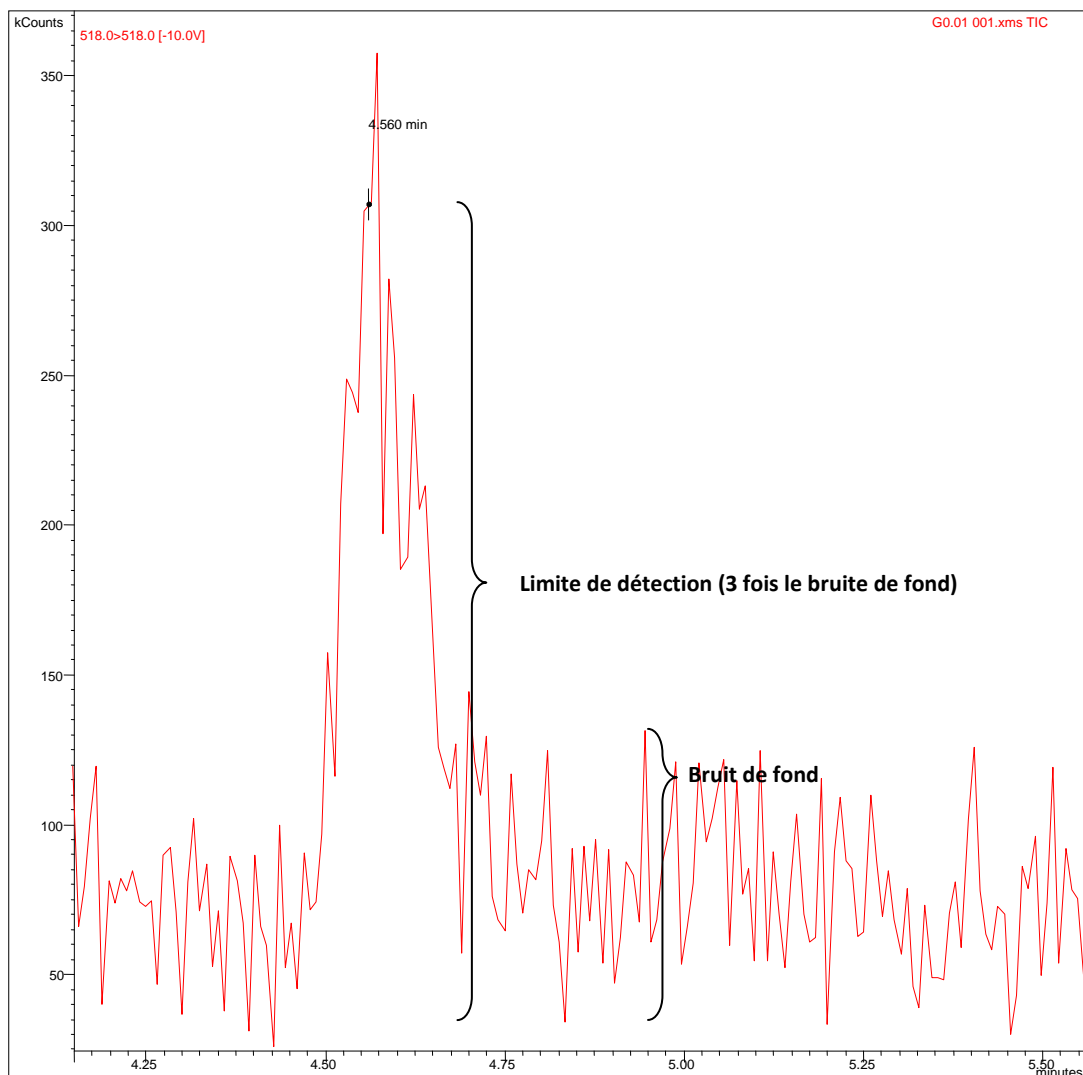


Figure 31 : Pic obtenu lors de l'analyse d'une solution d'HBSS à 0,01  $\mu\text{M}$  d'orlistat.

### 4.3.3 Préparation des solutions à tester

Lors de la préparation des différentes solutions, plusieurs observations ont été faites à l'œil nu :

- La solution formée par le mélange de la formulation L contenant le Labrafil® M1944CS avec la phase aqueuse n'est pas stable. En effet, une séparation de phase apparaît quelques minutes après la fin de l'agitation. Suite à cette observation, les mesures par granulométrie laser n'ont pas été réalisées pour cette formulation.
- Un précipité apparaît lors de l'ajout de la phase aqueuse à la formulation P contenant uniquement du PEG300. Ceci est visible au moment de l'agitation.
- Les formulations A, D, ELP et EL présentent de très mauvaises propriétés de dispersion avec la formation d'un gel visqueux propres aux formes micellaires (voir section 1.3.3).
- Les formulations B et C ont pu se disperser rapidement et de façon homogène dans la phase aqueuse.



Le Tableau 18 décrit les observations macroscopiques des solutions à tester ainsi que le comportement des formulations au moment du contact avec la phase aqueuse.

**Tableau 18 : comportement des formulations au contact de la phase aqueuse**

	<b>Comportement au contact de la phase aqueuse</b>	<b>Apparence macroscopique</b>
<b>Formulation A</b>	Mauvaise dispersion	Légèrement trouble
<b>Formulation B</b>	Bonne dispersion	Translucide
<b>Formulation C</b>	Bonne dispersion	Translucide
<b>Formulation D</b>	Mauvaise dispersion	Translucide
<b>Formulation EL</b>	Mauvaise dispersion	Translucide
<b>Formulation ELP</b>	Mauvaise dispersion	Translucide
<b>Formulation L</b>	Séparation de phase	Apparition de 2 phases troubles
<b>Formulation P</b>	Précipitation	Translucide mais avec présence de précipitation

#### **4.3.4 Perméabilité de l'orlistat au travers de la monocouche de cellules Caco-2**

Pour chaque dispersion étudiée, la concentration en orlistat est de 100µM. La Figure 32 représente sous forme d'histogramme les perméabilités apparentes du principe actif pour chacune des huit formulations.

Dans la solution contrôle, malgré l'ajout de DMSO pour aider à solubiliser l'orlistat, la perméabilité apparente de l'orlistat est nulle. Les formulations aboutissant à la précipitation du principe actif (formulation P) ou à une séparation de phase (formulation L) présentent les mêmes résultats qu'avec la solution contrôle. Cependant, l'utilisation de surfactants seuls (formulations EL et ELP) amène à des résultats plus intéressants avec des perméabilités apparentes allant de 1 à  $2 \times 10^7$  cm.s<sup>-1</sup>. Au final, ce sont les systèmes émulsionnés incorporant au minimum du Labrafil® M1944CS et un surfactant qui présentent les meilleurs résultats. Par contre, les formulations B et C contenant une forte proportion de Cremophor® EL associée à du Labrafil® M1944CS et à un co-solvant, amène à des valeurs de perméabilité apparente de 10 à 20 fois plus importantes que celles des formulations contenant uniquement un surfactant (formulation EL et ELP).

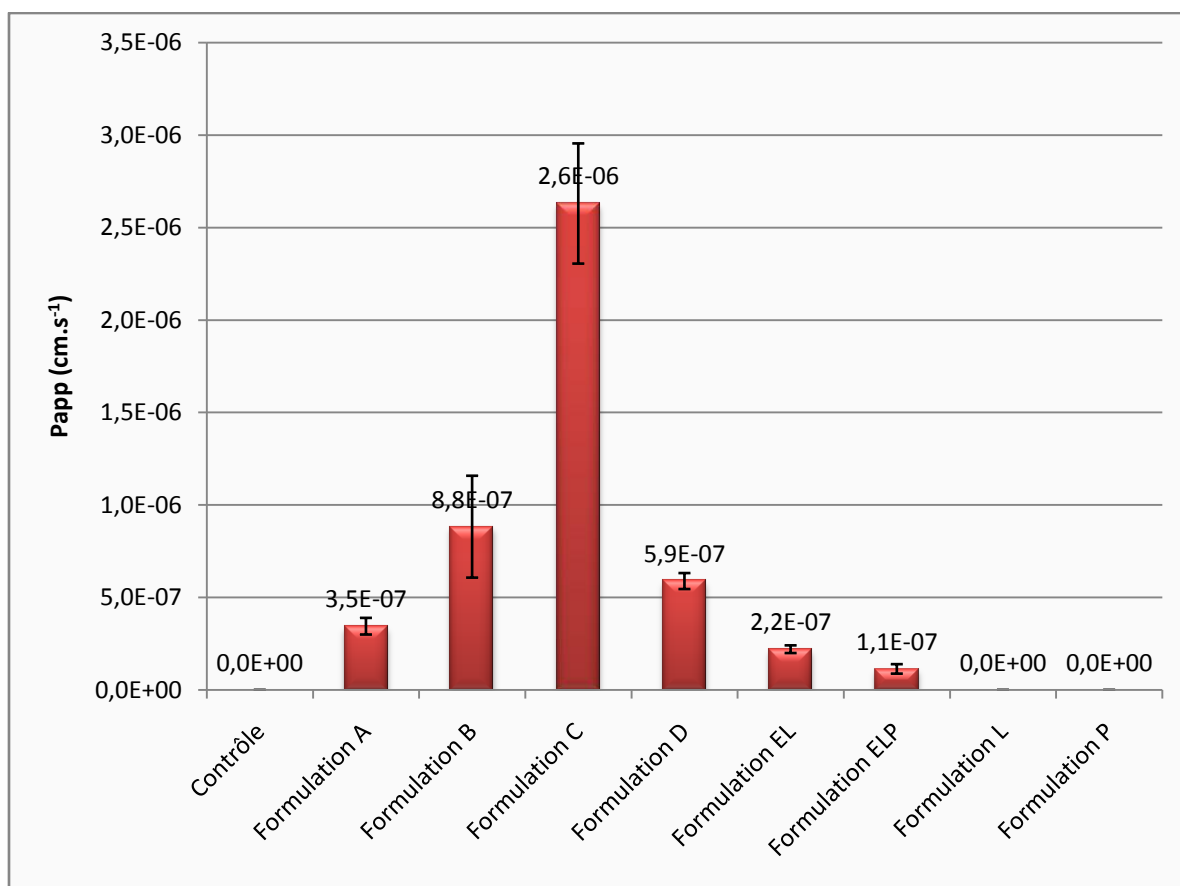


Figure 32 : perméabilités apparentes de l'orlistat au travers de la monocouche de cellules Caco-2 pour les 8 formulations étudiées et la solution contrôle. La concentration en orlistat de chaque solution est de 100  $\mu$ M. Les barres représentent des moyennes  $\pm$ écart-type, n=3.

