

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE.  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1 -



FACULTE DE MEDECINE.

DEPARTEMENT DE PHARMACIE.

***Evaluation préclinique de l'absorption  
intestinale des médicaments***

Thèse d'exercice de fin d'études

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Session : Septembre 2018.

Présentée par :

- BOUZID Takoua

- CHAABANE Iméne

Encadrée par :

- Dr S. DJELLOULI

Maîtres assistant en pharmacologie

Devant le jury :

Présidente : Dr O. BENAZIZ

Maîtres assistante en pharmacie galénique

Examinatrice : Dr K. REGGABI

Maîtres assistante en pharmacologie

Examinatrice : Dr N. AYACHI

Maîtres assistante en pharmacie galénique



# **Remerciements**

*Avant tout, nous tenons à remercier le **Bon Dieu** tout puissant, pour la volonté, la santé, et la patience qu'il nous a donnée durant toutes ces années d'études.*

*Que sa bénédiction et sa protection accompagnent tous nos actes dans ce monde.*

*Le travail présenté dans ce mémoire est le fruit de recherche, d'applications pratiques et d'observations personnelles. Sa réalisation a été possible grâce au concours de plusieurs personnes, à qui nous voulons témoigner toute notre reconnaissance.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements ainsi notre profonde reconnaissance à notre promoteur **Dr. DJELLOULI**, maitre assistant en pharmacologie, pour la disponibilité, l'orientation, la confiance, la patience et les conseils durant tous ces mois qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

*Nous tenons à remercier **Dr. CHADER**, maitre de conférences en pharmacologie et responsable de laboratoire pharmacotoxicologie, **Dr. HADJAZ** ainsi que tout le personnel du L.N.C.P.P.*

*Nos remerciements vont aussi à l'égard des membres de Jury qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail.*

*Nous souhaitons également remercier tous les enseignants du département de Pharmacie, et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à notre formation et à la réussite de cette étude.*

*Et enfin nous exprimons notre reconnaissance envers les amis et les collègues, qui nous ont apporté le support moral tout au long de notre démarche.*

**Merci**

# Dédicace

*Je dédie ce travail*

*À ma mère qui m'a accompagné tout au long de mon parcours, m'a encouragé, m'a soutenue et m'a comblés d'amour et d'affection.*

*À mon père qui a su m'inculquer le sens de la responsabilité ; de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Ses conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Pour sa patience, sa compréhension et son encouragement.*

*À mon seul frère et mes petites sœurs, Abdou, Akhlass et Maram qui m'ont toujours entouré et motivé, pour leur soutien moral.*

*À ma grand-mère pour ses prières, sa bénédiction et son amour.*

*À ma cousine, Boutheina pour ses précieux conseils et pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.*

*À ma très chère copine, Aicha qui n'a cessé de me soutenir et m'encourager.*

*À ma chère binôme, Iméne, pour son aide, sa compréhension et son appui permanent.*

*À mes amis, en particulier : Redouane, Oussama et Amine sources d'amour et de joie qui ont ensoleillés ma vie et m'ont rendu le sourire à chaque fois qu'il a fait gris.*

*Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit. Recevez à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude et reconnaissance.*

**TAKOUA**



# Dédicace

*Je tiens tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant de m'avoir donnée la santé le courage la patience de terminer ce travail.*

*Je dédie le fruit de mes années d'études à mes très chers parents qui m'ont tout donné, de leur amour et leurs sacrifices éternels pour que je puisse suivre mes études dans de bonnes conditions et qui ne cessent pas de m'encourager, me soutenir et de veiller pour mon bien.*

*C'est*

*grâce à vous que je suis devenue la personne que je suis maintenant. Que vous trouviez ici l'expression de ma bien vive reconnaissance et de mes sentiments affectueux. Puisse Dieu, vous procure santé, bonheur et longue vie.*

*A mes petits frères et mes petites sœurs.*

*A la mémoire de mon grand-père maternel.*

*A ma famille.*

*A ma chère copine intime Samouna pour sa présence toujours à mes côtés, sa sincérité, ses conseils et son amour.*

*A ma chère binôme Takoua pour son aide et sa compréhension.*

*A tous mes chères amis, particulièrement : Asma, Idriss, Takoua, Ali, Sarah.*

*A ceux que j'aime et qui m'aiment. Je dédie ce travail.*

**Iméne**



# Table des matières

Liste des figures.....	i
Liste des tableaux.....	iii
Abréviations.....	iv
Glossaire.....	viii
Introduction générale.....	1

## Etude bibliographique

### Chapitre I : Cycle de vie du médicament

I.1. Petite histoire de médicament.....	4
I.2. Définition du médicament.....	5
I.3. Composition des médicaments.....	5
I.4. Dénomination des médicaments.....	5
I.5. Classification des médicaments.....	6
I.6. Devenir du médicament dans l'organisme.....	7
I.6.1. Absorption.....	8
I.6.1.1. Voies d'administration.....	8
I.6.1.2. Absorption des médicaments par voie orale.....	9
I.6.2. Distribution.....	11
I.6.3. Métabolisme.....	11
I.6.4. Excrétion.....	12
I.7. Développement du médicament.....	12
I.7.1. Recherche fondamentale.....	13
I.7.2. Développement préclinique.....	14
I.7.2.1. Etudes de l'activité pharmacodynamique.....	14
I.7.2.2. Etudes de pharmacocinétique.....	14
I.7.2.3. Etudes d'innocuité.....	14
I.7.3. Etudes cliniques.....	14
I.7.4. Dossier d'AMM ou Décision d'enregistrement DE.....	16
I.7.4.1. Format CTD.....	16
I.7.4.2. Procédure d'enregistrement en Algérie.....	17

### Chapitre II : absorption intestinale des médicaments

II.1. Définition de l'absorption intestinale.....	19
II.2. Physiologie et anatomie de l'intestin.....	19

II.2.1. Membrane intestinale.....	20
II.2.2. Cellules constitutives de l'épithélium intestinal.....	22
II.2.3. Enzymes impliqués dans le métabolisme intestinal.....	23
II.2.4. Transporteurs membranaires d'efflux intestinal.....	24
II.3. Mécanisme de l'absorption intestinale.....	24
II.3.1. Structure et composition de la membrane cellulaire.....	24
II.3.2. Mécanismes d'absorption.....	24
II.4. Facteurs influençant l'absorption intestinale.....	26
<b>Chapitre III : Evaluation préclinique de l'absorption intestinale des médicaments</b>	
III.1. Modèles expérimentaux d'étude de l'absorption.....	30
III.1.1. Modèles in vitro.....	30
III.1.1.1. Modèles cellulaires.....	30
III.1.1.1.1. Cellules Caco2.....	30
III.1.1.1.2. Cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney).....	32
III.1.1.1.3. Cellules HT-29.....	32
III.1.1.1.4. Cellules de Lewis Lung Carcinoma –Porcine Kidney (LLC-PK1).....	32
III.1.1.1.5. Cellules 2/4/A1.....	33
III.1.1.2. Tests physico-chimiques.....	33
III.1.1.2.1. Test de coefficient de partage n-octanol/eau.....	33
III.1.1.2.2. Test PAMPA.....	34
III.1.2. Modèles Ex-vivo.....	36
III.1.2.1. Chambre d'Ussing.....	36
III.1.2.2. Anneaux intestinaux éversés.....	37
III.1.2.3. Sac intestinal retourné.....	37
III.1.3. Modèles in vivo : Anse intestinale (perfusion intestinale chez l'homme).....	37
III.1.4. Modèles in situ.....	38
III.1.5. Modèles in silico.....	39
III.1.5.1. Règles de base.....	40
III.1.5.2. Approches de modélisations utiles en pharmacocinétique.....	41
III.1.5.2.1. Modélisation pharmacocinétique fondée sur la physiologie PBPK.....	41

III.1.5.2.2. Modules de quantification des relations structure-activité QSAR.....	41
III.2. Avantages et inconvénients des modèles expérimentaux.....	42
III.3. Système de classification biopharmaceutique (BCS).....	44

## Étude expérimentale

<b>I. Objectifs.....</b>	<b>46</b>
<b>II. Matériels et méthodes.....</b>	<b>46</b>
II.1. Choix de la méthode.....	46
II.2. Choix de la molécule.....	46
II.3. Matériel.....	47
II.3.1. Réactif Animal.....	47
II.3.2. Equipements.....	47
II.3.3. Consommables.....	48
II.3.4. Matière première.....	48
II.3.5. Réactifs chimiques.....	48
II.3.6. Molécule à perfuser.....	49
II.4. Expérimentation animale.....	49
II.4.1. Principe de la méthode.....	49
II.4.2. Préparation de la solution pour perfusion intestinale.....	49
II.4.3. Mode opératoire.....	50
II.5. Dosage bio-analytique du Naproxène et du Rouge de phénol par HPLC.....	54
II.5.1. Principe.....	54
II.5.2. Choix de la méthode.....	54
II.5.3. Conditions chromatographiques.....	54
II.5.4. Validation de la méthode bio-analytique.....	55
II.5.5. Intervalle de dosage et échantillons de contrôle qualité.....	55
II.5.6. Mode opératoire.....	56
II.5.6.1. Préparation des réactifs et des solutions standards.....	56
II.5.6.3. Préparation des échantillons à analyser.....	61
<b>III. Résultats et interprétations.....</b>	<b>60</b>

III.1. Dosage bio-analytique du Naproxène et du Rouge de phénol.....	60
III.1.1. Courbe d'étalonnage.....	62
III.1.2. Détermination des concentrations des échantillons.....	66
III.2. Détermination de la Perméabilité effective $P_{eff}$ .....	66
<b>IV. Discussion.....</b>	<b>68</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>72</b>
<b>Références</b>	
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	

# Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Evolution des concentrations sanguines du médicament après administration extravasculaire.....	7
<b>Figure 2 :</b> Evolution des concentrations sanguines du médicament après administration par différentes voies.....	9
<b>Figure 3 :</b> Différents sites d'administration du médicament.....	10
<b>Figure 4 :</b> Notion de biodisponibilité.....	10
<b>Figure 5 :</b> Étapes de développement d'un médicament.....	13
<b>Figure 6 :</b> Triangle CTD : Common Technical Document organisé en cinq modules : le module 1 est spécifique de la région et les modules 2, 3,4 et 5 sont destinés à être communs à toutes les régions.....	17
<b>Figure 7 :</b> Organisation de l'intestin humain selon l'axe gastro-colique.....	20
<b>Figure 8 :</b> Coupe de l'intestin grêle montrant les chylifères et les vaisseaux sanguins du chorion...21	
<b>Figure 9 :</b> Structure macroscopique de l'intestin grêle.....	22
<b>Figure 10 :</b> Mécanismes d'absorption des molécules par la paroi intestinale.....	26
<b>Figure 11:</b> Diagramme d'une monocouche de cellules Caco-2 cultivées.....	31
<b>Figure 12:</b> Remplissage automatique d'une plaque microtitre de 96 échantillons avec un milieu de culture cellulaire au moyen du système Freedom EVO®.....	31
<b>Figure 13 :</b> Schéma de principe du test PAMPA.....	34
<b>Figure 14:</b> Ussing System for Epithelial Research from World Precision Instruments.....	36
<b>Figure 15 :</b> Segment perfusé chez l'homme crée avec le tube multicanaux et les deux ballons gonflables.....	38
<b>Figure 16 :</b> Étude in situ de l'absorption d'un médicament avec perfusion intestinale.....	39
<b>Figure 17 :</b> Système de classification biopharmaceutique (BCS).....	44
<b>Figure 18:</b> Rats albinos utilisés pour l'expérience.....	47

<b>Figure 19 :</b> Équipements utilisés.....	48
<b>Figure 20:</b> Solution pour perfusion intestinale contenant le Naproxène de sodium et le rouge de phénol.....	50
<b>Figure 21:</b> Pesée d'un rat à jeun avant l'administration d'anesthésie.....	51
<b>Figure 22:</b> Injections contenant la solution de thiopental.....	51
<b>Figure 23:</b> Administration d'anesthésie par voir IP.....	52
<b>Figure 24:</b> Perfusion de la solution dans le ségment de rat.....	53
<b>Figure 25:</b> Échantillons de perfusât intestinal recueillis.....	54
<b>Figure 26:</b> Chromatogramme représentatif du blanc du rat1.....	60
<b>Figure 27:</b> Chromatogramme représentatif du standard 3 de perfusion intestinale du rat1.....	61
<b>Figure 28:</b> Chromatogramme représentatif d'échantillon de contrôle qualité moyen de perfusât intestinale du rat1.....	61
<b>Figure 29:</b> Chromatogramme représentatif d'un échantillon P4 de perfusion intestinale du rat 1..	62
<b>Figure 30:</b> Courbe de calibration des concentrations de Rouge de phénol ( $\mu\text{g/ml}$ ) en fonction de la surface des pics chromatographiques des standards de rat 1.....	63
<b>Figure 31:</b> Courbe de calibration des concentrations de Naproxène ( $\mu\text{g/ml}$ ) en fonction de la surface des pics chromatographiques des standards de rat1.....	63