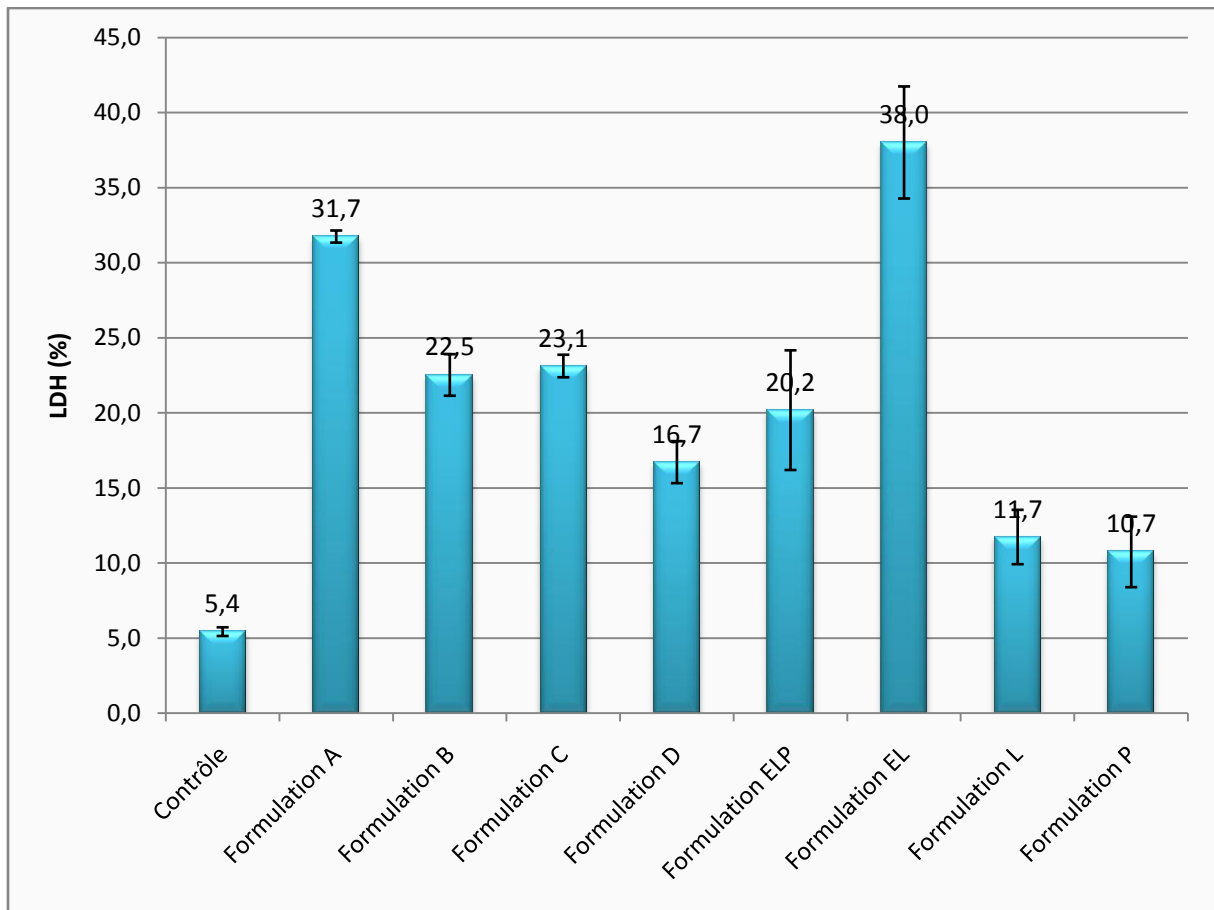
Du point de vue statistique, les formulations A, B, C, D, EL et ELP présentent tous des perméabilités apparentes différentes. Ces perméabilités augmentent dans l'ordre suivant : ELP < EL < A < D < B < C.

#### 4.3.5 Résultats des tests de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité permettent l'apport de données supplémentaires aux résultats de perméabilité et contribuent à la meilleure caractérisation de nos systèmes.

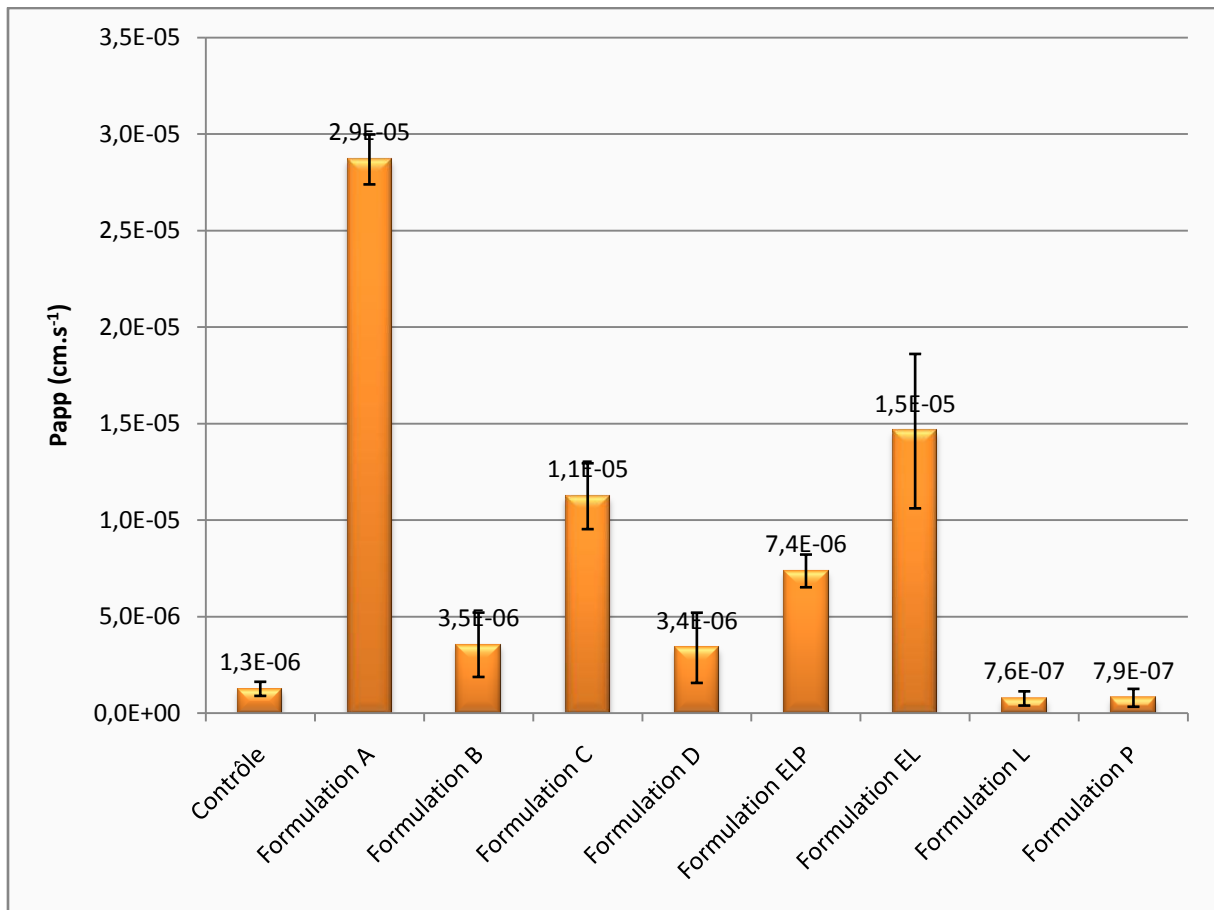
La Figure 33 représente la proportion de LDH libérée au cours de l'étude de perméabilité de l'orlistat. Les résultats obtenus peuvent être classés selon trois groupes :

- Le premier groupe contient uniquement le contrôle qui donne une libération normale de la LDH
- Le deuxième groupe contient les formulations A, B, C, D, EL et ELP. Pour ces derniers, la libération de la LDH est significativement plus importante que celle du contrôle. La concentration en LDH augmente dans l'ordre suivant : D < ELP < B < C < A < EL.
- Le troisième groupe contient les formulations L et P qui présentent une libération de LDH intermédiaire par rapport aux deux autres groupes.



**Figure 33 : Libération de la LDH exprimée en pourcentage par rapport à la quantité maximale relargée lors d'une lyse cellulaire totale. Les barres représentent des moyennes  $\pm$ écart-type, n=3.**

Les résultats de perméabilités apparentes au LY sont représentés sur la Figure 34. La formulation A provoque très nettement une augmentation du passage du LY. Les formulations C et EL qui sont les seules à contenir du Cremophor® EL, présentent des perméabilités apparentes inférieures à celle de la A mais supérieures aux B, D et ELP. Ces dernières formulations contenant du Cremophor® ELP affichent des résultats intermédiaires par rapport à ceux du contrôle et des formulations C et EL. Enfin, les formulations L et P présentent des résultats similaires à ceux du contrôle.



**Figure 34 : perméabilités apparentes du LY au travers de la monocouche de cellules Caco-2 après le test de perméabilité de l'orlistat. La concentration en LY est de 0,04 % (m/v). Les barres représentent des moyennes  $\pm$ écart-type, n=3.**

Toutes les monocouches utilisées ont présenté au début de cette étude un TEER supérieur à  $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , indiquant que leur intégrité n'a pas été altérée. La Figure 35 montre les mesures effectuées après le test de perméabilité du LY (TEER2) ainsi que celles effectuées après l'incubation de 12 heures dans du milieu de culture (TEER3). La valeur du TEER2 est généralement abaissée après une étude de perméabilité. Néanmoins, une augmentation de la valeur du TEER3 marque une récupération de l'intégrité des monocouches et une réversibilité des éventuels dégâts cellulaires.

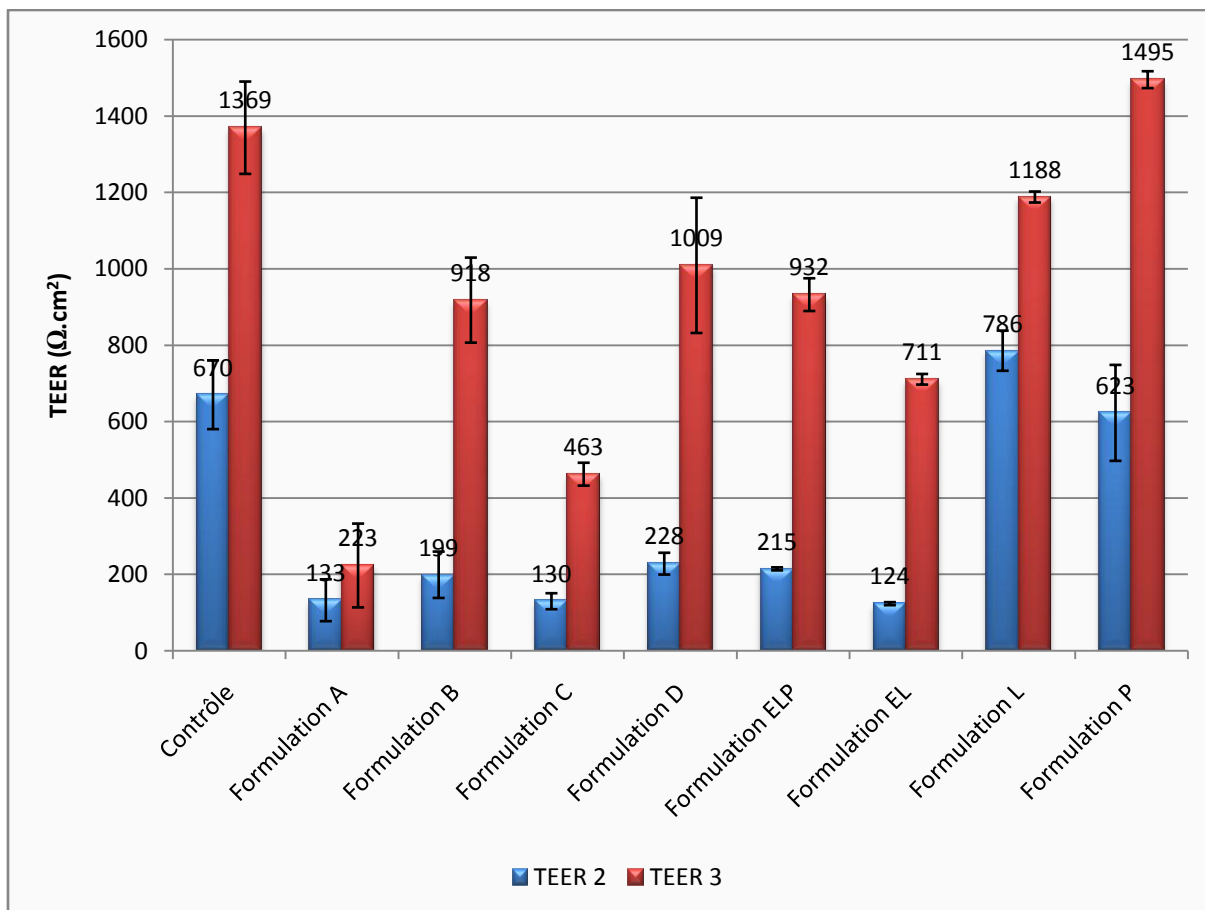


Figure 35 : Valeurs de TEER mesurées après l'étude de perméabilité du LY (TEER2) et valeurs mesurées 12 heures après le TEER2 (TEER3). La concentration en orlistat de chaque solution est de 100  $\mu$ M. Les barres représentent des moyennes  $\pm$ écart-type, n=3.