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Temps de transit et pH dans l'intestin grêle.....	19
<b>Tableau 2 :</b> Avantages et inconvénients des modèles expérimentaux.....	42
<b>Tableau 3:</b> Paramètres liés à chaque rat notés durant l'expérience.....	53
<b>Tableau 4:</b> Paramètres du système chromatographique HPLC.....	55
<b>Tableau 5:</b> Concentrations et les volumes prélevés pour chaque standard aqueux.....	57
<b>Tableau 6:</b> Con centrations et les volumes prélevés pour chaque standard aqueux de Rouge de phénol.....	57
<b>Tableau 7:</b> Concentrations et les volumes prélevés du standard aqueux ainsi du perfusât intestinal pour chaque standard biologique.....	58
<b>Tableau 8:</b> Concentrations et les volumes prélevés pour chaque échantillon de contrôle qualité du Naproxène.....	58
<b>Tableau 9:</b> Concentrations et les volumes prélevés pour chaque échantillon de contrôle qualité du Rouge de phénol.....	59
<b>Tableau 10:</b> Concentrations et les volumes prélevés des CQ aqueux ainsi du perfusât intestinal pour chaque échantillon de contrôle biologique.....	59
<b>Tableau 11:</b> Paramètres de la régression linéaire des courbes d'étalonnage du Naproxène et du rouge de phénol du rat 1.....	64
<b>Tableau 12:</b> Concentrations et les coefficients de variation des standards de Rouge de phénol et du Naproxène.....	65
<b>Tableau 13:</b> Précision intra-essais obtenue à partir de la courbe d'étalonnage avec 3 niveaux d'échantillons de control qualité.....	65
<b>Tableau 14:</b> Concentrations estimées des échantillons calculées à partir de la courbe de calibration.....	66
<b>Tableau 15:</b> Concentrations du Naproxène après perfusion à l'équilibre corrigées par le Rouge de phénol.....	67
<b>Tableau 16:</b> Coefficients et la moyenne de perméabilité intestinale du Naproxène chez les 4 rats..	67

## **ABRÉVIATIONS**

### **A**

**ABC:** ATP Binding Cassette

**ADME :** Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion

**ADMET :** Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité

**Afssaps :** Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

**AMM :** Autorisation de Mise sur le Marché

**ANPP :** Agence Nationale des Produits Pharmaceutiques.

**ATP:** Adénosine triphosphate

**AUC:** Area under the curve

### **B**

**BBLM** Brush-Border Lipid Membrane

**BCS:** Biopharmaceutical Classification System

**BHE :** Barrière hémato-encéphalique

**BPC :** Bonnes Pratiques Cliniques

### **C**

**Caco-2 :** Cellules cancéreuse de colon humain

**CL :** Clairance

**CL<sub>R</sub> :** Clairance rénale

**CL<sub>T</sub> :** Clairance plasmatique totale

**C<sub>max</sub> :** Concentration maximale après administration

**CPP :** Comités de Protection des Personnes

**CQ :** Contrôle Qualité.

**CTD :** Common Technical Document

**CV :** Coefficient de Variation

**CYP:** Cytochrome P450

### **D**

**DCI :** Dénomination Commune Internationale

**DE** : Décision d'enregistrement

**DOPC** : Dioléoylphosphatidylcholine

**DS** : Double-Sink

## **E**

**Ech** : échantillon

## **F**

**F** : Biodisponibilité absolue

**Fa** : Coefficient d'absorption

**FDA** : Food and Drug Administration

**Fh** : Fraction non métabolisée par le foie

**Fg** Fraction non métabolisée par l'intestin

## **H**

**HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance

**HDM-PAMPA** Hexacane PAMPA Model

## **I**

**ICH**: International Conférence on Harmonisation

**IM** : Intramusculaire

**IMAO**: Inhibiteurs de la monoamine oxydase

**Isc** : Courant de court-circuit

**I.P**: Intra-Péritonéal

**IV**: Intraveineuse

## **L**

**LC/MS**: Chromatographie de liquides/ Spectromètre de masse

**LIQ**: Limite Inferieure de Quantification

**LLC-PK1**: Lewis Lung Carcinoma –Porcine Kidney

**LNCPP** : laboratoire national du contrôle des produits pharmaceutiques.

**Log P**: coefficient de partage octanol/eau

## **M**

**MAI** : Membrane artificielle immobilisée

**MDCK**: Madin Darby Canine Kidney

**MDR:** multidrug resistance

**Mw:** Molecular Weight= Poids Moléculaire

## N

**NOEL:** No Observed Effect Level

**NOAEL:** No observed Adverse Effect Level

## O

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

## P

**P.O :** Voie Orale (Per os)

**PAMPA:** Parallel Artificial Membrane Permeability Assay

**P<sub>app</sub> :** Perméabilité apparenté

**PBPK:** Physiologically Based Pharmaco Kinetics

**P<sub>eff</sub> :** Perméabilité effective

**PEG:** Polyéthylène glycol

**P-gp :** Glycoprotéines P

**PGR :** Plan de Gestion des Risques

**pH:** Potentiel d'hydrogène

**PhRMA:** Pharmaceutical Research and Manufacturers of America

**PIP :** Plans d'Investigations Pédiatriques

**PK :** Pharmaco Kinetics = pharmacocinétique

**pKa :** Logarithme de la constante d'acidité

**P<sub>oe</sub> :** Coefficient de partage octanol/eau

**PSA :** Polar Surface Area

**PVDF :** Polyfluorure de vinylidène

## Q

**QSAR :** Quantitative Structure-Activity Relationships

## R

**RCP :** Résumé des Caractéristiques du Produit

**RF :** Rouge de phénol

## S

**SM** : Solution Mère

**SPIP** : Single Pass Intestinal Perfusion

**Std** : Standard

## **T**

**TEER** : Résistance électrique transépithéliale

**TGI** : Tractus gastro-intestinal

**Tmax** : Temps correspondant à la concentration maximale

## **U**

**UDP** : uracile di-phosphate

**UGT** : UDP-GlucuronylTransférase

**UV** : Ultraviolet

## **V**

**Vd** : Volume de distribution

# Glossaire

**Adénocarcinome** : cancer débutant à partir d'un épithélium glandulaire.

**Biodisponibilité** : est la quantité relative de principe actif absorbé à partir d'une forme pharmaceutique qui atteint la circulation systémique et la vitesse à laquelle elle l'atteint.

**Bioéquivalence** : est l'absence d'une différence significative de la biodisponibilité d'un principe actif à partir d'une forme pharmaceutique équivalente, administrée à la même dose dans des conditions similaires au cours d'une étude appropriée.

**Blanc analytique** : une partie aliquote d'eau « pure » ou de solvant d'un volume équivalent aux échantillons analysés soumise aux mêmes procédures analytiques du prétraitement au dosage. Pour les échantillons solides, seuls les réactifs sont considérés comme un blanc de méthode.

**Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)** : La chromatographie est une technique analytique, à la fois quantitative et qualitative, qui permet la séparation d'un ou de plusieurs composés d'un mélange même très complexe pour leur identification et leur quantification.

**Chyme** : contenu alimentaire de l'estomac, projeté dans le duodénum à travers le pylore.

**Coefficient de corrélation** : le coefficient de corrélation linéaire entre deux variables est égal au rapport de leur covariance et du produit non nul de leurs écarts types. Le coefficient de corrélation est compris entre -1 et 1.

**Coefficient de variation** : est une mesure relative de la dispersion des données autour de la moyenne et c'est le rapport de l'écart-type à la moyenne.

**Contrôle qualité** : Un contrôle de qualité est défini comme l'action de mesurer, examiner, essayer une ou plusieurs caractéristiques et de les comparer aux exigences spécifiées en vue d'établir leur conformité et sinon de mettre en évidence des défauts et de déclencher des actions correctives.

**Courbe d'étalonnage** : Une courbe d'étalonnage est la relation entre la réponse de l'instrument et les concentrations connues de l'analyte. Une courbe d'étalonnage doit être générée pour chaque analyte dans l'échantillon. Un nombre suffisant de standards doit être utilisé pour définir de façon adéquate la relation entre la concentration et la réponse.

**Cycle entéro-hépatique** : Cycle emprunté par certains médicaments à élimination biliaire, excrétés au niveau du cholédoque dans le duodénum où ils sont réabsorbés. Ce phénomène entraîne une « réentrée » du médicament dans la circulation systémique et contribue à prolonger l'exposition de l'organisme à ce médicament.

**Ecart type :** c'est un paramètre statistique indiquant la dispersion des valeurs au niveau de la moyenne d'une série de mesures.

**Echantillon d'étalonnage :** échantillons, avec ou sans matrice, de concentration connue qui permettent d'établir les points de gamme.

**Effet de premier passage :** perte de médicament par métabolisme avant son arrivée dans la circulation générale, dès son premier contact avec l'organe responsable de la biotransformation.

**Enrobage :** procédé industriel consistant à appliquer une couche de liquide ou poudre sur la surface d'un produit de base de forme quelconque afin de lui conférer des propriétés particulières.

**Exactitude :** L'exactitude d'une méthode d'analyse décrit la proximité des résultats moyens des dosages obtenus par la méthode de la valeur réelle (concentration) de la substance à analyser.

**Facteurs intrinsèques :** substance sécrétée par des glandes gastriques et permettant l'absorption intestinale de la vitamine B12.

**FDA :** Acronyme de Food and Drug Administration, division du département de la santé américaine. Tous les dispositifs médicaux et médicaments doivent disposer de l'approbation de la FDA pour être commercialisés aux Etats-Unis.

**Fermentation :** ensembles des modifications chimiques subies par un milieu organique sous l'influence de ferments provenant de bactéries ou de levures (fermentation alcoolique, lactique..).

**Forme galénique :** les différentes formes de médicaments (comprimés, gélules, collyres, suppositoires, injections...).

**Générique :** Le "médicament générique" est défini comme la copie d'un médicament innovant dont la production et la commercialisation ont été rendues possibles par l'expiration de son brevet de propriété industrielle.

**Génie Génétique :** ensemble des outils et des techniques de la biologie moléculaire permettant, de manière contrôlée, l'étude de la modification des gènes dans un but de recherche fondamentale ou appliquée.

**Génotoxicité :** la capacité d'une substance à induire des modifications physiques ou fonctionnelles dans un génome.

**Innocuité :** Caractère de ce qui n'est pas toxique, nocif.

**Interaction Médicamenteuse** : résulte de l'administration concomitante ou successive de deux ou plusieurs médicaments (ou parfois d'autres substances comme certains aliments) chez un même patient et dans laquelle l'une des substances absorbées affecte l'activité thérapeutique d'un ou plusieurs des autres médicaments administrés.

**Interférence** : Interaction entre des signaux.

**Linéarité** : Capacité à obtenir un résultat directement proportionnel à la quantité en analyte de l'échantillon à l'intérieur de l'intervalle de dosage.

**Médicaments dérivés du sang** : sont des médicaments à base de sang ou de composants de sang préparés industriellement (exemple : les facteurs de coagulation, albumine...).

**Organisation Mondiale de la Santé** : institution spécialisée, fondée en 1948 au sein de l'organisation des nations unies, et qui a notamment pour objet d'amener tous les peuples au niveau de santé le plus élevé possible.

**Osmolarité** : nombre de particules osmotiquement actives (osmol) de soluté par litre de solution.

**Perfusion** : introduction, de façon lente et prolongée, de liquide thérapeutique (sang, plasma, médicaments) en volumes importants.

**Pharmacopée** : est une norme pharmaceutique qui uniformise la composition qualitative et quantitative des médicaments grâce à un recueil de monographies.

**Pharmacovigilance** : surveillance des effets secondaires nocifs éventuels d'un médicament.

**Placébo** : est un médicament qui ne contient pas de principe actif. Les placebos n'ont aucun effet médical connu.

**Promédicament** : est une substance pharmacologique (un médicament) qui est administré sous une forme inactive. Une fois administrée, la prodrogue est métabolisée in vivo en un métabolite actif.

**Screening**: c'est un criblage des molécules par des tests codifiés pour découvrir d'éventuelles propriétés pharmacologiques.

**Standards** : un étalon interne approprié (IS) peut être ajouté pendant le traitement des échantillons dans des procédés chromatographiques.

**Temps de rétention** : c'est le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué. C'est la principale grandeur de rétention. Il varie en fonction du débit, de la température d'élution, de la composition de la phase mobile et du vieillissement de la colonne

**Tolérance** : d'un médicament peut être considérée comme la capacité de l'organisme à supporter une certaine dose d'un médicament sans manifester de signes d'intoxication.

**Transporteurs d'efflux** : l'efflux est un mécanisme par lequel les cellules rejettent à l'extérieur des composés toxiques : antibiotiques, métaux lourds, drogues... L'efflux est un mécanisme de transport actif, énergie-dépendant, assuré par des protéines transmembranaires appelées pompes d'efflux.

**Xénobiotiques** : Substances chimiques exogènes introduites dans un organisme vivant.

# Introduction générale

La prise de médicament par voie orale est de loin la voie d'administration la plus favorable et la plus utilisée. Plus de 60 % des médicaments sont commercialisés en tant que traitements oraux. Toutefois, pour de nombreuses molécules candidates à un développement pharmaceutique, il est parfois difficile de concevoir et de fabriquer des formulations efficaces, c'est à dire capables d'assurer une absorption intestinale suffisante et reproductible de la molécule considérée et donc de générer un profil pharmacocinétique satisfaisant par voie orale. Dans ces circonstances, il est important que les propriétés pharmacocinétiques d'un médicament soient optimales pour qu'il atteigne la circulation systémique. Ainsi, pour surmonter les barrières à l'absorption, les médicaments sont optimisés en phase de développement pour avoir une bonne solubilité, une bonne perméabilité intestinale et un faible effet de premier passage hépatique.

L'absorption des médicaments est un facteur limitant de sa biodisponibilité après l'étape biopharmaceutique de la libération du principe actif (PA) dans le sang. L'absorption détermine la quantité du PA qui passe dans la circulation générale par la suite vers son site d'action ainsi son effet thérapeutique. Ce phénomène dépend de plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques du médicament et représente un facteur déterminant dans les études de la bioéquivalence des médicaments génériques.

Les PA candidats pour leur utilisation comme médicaments doivent passer par une succession d'études pour connaître au mieux leur effet et leur comportement dans l'organisme. La perméabilité intestinale peut être estimée par différentes méthodologies expérimentales. Bien que les études in vivo sur l'homme seraient les plus souhaitables, elles semblent difficiles et prennent beaucoup de temps. Par conséquent, certaines méthodes expérimentales, telles que les modèles animaux in vivo et ex vivo ont jusqu'à présent été élaborés pour estimer l'absorption gastro-intestinale des médicaments.