#### 4.3.6 Granulométrie des entités colloïdales formées

Dans le but de caractériser les émulsions et les micelles formées, une mesure de taille a été réalisée pour les huit formulations contenant de l'orlistat. Le Tableau 19 présente les tailles et les indices de polydispersité mesurés avec les solutions décrites dans la section 4.3.3.

Les formulations C et P présentent les plus mauvais indices de polydispersité avec des valeurs de 0,575 et 0,292 respectivement. Quant aux diamètres des particules, ce sont ceux des formulations A et P qui donnent les plus grandes valeurs avec respectivement 76,9 et 248,1nm. Les formulations EL et ELP contenant uniquement un surfactant permettent la formation d'une population monodisperse de nanoparticules d'environ 12 nm de diamètre.

Tableau 19 : Diamètres et indices de polydispersité des entités colloïdales formées à partir des 7 formulations

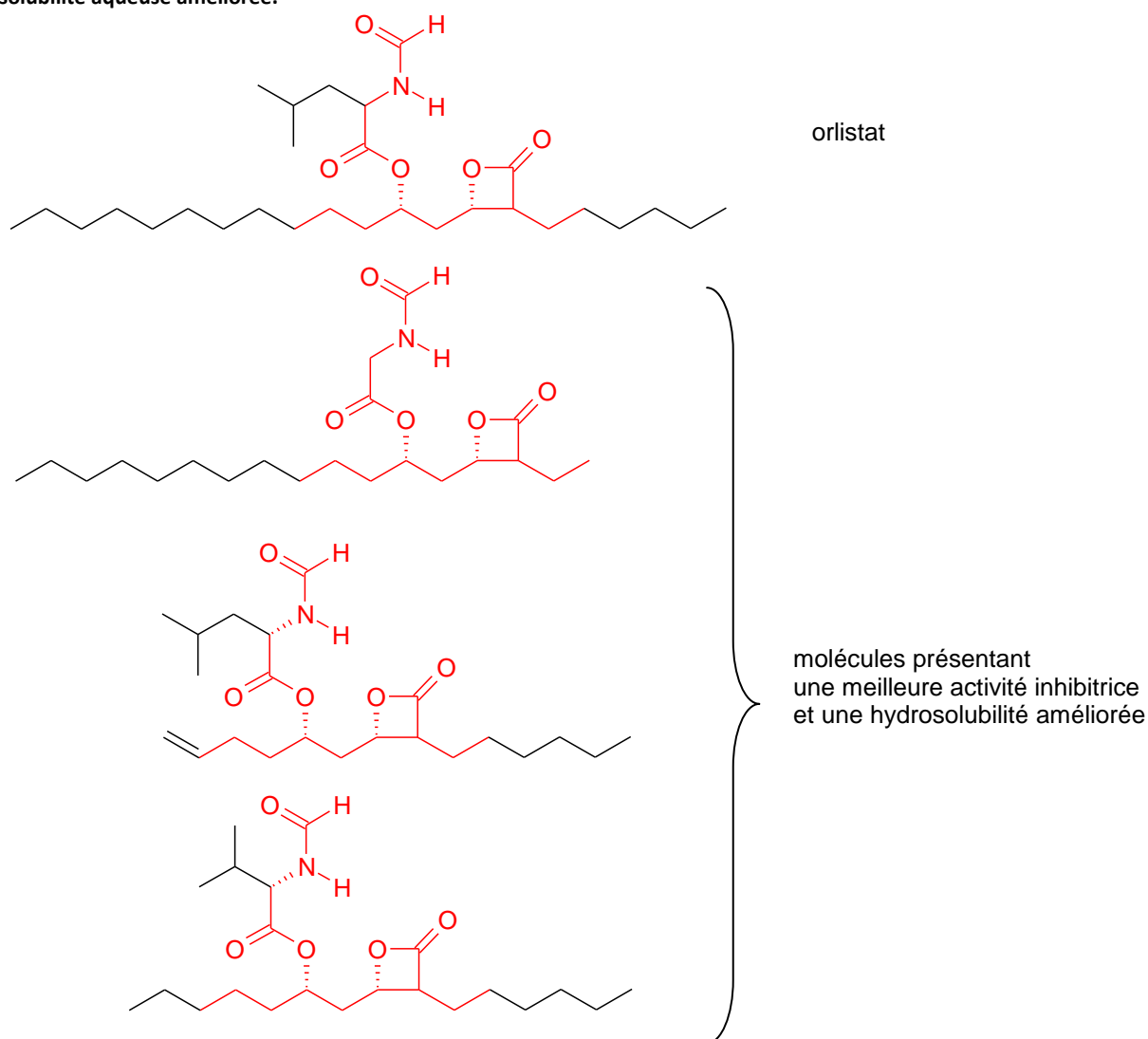
	Diamètre (nm)	Indice de polydispersité
<b>Formulation A</b>	76,9 ± 0,4	0,181
<b>Formulation B</b>	18,0 ± 0,1	0,292
<b>Formulation C</b>	27,9 ± 0,5	0,575
<b>Formulation D</b>	14,9 ± 0,7	0,117
<b>Formulation EL</b>	12,1 ± 0,2	0,019
<b>Formulation ELP</b>	12,0 ± 0,1	0,064
<b>Formulation P</b>	248,1 ± 14,5	0,292

#### 4.4 Discussion

Comme mentionné précédemment, l'orlistat est une substance qui présente des caractéristiques particulières. De par sa forte lipophilie, cette substance traverse difficilement les barrières physiologiques comme la barrière intestinale. Pour son traitement contre l'obésité, la formulation de l'orlistat a été développée de telle façon à ce qu'après administration par voie orale, la molécule reste au niveau du tractus gastro-intestinal pour une activité locale. En tenant compte de la classification biopharmaceutique d'Amidon (section 1.1) [Amidon et al, 1995], l'orlistat peut être considéré comme appartenant à la classe IV BCS de cette classification puisqu'il présente un caractère lipophile prononcé ainsi qu'une faible perméabilité au travers des barrières biologiques (inférieure à 1 % au travers d'une monocouche de cellules Caco-2). En effet, une substance active présente une faible perméabilité si son taux d'absorption par voie orale est inférieur à 50 % [Lindenberg et al, 2004 ; FDA Guidance, 2000]. Cette classe de médicaments présente des problèmes majeurs dans la mise au point de formulations orales destinées à augmenter l'absorption du principe actif. Dans le passé, de nombreuses études visant à améliorer la perméabilité de substances appartenant à la classe II BCS ont été menées [Kovarik et al, 1994 ; Martin-Facklam et al, 2002]. Il est généralement recommandé pour les substances de la classe IV BCS, de revenir à des étapes antérieures de développement afin de modifier les propriétés physicochimiques de la molécule [Pouton et al, 2006]. Néanmoins, l'un des objectifs de cette étude était d'améliorer la solubilité et la perméabilité de l'orlistat.

Notre étude sur l'orlistat a été motivée par la récente découverte de ses propriétés anticancéreuses [Kridel et al, 2004 ; Menendez et al, 2006 ; Little et al, 2007]. Ces mêmes propriétés ont même éveillé l'intérêt de chimistes organiciens pour ce type de molécule. En effet, la synthèse de nouvelles  $\beta$ -lactones inhibitrices de l'AGS en utilisant l'orlistat comme point de départ a été entreprise et a mené à la découverte de trois molécules présentant (Figure 36) une meilleure hydrosolubilité et une activité inhibitrice accrue [Richardson et al, 2008].

Figure 36 : Structure chimique des bêta-lactones présentant une meilleure activité inhibitrice vis-à-vis de l'AGS et une solubilité aqueuse améliorée.



Les travaux que nous avons entrepris sur cette substance ont été pluridisciplinaires et plusieurs laboratoires y ont contribué.

#### 4.4.1 Etudes d'inhibition de croissance

Les études sur les propriétés cancéreuses de l'orlistat ont été menées avec des méthodes et des techniques différentes suivant les laboratoires. Le suivi de l'intégrité du réticulum endoplasmique de fibroblastes de souris et de cellules HT-29 [Little et al, 2007], des expériences d'inhibition de prolifération de cellules tumorales PC-3 d'origine murine [Kridel et al, 2004] et le suivi de la taille de tumeurs greffées sur des souris [Carvalho et al, 2008] ont été notamment réalisés. Ces travaux ont bien démontré l'activité anticancéreuse de l'orlistat mais ils ne fournissent pas de données précises quant à la concentration à laquelle l'orlistat exerce son effet. Avant de commencer toute étude de formulation, nous nous sommes tout d'abord intéressé à déterminer cette concentration.

Les résultats de nos essais d'inhibition de croissance ont permis de déterminer que l'orlistat agit à environ 100  $\mu\text{M}$ . Dans la littérature, l'orlistat testé provient soit directement de chez Sigma-Aldrich soit de l'extraction de gélules de Xénical® provenant des laboratoires Roche. Pour cette raison, nous avons décidé de tester ces deux produits dans la même étude pour évaluer l'impact de leur provenance. Il s'est avéré que le produit issu des laboratoires Roche est plus efficace que le produit Sigma-Aldrich. Cette observation a porté notre attention sur la nature des excipients du Xénical®. Cette spécialité pharmaceutique commercialisée par les laboratoires Roche contient du laurylsulfate de sodium qui est soluble dans le solvant utilisé (éthanol) pour extraire l'orlistat. Il est à noter que cet excipient correspond à un surfactant ionique (CAS#: 151-21-3) qui présente des effets irritants vis-à-vis des muqueuses du fait de ses propriétés détergentes. Par conséquent, ces effets peuvent avoir un impact sur la croissance des cellules SW480 et SW620. De plus, il est intéressant de rappeler que le laurylsulfate de sodium, aussi connu sous le nom de dodécylsulfate de sodium, est couramment utilisé en biologie comme agent cytotoxique à une concentration de 1 % (m/v) [Animal Cell Culture, 3<sup>ème</sup> Edition, Chapitre III]. Les quantités utilisées dans les formulations médicamenteuses sont évidemment inférieures (de l'ordre du milligramme) et bien tolérées dans le cadre d'une administration par voie orale [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5<sup>ème</sup> Edition, 687-689]. Ces observations peuvent remettre en question certaines études de cancérogénicité ayant utilisé de l'orlistat extrait de gélules de Xénical®.

Suite à cette étude, l'orlistat a été utilisé à la concentration de 100  $\mu\text{M}$  pour les études de perméabilité et de cytotoxicité.