Ce travail comprend deux grandes parties : une partie bibliographique dans laquelle nous aborderons les bases fondamentales de pharmacologie en 3 chapitres, cycle de vie du médicament, l'absorption intestinale et les différentes méthodes d'évaluation de l'absorption intestinale des médicaments. Et une partie pratique dans laquelle nous évaluerons la perméabilité intestinale d'une molécule de référence qui est le Naproxène de sodium avec l'une des techniques classiques les plus utilisées dans les études de l'absorption intestinale des composés SPIP (Single Pass Intestinal Perfusion). Et nous déterminerons les concentrations lumineales à l'équilibre par un dosage chromatographique du perfusât intestinal du rat.

# ***Etude bibliographique***

# Chapitre I

## Cycle De Vie Du Médicament

## I.1. Petite histoire du médicament

La découverte de nouveaux médicaments s'est longtemps limitée à l'observation empirique des effets produits par certaines substances naturelles sur le cours des maladies.

Au 16<sup>e</sup> siècle, Paracelse a écrit : « tout est poison, rien n'est sans poison, ce qui fait le poison c'est la dose ». Considéré comme un des pères de la toxicologie, ce médecin suisse jeta alors les bases de la pharmacologie moderne dans une société où la plupart des remèdes provenaient de plantes ou d'éléments naturels. Paracelse croyait qu'il existe un médicament spécifique pour chaque maladie, il est premier théoricien de la relation dose-effet.

Grâce aux progrès de la chimie et de la physiologie, le XIX<sup>e</sup> siècle marque une nouvelle étape avec l'isolement des principes actifs : de l'opium, on isole la morphine puis la codéine, de l'ipécacuana on extrait l'émétine, du quinquina, la quinine. La colchicine supplante le colchique et l'acide acétylsalicylique, l'écorce de saule. On dispose alors de la papavérine extrait du pavot, de la digitaline de la digitale et de l'ergotamine de l'ergot de seigle. L'aspirine sera synthétisée en 1897 par Hoffman.

Apparaîtront au début du XX<sup>e</sup> siècle la novocaïne en 1901, les antisypilitiques en 1906 et les antipaludéens de synthèse en 1927. Mais l'ère moderne débute avec la découverte en 1937 de l'action antibactérienne des sulfamides. En 1943 c'est l'année de la découverte par Fleming de la pénicilline et 1947 de la streptomycine qui vainc (momentanément) la tuberculose. On assiste alors à un emballement des découvertes :

- Les antihistaminiques de synthèse en 1942 ;
- Les anticoagulants coumariniques en 1947 ;
- La cortisone en 1949 ;
- L'isoniazide et les neuroleptiques en 1952 ;
- Les IMAO, la chlorothiazide et les antidépresseurs imipraminiques en 1957.

Ces découvertes sont souvent le fruit du hasard.

À partir des années soixante, après la découverte de l'effet tératogène de la thalidomide (1957), les pharmacologues mettent au point des méthodes d'évaluation préclinique moléculaire à partir de méthode de sélection qu'on appelle « Screening ». Cette méthode va permettre d'élaborer de nouveaux médicaments à partir de modèles de médicaments existants.

Durant les deux décennies qui suivent seules quelques classes ont enrichi les possibilités thérapeutiques comme les bêtabloquants et les antihistaminiques H<sub>2</sub>.

Les années quatre-vingt-dix, celles des années du génie génétique, du génie cellulaire et de la thérapie génique. C'est ainsi qu'une bactérie fabrique une insuline pure entraînant peu d'effets indésirables ou que le génie génétique permet de produire des anticorps monoclonaux ou que la thérapie génique transfère directement l'ADN producteur du médicament protéique dans l'organisme malade, les cellules deviennent des microfabriquants puis des microsystèmes de délivrance du médicament (**Chast, 1995**).

## **I.2. Définition du médicament**

D'après l'article 4 de la loi 08/13 du 03 aout 2008 modifiant et complétant l'article 170 de la loi 85-05 du 16 février 1985 relative à la protection et à la promotion de la santé, en entend par médicament :

« Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, et tous produits pouvant être administrés à l'homme ou à l'animal , en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger et modifier ses fonctions organiques » (**Loi sanitaire, 2008**).

Le médicament est donc un produit de consommation dont l'utilisation a pour objectif de traiter ou de prévenir une maladie, dans des conditions parfaitement définies.

## **I.3. Composition des médicaments**

La formulation d'un médicament correspond à l'ensemble des substances qui entrent dans sa composition. On distingue deux sortes de composés :

- **Principe actif** qui est généralement responsable de l'action pharmacologique du médicament sur l'organisme, et qui peut être de différentes origines, végétale, animale, microbiologique, biotechnologique et synthétique.
- **Excipients** qui sont généralement inactifs mais néanmoins essentiels, car ils enrobent le principe actif pour faciliter son absorption et accélérer sa diffusion dans l'organisme, et donc rendent possible l'utilisation du médicament et facilitent son emploi. Même s'ils n'ont pas d'intérêt thérapeutique, les excipients peuvent parfois provoquer des réactions au sein de l'organisme on appelle ce type d'excipients « excipients à effet notoire » (**Le Hir et al, 2009**)

## **I.4. Dénomination des médicaments**

Le médicament est à la fois désigné par un nom commercial choisi par le laboratoire et un nom chimique qui correspond à la formule chimique de son principe actif et par une dénomination commune internationale (DCI) qui est officialisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et qui permet de désigner de manière univoque le principe actif qu'il renferme.

En Algérie, d'après l'article 14 de décret n° 76-139 du 23 octobre 1976 portant réglementation des produits pharmaceutiques : « la dénomination spéciale du médicament qui doit être un nom de fantaisie ou une dénomination scientifique usuelle assortie d'une marque ou du nom de fabricant » (**Décret, 1976**).

La DCI permet tout d'abord d'éviter le risque de surdosage, de diminuer le risque d'accident d'allergie et enfin, d'éviter toute interaction médicamenteuse avec un autre traitement.

## **I.5. Classification des médicaments**

La classification des médicaments peut être faite de différentes manières. L'intérêt de chacune dépend en fait du but poursuivi.

### **I.5.1. Classification selon l'origine**

On peut, par exemple, distinguer :

- les médicaments d'origine minérale par exemple: les argiles.
- les médicaments d'origine végétale par exemple: les médicaments de l'ergot de seigle, les digitaliques, la passiflore. Cette catégorie a été longtemps très importante, et elle a dominé la pharmacopée.
- les médicaments d'origine chimique sont soit des composés de synthèse à partir de principes de chimie minérale, soit des composés de semi synthèse c'est-à-dire des dérivés obtenus par synthèse chimique à partir de substances naturelles extraites de végétaux, de fermentation ou de tout autre procédé.
- les médicaments d'origine animale sont issus directement ou après extraction et transformation du corps humain : l'exemple majeur est celui des médicaments dérivés du sang. On peut aussi classer les médicaments selon les domaines physiologiques auxquels ils se rattachent ou les organes sur lesquels ils agissent.
- les médicaments issus des biotechnologies ils prennent une importance croissante. Ils sont caractérisés par leurs procédés d'obtention (génie génétique, fermentation, etc.).