#### **4.4.2 Validation de la méthode analytique**

La validation de la méthode de dosage est une étape obligatoire afin de pouvoir quantifier de très faibles concentrations d'orlistat. Une étude sur des volontaires sains ayant pris de l'orlistat par voie orale a montré que la molécule ne traverse pas la barrière intestinale. Aucune trace de la substance n'a pu être détectée dans le sang, bien que cette dernière ait été recherchée par des techniques de radioactivité [Zhi et al, 1995]. De telles observations risquent d'être faites lors des tests de perméabilité avec les Caco-2. Par conséquent, cette étape préalable de chimie analytique est nécessaire pour obtenir une méthode présentant un seuil de quantification très bas.

Le choix de la technique s'est porté sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Bien que, lors de nombreuses études de perméabilité avec les Caco-2, les techniques radioactives ont été largement utilisées, elles présentent plusieurs inconvénients comme le problème de gestion de déchets, de sécurité vis-à-vis de l'opérateur et surtout de disponibilité des substances radio-marquées. De nos jours, l'utilisation de la spectrométrie de masse s'est généralisée



et s'est révélée particulièrement bien adaptée aux études de perméabilité. Cette technique présente une meilleure sensibilité par rapport aux détections par absorption UV ou par fluorescence. De plus, l'orlistat absorbe très peu dans l'UV parce qu'il ne présente que peu de systèmes de doubles liaisons conjuguées (Figure 24). Lors de la mise au point de notre méthode d'analyse de dosage, nous avons programmé une ouverture de la vanne automatisée envoyant vers les déchets la première fraction d'éluant chargée en sels. Ceci évite au capillaire de se boucher prématurément et à la source du détecteur de ne pas être contaminée [Wang et al, 2000 ; Van Breemen et al, 2005].

La méthode mise au point est très sensible et présente un seuil de quantification de 0,017 µM soit 8,4 ppb. Le temps de rétention de la molécule étant aussi très court (4,6 minutes), il permet une analyse rapide des échantillons.

#### 4.4.3 Comparaison des différentes formulations

Chacune des formulations étudiées présente des caractéristiques particulières. Elles peuvent être classées en 2 groupes distincts en fonction de leur **composition** :

- Les formulations EL, ELP, L et P avaient pour but d'étudier l'influence d'un excipient seul dans la solubilisation et la perméabilité apparente de l'orlistat. Les formulations EL et ELP étant composées de surfactants, ils aboutissent à la formation de solution micellaire (type IV) après contact avec la phase aqueuse. Par contre, la formulation L contenant un excipient huileux ne permet pas une dispersion stable de particules contenant de l'orlistat. A l'œil nu, le principe actif semble solubilisé mais une séparation de phase apparaît très rapidement lorsque la solution est au repos. La formulation P contient du PEG300 qui agit comme un solvant. A la concentration utilisée, cet excipient ne semble pas permettre une bonne solubilisation du principe actif. Des précipités apparaissent instantanément au moment de l'ajout de la phase aqueuse à la formulation.
- Les formulations A, B, C et D contiennent une phase huileuse (Labrafil® M1944CS) émulsionnée par un surfactant (Cremophor® EL ou ELP). L'incorporation d'un co-solvant dans la formulation permet d'améliorer la dispersion de la formulation dans une phase aqueuse. La formulation A contient une forte proportion de phase huileuse et une plus faible proportion de Cremophor® ELP. Aucun co-solvant n'a été utilisé dans la mise au point de cette formulation. Elle avait pour but d'étudier l'impact d'une forte proportion d'huile sur la solubilisation et la perméabilité de l'orlistat. Les formulations B et C sont très semblables entre elles. Elles contiennent toutes la même proportion de PEG300, d'huile et de surfactants. La seule différence réside dans la nature du surfactant. Le Cremophor® ELP est utilisé pour la formulation B et le Cremophor® EL pour la formulation C. Les Cremophor® ELP

et EL ne diffèrent que par leur pureté. Le Cremophor® EL est produit suite à la réaction d'estérification de l'huile de ricin avec du PEG dans un rapport molaire de 1 : 35. A l'issue de cette réaction, se forment principalement des dérivés d'huile de ricin polyoxyéthylénés. Le Cremophor® EL contient également des réactifs en excès comme du PEG et des produits secondaires qui sont d'ailleurs recherchés lors du contrôle qualité du produit fini. Ces produits secondaires correspondent principalement à des acides gras libres comme l'acide ricinoléique, l'acide palmitique et l'acide oléique. Par contre, le Cremophor® ELP contient moins de ces produits de réactions secondaires [Informations techniques BASF]. Par conséquent, les deux systèmes, l'un contenant du Cremophor® EL et l'autre du Cremophor® ELP, permettent d'étudier l'influence de la pureté des excipients sur la perméabilité de l'orlistat au travers de monocouches de cellules Caco-2. Enfin, la formulation D se compose de la même proportion en surfactants et en excipients huileux que la formulation B mais elle ne contient pas de PEG300. Elle permet d'évaluer le rôle du co-solvant dans la perméabilité de l'orlistat.

Les formulations lipidiques A, B, C, D, EL et ELP ont permis d'augmenter significativement la **perméabilité apparente** de l'orlistat en comparaison avec la solution contrôle où cette molécule n'a été formulée avec aucun promoteur d'absorption. Toutefois, les résultats sont très variables d'une formulation à l'autre. Ceci permet de faire un certain nombre d'observations :

- Les **formulations EL et ELP** permettent à l'orlistat de traverser la barrière constituée de cellules Caco-2. Ces formulations forment des solutions translucides (Tableau 18) dans lesquelles les Cremophor® EL et ELP solubilisent l'orlistat au sein de micelles. Leur inconvénient majeur est la lenteur de leur dispersion dans un milieu aqueux. Comme mentionné précédemment (voir section 1.3.3), ce type de systèmes forme à la surface des surfactants en cours de dissolution, un gel visqueux qui limite la pénétration de l'eau dans la masse de surfactant. Ces phénomènes rencontrés avec des formulations riches en surfactants réduisent leur pouvoir de dispersion et de dissolution [Gursoy et al, 2004 ; Cuiné et al, 2008]. L'utilisation de surfactants suffirait amplement à la solubilisation de l'orlistat mais des difficultés à obtenir une dispersion rapide persistent. De plus, malgré la formation de solutions translucides et monodisperses, nos résultats de perméabilité montrent que ces formulations présentent un intérêt limité quant à l'augmentation du passage de l'orlistat. Ceci est en accord avec des données de la littérature stipulant que l'utilisation de surfactants seuls ne permet pas d'obtenir une bonne biodisponibilité par voie orale. Pourtant, de telles difficultés de dispersion peuvent être surmontées par l'association d'un co-solvant [Cuiné et al, 2008].

- Parmi les formulations A, B, C et D contenant plusieurs excipients, la **formulation A** présente statistiquement la plus faible perméabilité. Ceci permet de déduire que l'utilisation d'une forte proportion d'huile n'est pas en faveur d'un meilleur passage du principe actif. Par contre, les formulations B, C et D présentent une perméabilité plus élevée. Ce résultat peut s'expliquer par l'emploi d'une proportion plus importante en surfactants puisque cette dernière constitue la principale différence avec la formulation A. Toutefois, cette formulation provoque la plus forte augmentation pour la libération de LDH et pour la perméabilité au LY signifiant que l'intégrité de la membrane cellulaire et des jonctions serrées ont été altérées. Malgré ces dégâts pouvant provoquer une augmentation du passage de l'orlistat, peu de principes actifs se sont retrouvés du côté basolatéral. Ce phénomène pourrait s'expliquer par des problèmes de solubilisation de l'orlistat. Comme mentionnée précédemment (Tableau 18), la solution issue de la formulation A apparaît légèrement trouble. Ceci pourrait s'expliquer par la faible proportion de surfactants qu'elle contient par rapport au Labrafil® M1944CS. Ces observations suggèrent que l'orlistat aurait plus tendance à se solubiliser en s'insérant entre les groupements lipophiles des surfactants qu'en étant dissout directement dans une grande quantité d'huile. En effet, il a été décrit que des molécules comme les prodrogues lipophiles contenant une longue chaîne aliphatique pourraient grâce à leur caractère amphiphile s'insérer entre les groupements lipophiles des surfactants au lieu de se dissoudre directement dans l'huile [Porter et al, 2007].
- Les **formulations B et C** ne diffèrent que par la nature du surfactant (Tableau 12). La formulation C contient du Cremophor® EL, alors que la B contient du Cremophor® ELP, une forme plus pure du Cremophor® EL. Les produits secondaires et les réactifs en excès présents dans le Cremophor® EL jouent très probablement un rôle important dans la formulation de l'orlistat. En effet, la formulation contenant du Cremophor® EL (C) permet l'obtention d'une perméabilité apparente environ 3 fois plus élevée que celle contenant du Cremophor® ELP (B). Du point de vue cytotoxique, la formulation C provoque par rapport à la B une augmentation plus importante de la perméabilité au LY, tandis que la libération de LDH reste très similaire. Cette perméabilité paracellulaire accrue pourrait expliquer l'augmentation de la perméabilité de l'orlistat. Les impuretés contenues dans le Cremophor® EL pourraient être impliquées dans cette augmentation en affectant les jonctions serrées liant les cellules entre elles. Ces impuretés correspondent principalement à des acides gras libres comme l'acide palmitique, oléique et ricinoléique. Or, certains acides gras à chaînes courtes, comme le caprate de sodium, sont connus pour agir sur les jonctions serrées [Anderberg et al, 1993]. Une augmentation de ce type de passage est très probablement responsable de la perméabilité accrue de l'orlistat

- Les résultats des tests de **cytotoxicité** ont montré que la formulation A exerce le plus de dommages au niveau de la membrane cellulaire et des jonctions serrées. Ces effets peuvent s'expliquer à l'aide des études de cytotoxicité menées préalablement avec les excipients seuls (voir section 3.4). La formulation A est composée de 70 % de Labrafil® M1944CS qui, à la concentration utilisée, peut entraîner des atteintes au niveau des jonctions serrées. En accord avec les résultats de cette étude précédente, la formulation A entraîne une forte augmentation de la perméabilité au LY qui est d'environ 2 à 8 fois supérieure à celles des formulations B, C, D, EL et ELP. Les comparaisons des résultats de cytotoxicité entre les formulations EL et ELP et entre les formulations B et C permettent aussi de confirmer les propriétés cytotoxiques plus élevées du Cremophor® EL par rapport à celles observées en présence de Cremophor® ELP.
- La comparaison des formulations B et D suggère que le **PEG300** n'est pas impliqué dans le passage de l'orlistat au travers de la monocouche cellulaire. La différence entre les deux perméabilités apparentes n'est pas significative. Toutefois, ces deux formulations se distinguent au moment de leur contact avec la solution aqueuse. La formulation B se disperse plus facilement que la formulation D. Cette dernière traverse une courte étape où un gel visqueux se forme. Ces observations concordent avec les données de la littérature [Gao et al, 1998 ; Pouton et al, 2000 ; Gursoy et al, 2004 ; Cuiné et al, 2008] qui stipulent que la présence d'un co-solvant facilite la fine dispersion de la formulation sous faible agitation. Une différence entre ces deux formulations aurait pu être mise en évidence sur des modèles animaux avec lesquels la phase de dispersion est mieux représentée.
- Concernant les perméabilités obtenues avec la **solution contrôle** et les **formulations L et P**, elles sont nulles signifiant qu'aucune trace décelable d'orlistat n'a pu être dosée au niveau du compartiment basolatéral. Pour la formulation P, ce résultat étaye l'hypothèse émise précédemment concernant la précipitation de l'orlistat. De plus, il permet de corroborer les résultats obtenus par Pouton et al. [Pouton et al, 2000] qui rapportent que l'utilisation seule de co-solvant amène à la précipitation du principe actif. Pour la formulation L, il y a de fortes probabilités que l'orlistat ait été dissout dans la phase huileuse restée en surface empêchant sa dispersion dans la phase aqueuse. Ces résultats étaient prévisibles à la suite des observations faites au moment de leur préparation (voir section 4.3.3).

Au final, ces considérations suggèrent que pour améliorer le passage de l'orlistat au travers de cellules de types Caco-2, tout en minimisant les effets cytotoxiques, la formulation idéale devrait contenir une forte proportion de Cremophor® EL. La présence d'un co-solvant est aussi recommandée afin de faciliter la dispersion de cette formulation.

D'après la classification des systèmes lipidiques de Pouton [Pouton et al, 2006] (voir section 1.3.1), il est possible de classer les formulations A, B, C et D à partir de leur composition et de la taille des colloïdes qu'elles forment dans une solution aqueuse. La formulation A se compose de 70 % de Labrafil® M1944CS et de 30 % de surfactants présentant une valeur de HLB supérieure à 12. Cette composition est caractéristique d'une formulation de type IIIA (40 à 80 % d'excipients huileux et 20 à 40 % de surfactants). De plus, dans l'eau, la formulation A forme des colloïdes présentant une taille inférieure à 100 nm (76,9 nm) propre à ce type de système lipidique. Par contre, les formulations B, C et D se composent de 72 % de surfactants et de 10 % de Labrafil® M1944CS. Il est plus difficile de classer ces formulations parce qu'elles présentent des caractéristiques appartenant à la fois aux systèmes de type IIIB et à ceux de type IV. En effet, les formulations de type IV contiennent de 30 à 80 % de surfactants et les formulations de type IIIB contiennent moins de 20 % d'excipient huileux. Cependant, les formulations de types IV se distinguent principalement par l'absence dans leur composition d'excipients huileux. Par conséquent, les formulations B, C et D qui contiennent du Labrafil® M1944CS, se rapprocheraient plutôt des systèmes de type IIIB que des systèmes de type IV. Comme mentionné précédemment (voir section 1.3.1), Pouton et al. [Pouton et al, 2006] assimilent également les systèmes de type IIIA et IIIB à des SMEDDS®. Par conséquent, les quatre formulations étudiées qui forment après dispersion des colloïdes de taille inférieure à 100 nm, correspondent à des SMEDDS®. Quant aux formulations EL et ELP, elles correspondent plutôt à des formulations de type IV et forment des colloïdes de tailles inférieures à 100 nm. Il est intéressant de constater que la meilleure pureté du Cremophor® ELP par rapport au Cremophor® EL permet la formation de colloïdes de plus petites tailles. Malgré une augmentation de la surface de contact consécutive à cette réduction de taille, aucune amélioration du passage de l'orlistat au travers de la monocouche de cellules Caco-2 n'a été observée avec la formulation B. Ces observations renvoient à des considérations faites par Porter (voir section 2.1.1) et stipulant que la performance d'une formulation est très faiblement liée à la taille des colloïdes [Porter et al, 2007]

Dans le cadre de cette étude, nous avons pu montrer que la mise au point de systèmes lipidiques dans la formulation de composés de la classe IV BCS, pouvait augmenter la solubilisation et la perméabilité de ces substances au travers de barrières physiologiques. À l'aide de ces systèmes, plusieurs mécanismes entrent en jeu comme la présentation du principe actif sous sa forme solubilisée ou son maintien sous forme de dispersion moléculaire. Ces phénomènes contribuent à une absorption plus rapide du principe actif permettant une action plus rapide de ce dernier [Porter et al, 2007].

Le développement de telles formulations lipidiques présente un intérêt certain dans les thérapies anticancéreuses et dans l'amélioration de la compliance des patients en fournissant des formes à

administration orale. L'efficacité de l'orlistat en tant qu'agent anticancéreux a déjà été mise en avant dans plusieurs études antérieures [Kridel et al, 2004 ; Menendez et al, 2005 ; Little et al, 2007 ; Carvalho et al, 2008]. Menendez et al l'ont associée au trastuzumab, un anticorps monoclonal indiqué dans le cancer du sein. Leur étude a montré que ces deux médicaments ont un effet *in vitro* synergique sur des cellules ovariennes cancéreuses [Menendez et al, 2006]. Toutefois, d'autres études décrivant de telle association devraient être menées afin de confirmer l'intérêt de l'orlistat dans le domaine des thérapies anticancéreuses.

Ces travaux répondent en fait à une suggestion de Menendez et al qui dès 2005 avaient envisagé de mettre au point une nouvelle formulation orale capable de solutionner les problématiques de biodisponibilité orale que présente l'orlistat [Menendez et al, 2005]. Les formulations mises au point et évaluées lors de nos travaux présentent des perspectives prometteuses dans l'augmentation de la biodisponibilité par voie orale de l'orlistat et pourrait répondre à la suggestion de Menendez. De telles formulations pourraient surtout donner une « seconde application » thérapeutique à un médicament commercialisé depuis plus de 10 ans déjà. Néanmoins, les résultats obtenus lors de ces travaux devraient être complétés par des études *in vivo* chez l'animal afin de confirmer l'efficacité de nos formulations.

## **4.5 Conclusion**

L'ensemble de notre étude a permis de déterminer la concentration effectrice de l'orlistat, de mettre au point sa méthode analytique de dosage et d'étudier une série de formulations à travers des tests de perméabilité, de cytotoxicité et de granulométrie. L'amélioration de la solubilisation et de la perméabilité de l'orlistat, une substance de la classe IV BCS possédant des propriétés anticancéreuses, ont été possible grâce à la mise au point de systèmes lipidiques. Parmi ces derniers, le plus performant correspond à la formulation C, un SMEDDS® composé de Labrafil® MS1944CS, de Cremophor® EL et de PEG300. Cette étude a aussi permis de souligner l'importance de la nature et des proportions d'excipients utilisés dans ces systèmes.

Le développement de systèmes auto-émulsifiants comme les SMEDDS®, peut offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les substances de classe IV BCS en modifiant leur biodisponibilité suite à une administration par voie orale. En effet, ces systèmes peuvent permettre la mise au point de nouvelles formulations destinées à des applications thérapeutiques avec des substances actives déjà commercialisées ou pour le développement de nouvelles entités chimiques.

# CONCLUSION GENERALE

---





Les excipients lipidiques apparaissent comme des substances intéressantes permettant d'améliorer la solubilité, la perméabilité et la biodisponibilité d'un principe actif peu hydrosoluble et/ou présentant une très mauvaise absorption par voie orale. Ils sont souvent issus de l'hémi-synthèse de produits naturels comme cela a été le cas pour le Cremophor® RH40 (issu de l'huile de ricin) ou le Labrafil® M1944CS (issu d'huile de noyau d'abricots). Leur utilisation a été fortement inspirée suite à divers évènements au cours desquels, l'administration de certaines substances actives en association avec un repas riche en matières grasses a provoqué une augmentation de leur concentration sérique. Ces excipients présentent donc un potentiel intéressant en formulation. La recherche et la mise au point d'excipients ayant pour origine des produits alimentaires devrait être encouragées. Par ailleurs, les modifications (estérification, hydrogénation...) apportées à ces produits permettent généralement de rendre les excipients plus stables et de réduire les variabilités inhérentes aux produits d'origine naturelle.

Il y a eu pendant longtemps une préférence pour les formes orales sèches comme les comprimés jusqu'à l'arrivée du Néoral® prouvant l'intérêt des formulations lipidiques. Pour ces formulations, malgré l'importance apportée aux excipients, le choix de leur composition reste le facteur déterminant dans la conception d'un système lipidique performant. Ces systèmes sont apparus comme une solution innovante et efficace pour la formulation de principes actifs lipophiles et/ou présentant une faible biodisponibilité par voie orale.

La première partie de mes travaux a porté sur la mise au point d'un protocole d'étude de la cytotoxicité des excipients hydrosolubles destinés à une administration par voie orale. Elle a permis de montrer que certains excipients présentent des effets indésirables et d'en déterminer les concentrations d'apparitions de ces effets. Malgré le caractère inerte qui leur est généralement attribué, ces excipients peuvent affecter l'intégrité de la membrane plasmique, des jonctions serrées ou l'activité enzymatique cellulaire. En formulation, l'étude de cette cytotoxicité s'avère être une étape essentielle dans la compréhension des mécanismes amenant à une amélioration de la biodisponibilité. Quatre types de tests de cytotoxicité ont été réalisés sur nos formulations : le suivi de la libération de la LDH permettant de connaître l'état de la membrane plasmique ; le MTT indiquant l'état de l'activité métabolique ; enfin, la perméabilité au LY et le TEER renseignant sur l'intégrité des jonctions serrées. Ces essais ont été réalisés à l'aide de la lignée de cellules Caco-2 issue d'un adénocarcinome colique humain. Comme ils sont représentatifs de différents paramètres de viabilité cellulaire, leur utilisation a été adaptée à notre étude de la cytotoxicité. La principale difficulté rencontrée avec notre protocole a été la solubilisation aqueuse de certains excipients. À titre d'exemple, à des concentrations élevées de l'ordre de 100 g/L, le Labrafil® M1944CS ne se

disperse pas de façon homogène dans un milieu aqueux et une séparation de phase apparaît très rapidement.

Les résultats de cette étude ont aussi confirmé que la frontière séparant les effets cytotoxiques des effets promoteurs d'absorption d'un excipient n'est pas toujours claire. En effet, en ayant tenté de mieux comprendre les mécanismes amenant à ces effets, il nous a semblé évident qu'une dégradation de la membrane plasmique ou des jonctions serrées peut améliorer le passage d'un principe actif à travers la barrière intestinale. Mais à partir d'une certaine concentration, ces dommages peuvent entraîner des effets indésirables contrebalançant les effets bénéfiques apportés à la biodisponibilité de la substance active. Par conséquent, une meilleure absorption intestinale consécutive à l'utilisation d'excipients lipidiques peut aussi être associée à l'apparition d'une cytotoxicité plus ou moins importante.

A l'issue de nos études de cytotoxicité, une série d'excipients s'est révélée particulièrement intéressants de par leur innocuité. Le Cremophor® ELP, le Cremophor® RH40 et le Transcutol® P utilisés à une quantité compatible avec une mise en forme en capsule molle ou en gélule, ne provoquent pas de désordres au niveau de la membrane plasmique, des jonctions serrées et sur l'activité métabolique. Par contre, d'autres excipients utilisés depuis de longue date dans certaines spécialités médicamenteuses affectent certaines fonctions cellulaires. A titre d'exemple, le Solutol® HS15 et le polysorbate 80 diminuent significativement l'activité métabolique des cellules à partir de 1g/L.

Connaissant peu les risques que présenteraient les nanoparticules dans le cas d'une administration par voie orale, nos travaux avaient aussi pour but d'étudier l'impact potentiel des nanotechnologies sur la santé humaine. A l'aide de notre protocole d'étude de la cytotoxicité, nous avons pu évaluer l'effet de ces nanoparticules sur différents paramètres de viabilité cellulaire. Il a pu être mis en évidence que les effets cytotoxiques rencontrés étaient soit liés à la composition du système lipidique soit, dans une moindre mesure, à la forte polydispersité des particules formées en solution aqueuse. Au final, nos observations ont montré que les phénomènes de cytotoxicité observés n'étaient pas liés à la taille de ces particules.