### **I.5.2. Classification chimique**

La classification par séries chimiques est évidemment pertinente pour le chimiste et le pharmacien. C'est dans ce cadre que se placent les études structure – activité. Elle est utile à la découverte de nouveaux principes actifs. Dans la même série chimique, les dérivés présentent à des degrés divers de multiples effets pharmacologiques et des applications thérapeutiques parfois très différentes.

### **I.5.3. Classification pharmacologique**

C'est une classification par cibles et par mécanismes d'action. Par exemple, les IMAO, les parasympatholytiques, les inhibiteurs des phosphodiésterases, etc. Elle a le grand avantage d'être satisfaisante pour l'esprit car elle permet la compréhension des phénomènes et donc de la logique de l'utilisation des médicaments.

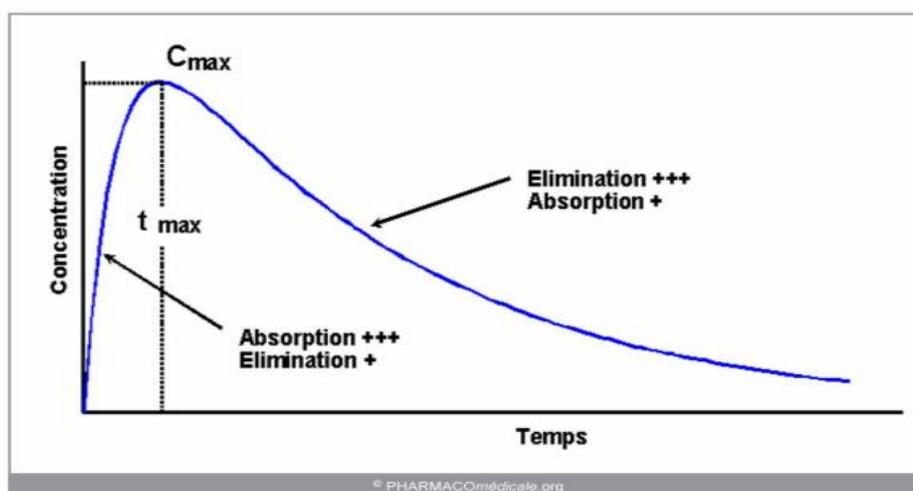
#### I.5.4. Classification thérapeutique

Elle consiste à lister les médicaments par les pathologies qu'ils traitent. C'est ainsi que l'on aura comme « classes thérapeutiques » par exemple les antihypertenseurs, les antirhumatismaux, les antiulcéreux, et les anticancéreux.etc. C'est la classification la plus satisfaisante pour le praticien car elle est directement opérationnelle.

A l'intérieur de chaque classe thérapeutique, plusieurs classes pharmacologiques: par exemple parmi les anti-infectieux, on distingue les antibiotiques, les antiparasitaires, les antifongiques, les antiviraux, les antiseptiques (Dangoumau et al, 2006).

#### I.6. Devenir du médicament dans l'organisme

Afin d'être efficace, tout médicament doit atteindre son site d'action. La science qui étudie le comportement d'une molécule dans l'organisme s'appelle la pharmacocinétique. Par opposition à la pharmacodynamie, qui est l'étude de l'effet des médicaments sur l'organisme. La pharmacocinétique étudie plus volontiers l'action de l'organisme sur le médicament à l'aide de courbes doses – Concentration (**Figure 1**), comporte quatre phases dites ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion. Ces étapes ne sont pas toujours strictement chronologiques et peuvent être concomitantes.



**Figure 1** : Evolution des concentrations sanguines du médicament après administration extravasculaire (Site pédagogique, 2018).

## **I.6.1. Absorption**

Elle se définit comme le processus par lequel le médicament passe dans la circulation générale depuis son site d'administration. Elle dépend de la voie d'administration, la nature et la forme pharmaceutique du médicament (**Cloutier et al, 2005**).

### **I.6.1.1. Voies d'administration**

Schématiquement, on distingue deux grandes voies d'administration (**figure3**) :

- **Voie parentérale**

La voie parentérale regroupe toutes les injections (intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée). Le principe actif atteint la circulation sanguine et se répartit directement sans passage obligé par le système porte et le foie, sans subir l'effet de premier passage hépatique. On dit que le PA est plus biodisponible que par voie orale : la vitesse d'action et/ou la quantité de médicament qui agit est plus importante. L'absorption sera plus ou moins complète et plus ou moins rapide en fonction des propriétés physico-chimiques des médicaments (**Faure et al, 2014**).

- **Voie digestive ou entérale**

Correspond à la voie orale. Lorsqu'on avale un comprimé, il arrive dans l'estomac et sa digestion va commencer : le comprimé se délite, se désagrège et se dissout. Une partie du principe actif peut commencer à passer à travers la paroi de l'estomac pour rejoindre la circulation sanguine, une autre partie continue sa route dans l'intestin avant d'être absorbé pour rejoindre la circulation sanguine (via la veine porte) (**Faure et al, 2014**).

- **Autres modes d'administration**

Sont essentiellement :

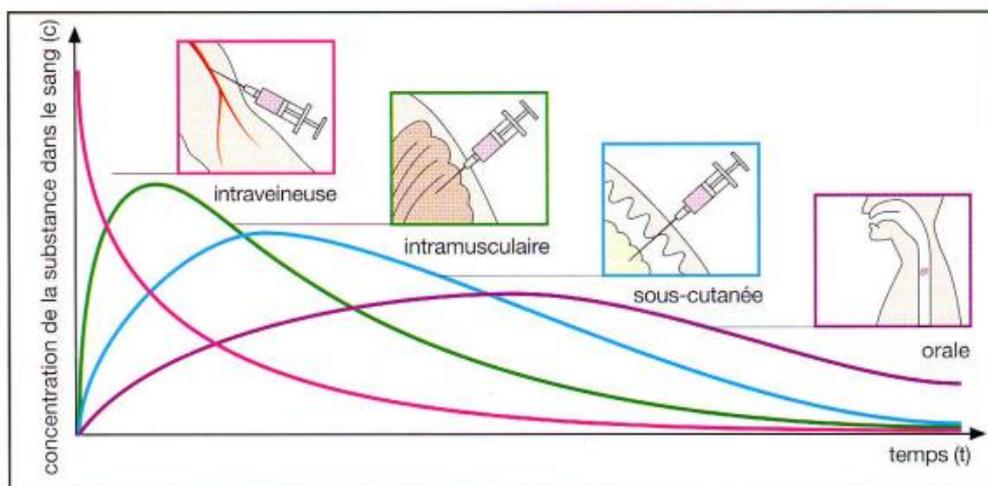
- **la voie transcutanée** (patchs, pommades).
- **la voie sublinguale** (spray, comprimé orodispersible).
- **la voie rectale** (suppositoires).