L'utilisation d'excipients lipidiques présente de nombreux avantages en formulation. Ils permettent principalement de mieux solubiliser les principes actifs lipophiles et d'améliorer leur biodisponibilité par voie orale en facilitant leur passage au travers de l'épithélium intestinal. Divers mécanismes peuvent être impliqués comme la diminution des phénomènes d'efflux ou de métabolisation pré-systémique. Pour ces raisons, l'utilisation des systèmes lipidiques permet d'apporter des solutions concrètes à des problèmes de faible biodisponibilité par voie orale et ainsi d'améliorer la prise en

charge des patients. Cependant, les propriétés cytotoxiques des excipients utilisés ne doivent pas être négligées au profit de leurs propriétés physicochimiques et biologiques. Ces propriétés cytotoxiques peuvent également fournir d'importantes explications quant à l'amélioration de l'absorption intestinale d'une substance active.

C'est la raison pour laquelle notre protocole d'étude de la cytotoxicité a été appliqué aux formulations élaborées dans la deuxième partie de nos travaux. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à une molécule lipophile présentant de grandes difficultés de perméabilité intestinale, l'orlistat. Initialement développée pour agir localement et limiter l'absorption des matières grasses issues de l'alimentation, cette substance active était destinée à traiter l'obésité. Mais de récentes études ont montré que l'orlistat possède aussi des propriétés anti-tumorales induisant l'apoptose des cellules cancéreuses. Ces observations avaient motivé nos travaux qui ont abouti, dans un premier temps, à la détermination de la dose d'orlistat nécessaire pour observer une activité anticancéreuse. Des essais de croissance sur des cellules SW480 et SW620 ont été entrepris dans ce but. Ces essais ont été suivis par des travaux analytiques qui avaient pour but de mettre au point une méthode de dosage sensible et spécifique de l'orlistat par chromatographie liquide.

Enfin, des essais de perméabilité et de cytotoxicité faisant intervenir des cellules Caco-2 ont été entrepris pour évaluer l'efficacité de nos formulations. A partir des mesures de granulométrie, les six formulations étudiées ont pu être définies comme des SEDDS ou des SMEDDS®. Les opinions divergent quant à l'influence de la taille des entités colloïdales formées à la suite de la dispersion d'une formulation dans un milieu aqueux sur l'efficacité d'une formulation. D'après nos résultats, il n'y a pas de liens entre la taille de ces particules et la performance de la formulation. En effet, parmi nos six systèmes lipidiques, le plus intéressant qui est composé de Cremophor® EL, de Labrafil® M1944CS et de PEG 300 ne génère pas les plus fines particules.

De nombreux aspects restent toutefois à étudier, aussi bien au niveau de l'activité anticancéreuse de l'orlistat, que du devenir *in vivo* de la formulation. En ce qui concerne l'activité anticancéreuse, la majorité des études ont été réalisées *in vitro* sur des modèles cellulaires. Peu d'expérimentations *in vivo* sur l'animal ont été entreprises. Or, elles seraient nécessaires pour vérifier l'étendue de l'activité anti-tumorale de l'orlistat. Dans ce but, il existe des modèles de cancer chimio-induit chez le rat permettant d'apprécier l'étendue de cette activité. En ce qui concerne le devenir *in vivo* de la formulation, ce travail de thèse ne constitue que la première étape dans l'éventuel développement de l'orlistat en tant qu'anticancéreux. Des études pharmacocinétiques plus approfondies de nos formulations devraient être entreprises sur des modèles *in vivo*. Le modèle précédent de cancer chimio-induit chez le rat pourrait aussi être utilisé pour évaluer les paramètres pharmacocinétiques

de nos formulations. Cependant, ce modèle ne permet que l'administration par voie orale de la formulation sous forme dispersée dans une solution aqueuse. Pour étudier l'efficacité des formulations sous forme de gélules, il faudrait envisager l'utilisation d'un modèle de plus grande taille comme le chien. Par conséquent, le recours à des essais *in vivo* constituerait la prochaine étape de ces travaux sur l'orlistat. De plus, la sensibilité de nos formulations à la lipolyse n'a pas été étudiée et sa connaissance peut se révéler très utile puisque l'orlistat, en tant que bon inhibiteur des lipases gastro-intestinales, peut agir sur cette dégradation. Par conséquent, de nombreux travaux sur l'orlistat peuvent encore être entrepris afin de découvrir tous les potentiels de cette substance.

## REFERENCES

1. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*. 1995;12(3):413-420
2. Anderberg EK, Lindmark T, Artursson P. Sodium caprate elicits dilatations in human intestinal tight junctions and enhances drug absorption by the paracellular route. *Pharmaceutical Research*. 1993;10(6):857-864
3. Armand M, Borel P, Pasquier B, Dubois C, Senft M, Andre M, Peyrot J, Salducci J, Lairon D. Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology*. 1996;271(1 PART 1):G184-G191
4. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (CACO-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991;175(3):880-885
5. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;46(1-3):27-43
6. Bai JPF. The involvement of cytosolic chymotrypsin-like, trypsin-like, and cucumisin-like activities in degradation of insulin and insulin-like growth factor I by epithelial tissues. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1995;47(8):674-677
7. Barthe L, Bessouet M, Woodley JF, Houin G. The improved everted gut sac: A simple method to study intestinal P-glycoprotein. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998;173(1-2):255-258
8. BASF Technical Information, Cremophor® EL, BASF SE, Limburgerhof, Germany, June 2008. [http://www.pharmasolutions.basf.com/pdf/Statements/Technical%20Informations/Pharma%20Solutions/EMP%20030711e\\_Cremophor%20EL.pdf](http://www.pharmasolutions.basf.com/pdf/Statements/Technical%20Informations/Pharma%20Solutions/EMP%20030711e_Cremophor%20EL.pdf)
9. BASF Technical Information, Cremophor® ELP, BASF SE, Limburgerhof, Germany, July 2008. [http://www.pharmasolutions.basf.com/pdf/Statements/Technical%20Informations/Pharma%20Solutions/EMP%20030712e\\_Cremophor%20ELP.pdf](http://www.pharmasolutions.basf.com/pdf/Statements/Technical%20Informations/Pharma%20Solutions/EMP%20030712e_Cremophor%20ELP.pdf)
10. Behrens I, Kissel T. Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003;19(5):433-442

11. Behrens I, Kamm W, Dantzig AH, Kissel T. Variation of peptide transporter (PepT1 and HPT1) expression in Caco-2 cells as a function of cell origin. *Journal of Pharmaceutical Science*. 2004;93(7):1743-1754
12. Benet LZ, Cummins CL. The drug efflux–metabolism alliance: biochemical aspects. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;50 Suppl 1:S3-S11.
13. Benet LZ, Cummins CL, Wu CY. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;277(1-2):3-9
14. Benet LZ, Amidon GL, Barends DM, Lennernäs H, Polli JE, Shah VP, Stavchansky SA, Yu LX. The use of BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs. *Pharmaceutical Research*. 2008;25(3):483-488
15. Bernas T, Dobrucki JW. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000;380(1):108-116
16. Bock U, Kolac C, Borchard G, Koch K, Fuchs R, Streichhan P, Lehr CM. Transport of proteolytic enzymes across Caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical Research*. 1998;15(9):1393-1400
17. Bogman K, Zysset Y, Degen L, Hopfgartner G, Gutmann H, Alsenz J, Drewe J. P-glycoprotein and surfactants: Effect on intestinal talinolol absorption. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2005;77(1):24-32
18. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*. 1985;24(2-3):119-124
19. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays: The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in Vitro*. 1988;2(1):1-6
20. Braun A, Hämmerle S, Suda K., Rothen-Rutishauser B, Günthert M, Krämer SD, Wunderli-Allenspach H. Cell cultures as tools in biopharmacy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000;11 Suppl 2:S51-S60
21. Brogård M, Troedsson E, Thuresson K, Ljusberg-Wahren H. A new standardized lipolysis approach for characterization of emulsions and dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007;308(2):500-507
22. Buckingham LE, Balasubramanian M, Emanuele RM, Clodfelter KE, Coon JS. Comparison of solutol HS 15, Cremophor EL and novel ethoxylated fatty acid surfactants as multidrug resistance modification agents. *International Journal of Cancer*. 1995;62(4):436-42.
23. Caliph SM, Charman WN, Porter CJH. Effect of short-, medium-, and long-chain fatty acid-based vehicles on the absolute oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of

- halofantrine and assessment of mass balance in lymph-cannulated and non-cannulated rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000;89(8):1073-1084
24. Carrière V, Lesuffleur T, Barbat A, Rousset M, Dussaulx E, Costet P, De Waziers I, Beaune P, Zweibaum A. Expression of Cytochrome P-450 in HT29-MTX cells and Caco-2 clone TC7. *FEBS Letters*. 1994;355:247-250
  25. Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel ALCA, Veiga SS, Raposo H, Oliveira HCF, Loda M, Coletta RD, Graner E. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *International Journal of Cancer*. 2008;123(11):2557-2565
  26. Chan LMS, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;21(1):25-51
  27. Collnot EM, Baldes C, Wempe MF, Hyatt J, Navarro L, Edgar KJ, Schaefer UF, Lehr CM. Influence of vitamin E TPGS poly(ethylene glycol) chain length on apical efflux transporters in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Controlled Release*. 2006;111(1-2):35-40
  28. Collnot EM, Baldes C, Wempe MF, Kappl R, Huttermann J, Hyatt JA, Edgar KJ, Schaefer UF, Lehr CM. Mechanism of Inhibition of P-Glycoprotein Mediated Efflux by Vitamin E TPGS: Influence on ATPase Activity and Membrane Fluidity. *Molecular Pharmaceutics*. 2007;4(3):465-474
  29. Constantinides PP. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharmaceutical Research*. 1995;12(11):1561-72
  30. Constantinides PP, Han J, Davis SS. Advances in the use of tocals as drug delivery vehicles. *Pharmaceutical Research*. 2006;23(2):243-255
  31. Cornaire G, Woodley JF, Saivin S, Legendre J-Y, Decourt S, Cloarec A, Houin G. Effect of polyoxyl 35 castor oil and Polysorbate 80 on the intestinal absorption of digoxin in vitro. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*. 2000;50(6):576-579
  32. Cornaire G, Woodley J, Hermann P, Cloarec A, Arellano C, Houin G. Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates in vitro and in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;278:119-131
  33. Cui S, Zhao C, Chen D, He Z. Self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS®) for improving in vitro dissolution and oral absorption of Pueraria lobata isoflavone. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2005;31(4-5):349-356
  34. Cui JF, Mcevoy CL, Charman WN, Pouton CW, Edwards GA, Benameur H, Porter CJH. Evaluation of the impact of surfactant digestion on the bioavailability of danazol after oral