La voie rectale présente les mêmes caractéristiques que la voie orale mais elle permet d'éviter en partie un éventuel effet de premier passage hépatique dans la mesure où les veines hémorroïdales inférieures et moyennes ne rejoignent pas le système porte.

La voie sublinguale permet une absorption très rapide mais limitée compte tenu de la faible surface d'absorption. Les médicaments, une fois la paroi capillaire franchie, atteignent directement la circulation générale.

D'autres modes d'administration locale (collyres, sprays bronchiques) sont surtout utilisées lorsqu'on veut éviter un effet systémique ou que ce dernier n'est pas indispensable. Toutefois, un passage systémique du médicament est toujours possible (**Dangoumau et al, 2006**).

Selon la voie d'administration, les concentrations de substance dans le sang en fonction du temps sont différentes (**Figure 2**).

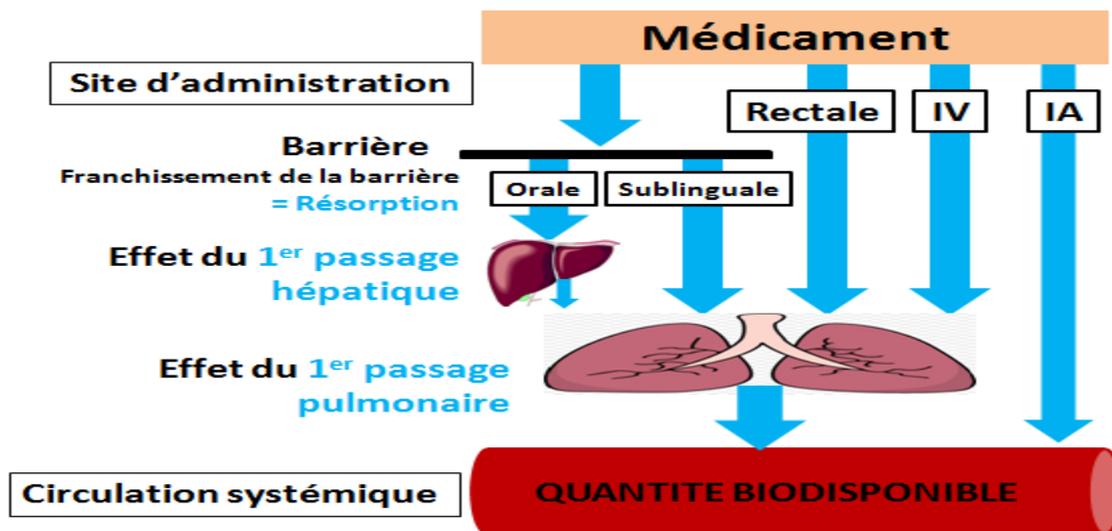


**Figure 2** : Evolution des concentrations sanguines du médicament après administration par différentes voies (**Lelong, 2015**).

### I.6.1.2. Absorption des médicaments par voie orale

L'absorption des médicaments oraux est une étape très importante et qui dépend principalement de trois facteurs : la solubilisation du composé dans le tube gastro-intestinal ; sa perméabilité membranaire et son niveau de métabolisme de premier passage (**Ansel et al, 1999**). Afin de pouvoir être absorbé, un médicament doit à tout prix être solubilisé dans le fluide intestinal. La dissolution d'un médicament dépend principalement de sa formulation, de sa solubilité intrinsèque, pour les acides et les bases, du pH intestinal. Une fois solubilisé, le composé devra diffuser au travers de la membrane intestinale pour atteindre le système porte. On appelle la capacité d'un médicament à diffuser au travers des membranes la perméabilité. L'absorption d'un composé avec une bonne perméabilité peut aussi être diminuée par des transporteurs d'efflux (**Edward et al, 2008**).

Pour se rendre à la circulation systémique, le médicament ne doit pas être dégradé par les enzymes du métabolisme présentes dans l'intestin et le foie. Puisque les molécules absorbées par la voie orale n'ont pas d'autres choix que de traverser le foie, elles sont fortement exposées aux enzymes du métabolisme. Il s'agit de l'effet de « *premier passage hépatique* » (**Edward et al, 2008**).



**Figure 3 :** Différents sites d'administration du médicament (originale).

On appelle la proportion de médicament qui atteint la circulation systémique la biodisponibilité (%F). Elle est toujours rapportée à une administration intraveineuse (i.v). On la calcule avec l'équation suivante :

$$\%F = \frac{AUC \text{ p.o}}{AUC \text{ i.v}} \times \frac{Dose \text{ i.v}}{Dose \text{ p.o}}$$

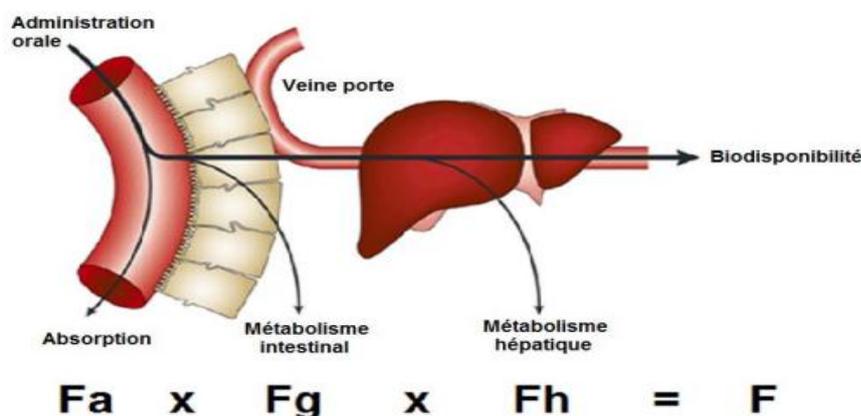
Où :

**AUC** est la surface sous la courbe des concentrations plasmatiques.

**Dose i.v** : la dose administrée par voie intraveineuse.

**Dose p.o** : la dose administrée par voir orale.

De plus, on peut séparer la biodisponibilité en trois parties distinctes : la fraction absorbée (Fa), la fraction non métabolisée par l'intestin (Fg) et la fraction non métabolisée par le foie (Fh) (**Figure 4**). Ainsi, (Fa) dépend de la solubilité et de la perméabilité du médicament et Fg et Fh du niveau de métabolisme intestinal et hépatique respectivement (**Yang et Yu, 2007**).



**Figure 4 :** Notion de biodisponibilité (Van de Waterbeemd et Gifford, 2003).

Deux autres paramètres importants de l'absorption sont la concentration maximale (C<sub>max</sub>) et le temps au C<sub>max</sub> (T<sub>max</sub>). Ces deux paramètres seront affectés par des changements d'absorption. Ainsi, si la vitesse d'absorption est diminuée, le T<sub>max</sub> sera augmenté et le C<sub>max</sub> diminué et vice-versa (**Edward et al, 2008**).