- administration of lipidic self-emulsifying formulations to dogs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(2):995-1012
35. Cummins CL, Mangravite LM, Benet LZ. Characterizing the expression of CYP3A4 and efflux transporters (P-gp, MRP1, and MRP2) in CYP3A4-transfected Caco-2 cells after induction with sodium butyrate and the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Pharmaceutical Research*. 2001;18(8):1102-1109
  36. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Frendo JL, Zhiri A, Li-Khuan R, Tricottet V, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Short term Caco-2/TC7 cell culture: comparison between conventional 21-d and a commercially available 3-d system. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2004;27(12):1986-1992
  37. Dahan A, Hoffman A. Use of a dynamic in vitro lipolysis model to rationalize oral formulation development for poor water soluble drugs: correlation with in vivo data and the relationship to intra-enterocyte processes in rats. *Pharmaceutical Research*. 2006;23(9):2165-2174
  38. Dahan A, Hoffman A. The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: The ability of in vitro lipolysis and consecutive ex vivo intestinal permeability data to predict in vivo bioavailability in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;67(1):96-105
  39. Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the Caco-2 model. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 1997;14(3):221-286
  40. Douroumis D, Fahr A. Nano- and micro-particulate formulations of poorly water-soluble drugs by using a novel optimized technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;63(2):173-175
  41. Dressman JB, Reppas C. In vitro–in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000;11(1002):S73-S80
  42. Duizer E, Van Der Wulp C, Versantvoort CHM, Groten JP. Absorption enhancement, structural changes in tight junctions and cytotoxicity caused by palmitoyl carnitine in Caco-2 and IEC-18 cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1998;287(1):395-402
  43. Ekelund K, Osth K, Pålhlstorp C, Björk E, Ulvenlund S, Johansson F. Correlation between epithelial toxicity and surfactant structure as derived from the effects of polyethyleneoxide surfactants on caco-2 cell monolayers and pig nasal mucosa. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005 Apr;94(4):730-744
  44. Embleton JK, Pouton CW. Structure and function of gastro-intestinal lipases. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997;25(1):15-32



45. Endres CJ, Hsiao P, Chung FS, Unadkat JD. The role of transporters in drug interactions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;27(5):501-517
46. Englund G, Rorsman F, Rönnblom A, Karlbom U, Lazorova L, Gråsjö J, Kindmark A, Artursson P. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;29(3-4):269-277
47. FDA Guidance for industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, Food and drug administration, Baltimore, MD, USA, 2000. <http://www.fda.gov/cder/guidance/3618fnl.htm>.
48. Fei Y-J, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF, Hediger MA. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*. 1994;368(6471):563-566
49. Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. Occludin: structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(6):883-917
50. Fernandez S, Jannin V, Rodier J-D, Ritter N, Mahler B, Carrière F. Comparative study on digestive lipase activities on the self emulsifying excipient Labrasol®, medium chain glycerides and PEG esters. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007;1771(5):633-640
51. Finter NB. Dye Uptake Methods for Assessing Viral Cytopathogenicity and their Application to Interferon Assays. *Journal of General Virology*. 1969;5:419-427
52. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. 2006;160(2):171-177
53. Galetin A, Houston JB. Intestinal and hepatic metabolic activity of five cytochrome P450 enzymes: Impact on prediction of first-pass metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;318(3):1220-1229
54. Gao Z-G, Choi H-G, Shin H-J, Park K-M, Lim S-J, Hwang K-J, Kim C-K. Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for oral delivery of Cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998;161:75-86
55. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer*. 2001;37(13):1590-1598

56. Gershanik T, Benita S. Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000;50:179-188
57. Goddeeris C, Coacci J, Van den Mooter G. Correlation between digestion of the lipid phase of sedds and release of the anti-HIV drug UC 781 and the anti-mycotic drug enilconazole from sedds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;66(2):173-181
58. Gonzalez RJ, Tarloff JB. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicology in Vitro*. 2001;15(3):257-259
59. Grove M, Pedersen GP, Nielsen JL, Müllertz A. Bioavailability of seocalcitol I: Relating solubility in biorelevant media with oral bioavailability in rats - Effect of medium and long chain triglycerides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005;94(8):1830-1838
60. Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2004;58:173-182
61. Gutmann H, Hruz P, Zimmermann C, Beglinger C, Drewe J. Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochemical Pharmacology*. 2005;70(5):695-699
62. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro*. 2004;18(5):703-710
63. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*. 1989;119(2):203-210
64. Hauss DJ. Oral lipid-based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(7):667-676
65. Hidalgo IJ. Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2001;1(5):385-401
66. Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh CG, Lipka E, Amidon GL, Langguth P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000;89(1):63-75
67. Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research*. 1990;7(9):902-910
68. Hirama S, Tatsuishi T, Iwase K, Nakao H, Umebayashi C, Nishizaki Y, Kobayashi M, Ishida S, Okano Y, Oyama Y. Flow-cytometric analysis on adverse effects of polysorbate 80 in rat thymocytes. *Toxicology*. 2004;199(2-3):137-143

69. Ho ES, Lin DC, Mendel DB, Cihlar T. Cytotoxicity of antiviral nucleotides adefovir and cidofovir is induced by the expression of human renal organic anion transporter 1. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2000;11(3):383-393
70. Holst CM, Oredsson SM. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*. 2005;19(3):379-387
71. Hong J-Y, Kim J-K, Song Y-K, Park J-S, Kim C-K. A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption. *Journal of Controlled Release*. 2006;110(2):332-338
72. Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*. 2007;2(9):2111-2119
73. Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, Grove JR. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999;88(1):28-33
74. Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54(5):759-779
75. Kabanov AV, Batrakova EV, Miller DW. Pluronic® block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55(1):151-164
76. Kapitza SB, Michel BR, van Hoogevest P, Leigh ML, Imanidis G. Absorption of poorly water soluble drugs subject to apical efflux using phospholipids as solubilizers in the Caco-2 cell model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;66(1):146-158
77. Kapus A, Szaszi K. Coupling between apical and paracellular transport processes. *Biochemistry and Cell Biology*. 2006;84(6):870-880
78. Kaukonen AM, Boyd BJ, Porter CJ, Charman WN. Drug solubilization behavior during in vitro digestion of simple triglyceride lipid solution formulations. *Pharmaceutical Research*. 2004;21(2):245-253
79. Koga K, Ohyashiki T, Murakami M, Kawashima S. Modification of ceftibuten transport by the addition of non-ionic surfactants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000;49(1):17-25
80. Koga K, Kawashima S, Murakami M. In vitro and in situ evidence for the contribution of Labrasol® and Gelucire 44/14 on transport of cephalixin and cefoperazone by rat intestine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2002;54(3):311-318

81. Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004;3(8):711-715
82. Konishi Y, Hagiwara K, Shimizu M. Transepithelial Transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers and use of such transport in in vitro evaluation of phenolic acid availability. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2002;66(11):2449-2457
83. Konsoula R, Barile FA. Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. *Toxicology in Vitro*. 2005;19(5):675-684
84. Kossena GA, Charman WN, Boyd BJ, Dunstan DE, Porter CJH. Probing Drug Solubilization Patterns in the Gastrointestinal Tract after Administration of Lipid-Based Delivery Systems: A Phase Diagram Approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93(2):332-348
85. Kossena GA, Charman WN, Boyd BJ, Porter CJH. Influence of the intermediate digestion phases of common formulation lipids on the absorption of a poorly water-soluble drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;94(3):481-492
86. Kossena GA, Charman WN, Wilson CG, O'Mahony B, Lindsay B, Hempenstall JM, Davison CL, Crowley PJ, Porter CJH. Low dose lipid formulations: Effects on gastric emptying and biliary secretion. *Pharmaceutical Research*. 2007;24(11):2084-2096
87. Kostewicz ES, Wunderlich M, Brauns U, Becker R, Bock T, Dressman JB. Predicting the precipitation of poorly soluble weak bases upon entry in the small intestine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2004;56(1):43-51
88. Kovarik JM, Mueller EA, van Bree JB, Tetzloff W, Kutz K. Reduced inter- and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1994;83(3):444-446
89. Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. Orlistat Is a Novel Inhibitor of Fatty Acid Synthase with Antitumor Activity. *Cancer Research*. 2004;64(6):2070-2075
90. Lappalainen K, Jääskeläinen I, Syrjänen K, Urtti A, Syrjänen S. Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharmaceutical Research*. 1994;11(8):1127-1131
91. Lennernäs H, Nylander S, Ungell A-L. Jejunal permeability: A comparison between the ussing chamber technique and the Single-Pass perfusion in humans. *Pharmaceutical Research*. 1997;14(5):667-671
92. Liang R, Fei YJ, Prasad PD, Ramamoorthy S, Han H, Yang-Feng TL, Hediger MA, Ganapathy V, Leibach FH. Human intestinal H<sup>+</sup>/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(12):6456-6463

93. Lin Y, Shen Q, Katsumi H, Okada N, Fujita T, Jiang X, Yamamoto A. Effects of Labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of rhodamine123, a P-glycoprotein substrate, in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(7):1301-1307
94. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000;44(1):235-249.
95. Little JL, Wheeler FB, Fels DR, Koumenis C, Kridel SJ. Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells. *Cancer Research*. 2007;67(3):1262-1269
96. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*. 1997;69(2):581-593
97. Lo YL. Relationships between the hydrophilic-lipophilic balance values of pharmaceutical excipients and their multidrug resistance modulating effect in Caco-2 cells and rat intestines. *Journal of Controlled Release*. 2003;90(1):37-48
98. Lucas KH, Kaplan-Machlis B. Orlistat--a novel weight loss therapy. *Annals of Pharmacotherapy*. 2001;35(3):314-328
99. Luner PE, VanDer Kamp D. Wetting characteristics of media emulating gastric fluids. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;212(1):81-91
100. Lupu R, Menendez JA. Pharmacological inhibitors of fatty acid synthase (FASN)-catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: A new family of anti-cancer agents? *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2006;7(6):483-494
101. Mao Q, Unadkat JD. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in Drug Transport. *AAPS Journal*. 2005;7(1), art. no. 12,:E118-E133
102. Martin-Facklam M, Burhenne J, Ding R, Fricker R, Mikus G, Walter-Sack I, Haefeli WE. Dose-dependent increase of saquinavir bioavailability by the pharmaceutical aid cremophor EL. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2002;53(6):576-581
103. Maubon N, Le Vee M, Fossati L, Audry M, Le Ferrec E, Bolze S, Fardel O. Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2007;21(6):659-663
104. Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: Blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Annals of Oncology*. 2005;16(8):1253-1267

105. Menendez JA, Vellon L, Lupu R. The antiobesity drug Orlistat induces cytotoxic effects, suppresses Her-2/neu (erbB-2) oncogene overexpression, and synergistically interacts with trastuzumab (Herceptin) in chemoresistant ovarian cancer cells. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2006;16(1):219-221
106. Miled N, Canaan S, Dupuis L, Roussel A, Rivière M, Carrière F, De Caro A, (...), Verger R. Digestive lipases: From three-dimensional structure of physiology. *Biochimie*. 2000;82(11):973-986
107. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63
108. Mu H, Høy C-E. The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*. 2004;43(2):105-133
109. Mukherjee T, Squillante E, Gillespie M, Shao J. Transepithelial electrical resistance is not a reliable measurement of the Caco-2 monolayer integrity in Transwell. *Drug Delivery*. 2004;11(1):11-18
110. Mueller EA, Kovarik JM, Van Bree JB, Tetzloff W, Grevel J, Kutz K. Improved dose linearity of cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *Pharmaceutical Research*, 1994;11(2):301-304
111. Nielsen FS, Petersen KB, Müllertz A. Bioavailability of probucol from lipid and surfactant based formulations in minipigs: Influence of droplet size and dietary state. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;69(2):553-562
112. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006;311(5761):622-627
113. Nerurkar MM, Burton PS, Borchardt RT. The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system. *Pharmaceutical Research*. 1996;13(4):528-534
114. Nerurkar MM, Ho NFH, Burton PS, Vidmar TJ, Borchardt RT. Mechanistic roles of neutral surfactants on concurrent polarized and passive membrane transport of a model peptide in Caco-2 cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997;86(7):813-821
115. Noach ABJ, Kurosaki Y, Blom-Roosemalen MCM, De Boer AG, Breimer DD. Cell-polarity dependent effect of chelation on the paracellular permeability of confluent Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1993;90(3):229-237
116. Nordskog BK, Phan CT, Nutting DF, Tso P. An examination of the factors affecting intestinal lymphatic transport of dietary lipids. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;50(1-2):21-44

117. Nussberger S, Steel A, Trottif D, Romero MF, Boron WF, Hediger MA. Symmetry of H<sup>+</sup> binding to the intra- and extracellular side of the H<sup>+</sup>- coupled oligopeptide cotransporter PepT1. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(12):7777-7785
118. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. 2000;267(17):5421-5426
119. Obach RS, Walsky RL, Venkatakrisnan K, Gaman EA, Houston JB, Tremaine LM. The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;316(1):336-348
120. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113(7):823-839
121. Okada T, Narai A, Matsunaga S, Fusetani N, Shimizu M. Assessment of the marine toxins by monitoring the integrity of human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Toxicology in Vitro*. 2000;14(3):219-226
122. Padwal RS, Majumdar SR. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet*. 2007;369(9555):71-77
123. Pafumi Y, Lairon D, De La Porte PL, Juhel C, Storch J, Hamosh M, Armand M. Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(31):28070-28079
124. Pemble CW, Johnson LC, Kridel SJ, Lowther WT. Crystal structure of the thioesterase domain of human fatty acid synthase inhibited by Orlistat. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2007;14(8):704-9
125. Petrus AK, Fairchild TJ, Doyle RP. Traveling the vitamin B12 pathway: Oral delivery of protein and peptide drugs. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2009;48(6):1022-1028
126. Pohjala L, Tammela P, Samanta SK, Yli-Kauhahuoma J, Vuorela P. Assessing the data quality in predictive toxicology using a panel of cell lines and cytotoxicity assays. *Analytical Biochemistry*. 2007;362(2):221-228
127. Porter CJH, Kaukonen AM, Boyd BJ, Edwards GA, Charman WN. Susceptibility to Lipase-Mediated Digestion Reduces the Oral Bioavailability of Danazol After Administration as a Medium-Chain Lipid-Based Microemulsion Formulation. *Pharmaceutical Research*. 2004;21(8):1405-1412
128. Porter CJH, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007;6(3):231-248.

129. Porter CJH, Pouton CW, Cuine JF, Charman WN. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60(6):673-691
130. Pouton CW. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997;25:47-58
131. Pouton CW. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000;11(2):S93-S98
132. Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;29(3-4):278-287
133. Rege BD, Kao JPY, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;16(4-5):237-246
134. Ren X, Mao X, Si L, Cao L, Xiong H, Qiu J, Schimmer AD, Li G. Pharmaceutical excipients inhibit cytochrome P450 activity in cell free systems and after systemic administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70(1):279-288
135. Ren X, Mao X, Cao L, Xue K, Si L, Qiu J, Schimmer AD, Li G. Nonionic surfactants are strong inhibitors of cytochrome P450 3A biotransformation activity in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;36(4-5):401-411
136. Richardson RD, Ma G, Oyola Y, Zancanella M, Knowles LM, Cieplak P, Romo D, Smith JW. Synthesis of novel  $\beta$ -lactone inhibitors of fatty acid synthase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;51(17):5285-5296
137. Rube A, Klein S, Mader K. Monitoring of in vitro fat digestion by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Pharmaceutical Research*. 2006;23(9):2024-2029
138. Sachs-Barrable K, Thamboo A, Lee SD, Wasan KM. Lipid excipients peceol and gelucire 44/14 decrease P-glycoprotein mediated efflux of Rhodamine 123 partially due to expression within Caco-2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2007;10(3):319-331
139. Saha P, Kou JH. Effect of solubilizing excipients on permeation of poorly water-soluble compounds across Caco-2 cell monolayers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000;50(3):403-411
140. Sakai M, Imai T, Ohtake H, Azuma H, Otagiri M. Effects of absorption enhancers on cytoskeletal actin filaments in caco- 2 cell monolayers. *Life Sciences*. 1998;63(1):45-54



141. Salama NN, Eddington ND, Fasano A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006;58(1):15-28
142. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*. 2005;21(1):1-26
143. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*. 1988;48(17):4827-4833
144. Schamp K, Schreder S-A, Dressman J. Development of an in vitro/in vivo correlation for lipid formulations of EMD 50733, a poorly soluble, lipophilic drug substance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;62(3):227-234
145. Sek L, Boyd BJ, Charman WN, Porter CJH. Examination of the impact of a range of Pluronic surfactants on the in-vitro solubilisation behaviour and oral bioavailability of lipidic formulations of atovaquone. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2006;58(6):809-820
146. Shelley WB, Talanin N, Shelley ED. Polysorbate 80 hypersensitivity [20]. *Lancet*. 1995;345(8960):1312-1313
147. Shen Q, Lin Y, Handa T, Doi M, Sugie M, Wakayama K, Okada N, Fujita T, Yamamoto A. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by in vitro transport and in situ absorption studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;313(1-2):49-56
148. Silva RFM, Falcão AS, Fernandes A, Gordo AC, Brito MA, Brites D. Dissociated primary nerve cell cultures as models for assessment of neurotoxicity. *Toxicology Letters*. 2006;163(1):1-9
149. Stegemann S, Leveiller F, Franchi D, de Jong H, Lindén H. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;31(5):249-261
150. Stokes WS, Casati S, Strickland J, Paris M. Neutral red uptake cytotoxicity tests for estimating starting doses for acute oral toxicity tests. *Current Protocols in Toxicology*. 2008;(SUPPL. 36):20.4.1-20.4.20
151. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharmaceutical Research*. 2004;21(2):201-230
152. Sun J, He ZG, Cheng G, Wang SJ, Hao XH, Zou MJ. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Medical Science Monitor*. 2004;10(1):RA5-RA14

153. Sugano K, Hamada H, Machida M, Ushio H, Saitoh K, Terada K. Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;228(1-2):181-188
154. Sunesen VH, Vedelsdal R, Kristensen HG, Christrup L, Müllertz A. Effect of liquid volume and food intake on the absolute bioavailability of danazol, a poorly soluble drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;24(4):297-303
155. Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, Artursson P. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;299(1):164-170
156. Taub ME, Kristensen L, Frokjaer S. Optimized conditions for MDCK permeability and turbidimetric solubility studies using compounds representative of BCS classes I-IV. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;15(4):331-340
157. Thörn M, Finnström N, Lundgren S, Rane A, Löf L. Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2005;60(1):54-60
158. Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1998;38:389-430
159. Thwaites DT, Hirst BH, Simmons NL. Substrate specificity of the di/tripeptide transporter in human intestinal epithelia (Caco-2): Identification of substrates that undergo H<sup>+</sup>-coupled absorption. *British Journal of Pharmacology*. 1994;113(3):1050-1056
160. Tomita M, Hayashi M, Awazu S. Absorption-enhancing mechanism of sodium caprate and decanoylcarnitine in Caco-2 cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1995;272(2):739-743
161. Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: From basic mechanisms to clinical application. *American Journal of Pathology*. 2006;169(6):1901-1909
162. Van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2005;1(2):175-185
163. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*. 2006;68:403-429

164. Van Tilbeurgh H, Bezzine S, Cambillau C, Verger R, Carrière F. Colipase: Structure and interaction with pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1999;1441(2-3):173-184
165. Vellonen KS, Honkakoski P, Urtti A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;23(2):181-188
166. Vertzoni M, Fotaki N, Kostewicz E, Stippler E, Leuner C, Nicolaidis E, Dressman J, Reppas C. Dissolution media simulating the intraluminal composition of the small intestine: Physiological issues and practical aspects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2004;56(4):453-462
167. Ward PD, Tippin TK, Thakker DR. Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharmaceutical Science and Technology Today*. 2000;3(10):346-358
168. Wandel C, Kim RB, Stein CM. "Inactive" excipients such as Cremophor can affect in vivo drug disposition. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2003;73(5):394-396
169. Wang Z, Hop CECA, Leung KH, Pang J. Determination of in vitro permeability of drug candidates through a Caco-2 cell monolayer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2000;35(1):71-76
170. Wang S-W, Monagle J, McNulty C, Putnam D, Chen H. Determination of P-glycoprotein inhibition by excipients and their combinations using an integrated high-throughput process. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93(11):2755-2767
171. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;288(2):369-376
172. Wiedmann TS, Kamel L. Examination of the solubilization of drugs by bile salt micelles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002;91(8):1743-1764
173. Wu C-Y, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical Research*. 2005;22(1):11-23
174. Yamagata T, Kusuha H, Morishita M, Takayama K, Benameur H, Sugiyama Y. Improvement of the oral drug absorption of topotecan through the inhibition of intestinal xenobiotic efflux transporter, breast cancer resistance protein, by excipients. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007;35(7):1142-1148
175. Yamazaki T, Sato Y, Hanai M, Mochimaru J, Tsujino I, Sawada U, Horie T. Non-ionic detergent Tween 80 modulates VP-16 resistance in classical multidrug resistant K562 cells via enhancement of VP-16 influx. *Cancer Letters*. 2000;149(1-2):153-161

176. Yu LX, Straughn AB, Faustino PJ, Yang Y, Parekh A, Ciavarella AB, Asafu-Adjaye E, Mehta MU, Conner DP, Lesko LJ, Hussain AS. The effect of food on the relative bioavailability of rapidly dissolving immediate-release solid oral products containing highly soluble drugs. *Molecular pharmaceutics*. 2004;1(5):357-362
177. Zair ZM, Eloranta JJ, Stieger B, Kullak-Ublick GA. Pharmacogenetics of OATP (SLC21/SLCO), OAT and OCT (SLC22) and PEPT (SLC15) transporters in the intestine, liver and kidney. *Pharmacogenomics*. 2008;9(5):597-624
178. Zhi J, Melia AT, Eggers H, Joly R, Patel IH. Review of limited systemic absorption of orlistat, a lipase inhibitor, in healthy human volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*. 1995;35(11):1103-1108
179. *Physiological Pharmaceutics – Barriers to Drug Absorption – Second Edition – Chapter 6*

## Communications scientifiques

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR7199, Département de Biogalénique du Professeur Thierry Vandamme. Ce travail a donné lieu aux communications suivantes :

### Communications à des congrès par affiche :

- P. Sae Houer, N. Anton, M. Zhao, E. Kling, Th. F. Vandamme, Encapsulation of a BCS IV drug in order to improve its absorption, XVI International Conference on Bioencapsulation, Groningen (Netherlands), 24-26 September 2009
- P. Sae Houer, M. Guhmann, J. Correia, Th. F. Vandamme, Enhancement of The Intestinal Absorption of Orlistat, A Lipophilic Drug With Anticancerous Properties, By Using Lipid-Based Systems, 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, New York, NY (U.S.A.), 12-16 July 2008
- M. Guhmann, J. Correia, P. Sae Houer, Th. F. Vandamme, Investigation Of Different Lipid-Based Systems Designed To Enhance The Oral Bioavailability Of Lipophilic Drugs, 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, New York, NY (U.S.A.), 12-16 July 2008
- Th. F. Vandamme, P. Sae Houer, M. Smola, Encapsulation of drugs into liquid and semi solid formulations in order to enhance oral absorption, 15th International Workshop on Bioencapsulation & COST 865 meeting, Lisbon (Portugal), 17-18 April 2007