### **I.6.2. Distribution**

La distribution est la répartition du principe actif du médicament depuis son entrée dans la circulation générale jusqu'à son arrivée au site d'activité. Le principe actif se présente sous deux formes dans le plasma : une **forme libre** active, qui permet au PA de diffuser librement et de rejoindre l'organe cible où il exercera son action ; une **forme liée** aux protéines plasmatiques, sous laquelle le principe actif est incapable de se diffuser, donc d'atteindre son site d'action. Les médicaments acides se lient principalement à l'albumine, et les médicaments basiques, à l'acide alphaglycoprotéique (**Cloutier et al, 2005**).

On représente l'étendue de distribution d'un composé par le volume de distribution (V<sub>d</sub>) qui se calcule avec l'équation suivante :

$$Vd = \frac{Dose}{C_0}$$

Où C<sub>0</sub> est la concentration initiale suite à une administration intraveineuse (**Edward et al, 2008**).

### **I.6.3. Métabolisme**

Le métabolisme comprend les biotransformations – ou modifications chimiques – que subit une substance médicamenteuse dans l'organisme. Le résultat de ces biotransformations est généralement la réduction de la substance en une forme inerte, appelée métabolite inactif, plus facilement éliminable (**Cloutier et al, 2005**). Les substances médicamenteuses ne sont cependant pas toutes inactivées par le métabolisme, pour certaines, il peut arriver que l'activité soit augmentée ou que le métabolite produit soit toxique. Certains principes actifs naturellement éliminables ne nécessitent pas cette dernière étape (**Gibson et Skett, 2001**).

Le métabolisme a principalement lieu dans le foie, organe très vascularisé et riche en enzymes. Mais plusieurs autres organes comme les poumons, le tube digestif et les reins y contribuent également, mais de façon beaucoup moins importante (**Cloutier et al, 2005**). De plus, l'intestin peut avoir un rôle particulièrement important puisque il exprime également des enzymes de métabolisme étant donné que les médicaments administrés oralement n'auront pas d'autres choix que de traverser les cellules intestinales (**Thelen et Dressman, 2009**).

Afin de rendre la molécule polaire et plus facilement éliminable, l'organisme procède par deux catégories de réactions : les réactions de Phase I et les réactions de Phase II. Les réactions de phase I sont des réactions d'oxydation qui modifient la structure de la molécule via le cytochrome

P450. Alors que les réactions de Phase II sont l'addition d'un groupement polaire dites réactions de conjugaison. Une réaction de Phase II peut avoir besoin au préalable d'une réaction de phase I pour avoir lieu, mais peut aussi survenir directement sur la molécule mère (**Edward et al, 2008**) (**Gibson et Skett, 2001**).

#### **I.6.4. Excrétion**

L'excrétion est la phase qui consiste à éliminer le médicament de l'organisme soit sous forme inchangée soit sous forme de métabolites. Elle est assurée par divers organes : le rein – le plus important –, le foie (voie biliaire) et parfois même par les poumons. Une portion de certains médicaments peut se retrouver dans la salive, la sueur ou le lait maternel (**Cloutier et al, 2005**).

Trois mécanismes principaux sont responsables de l'excrétion rénale des médicaments : la filtration glomérulaire, permet la filtration des molécules non liées aux protéines plasmatiques dont le poids moléculaire est inférieur à 20 000 daltons ; la sécrétion tubulaire, assure un transport du médicament du sang vers la lumière tubulaire ; enfin, les médicaments présents dans le tubule peuvent être réabsorbés dans la circulation. L'ensemble de ces mécanismes détermine la fraction de médicament qui sera éliminé dans les urines (**Rang et al, 2007**).

Dans la voie biliaire, le médicament et ses métabolites seront excrétés dans les fèces, mais dans certains cas, il peut y avoir une réabsorption du médicament par l'intestin : on parlera de cycle entéro-hépatique.

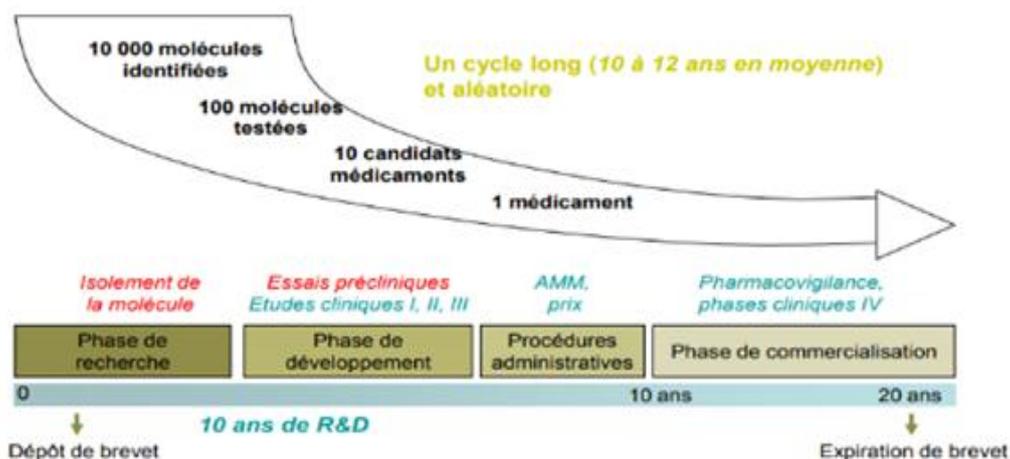
Le paramètre pharmacocinétique qui représente l'excrétion est la clairance CL. La clairance correspond au volume du plasma complètement épuré du médicament en fonction du temps. On peut déterminer la clairance plasmatique totale  $CL_T$  d'un médicament après une administration intraveineuse avec l'équation suivante :

$$CL_T = \frac{Dose}{SSC} = CL_H + CL_R + CL_{autres}$$

Où  $CL_H$  est la clairance hépatique par métabolisme,  $CL_R$  la clairance rénale et  $CL_{autres}$  la clairance par les autres mécanismes d'élimination non standards (**Rang et al, 2007**).

#### **I.7. Développement du médicament**

L'obtention d'un nouveau médicament est une étape de longue haleine qui fait interagir un grand nombre d'acteurs aussi bien dans le domaine médical qu'administratif (**figure 5**). Le temps nécessaire entre la découverte d'une molécule prometteuse et l'arrivée du médicament sur le marché est de l'ordre d'une dizaine d'années.



**Figure 5 :** Étapes de développement d'un médicament (**Sciences du médicament, 2017**).

### I.7.1. Recherche fondamentale

La recherche fondamentale est une étape obligatoire pour la fabrication d'un médicament. Elle consiste en la recherche de la compréhension du fonctionnement normal mais aussi pathologique des organismes. Pour cela la Food and Drug Administration FDA a mis sur pied un groupe de travail (Critical Path Initiative) dont l'objectif est de trouver des façons d'améliorer le processus de développement des médicaments. La première étape franchie fut d'identifier et de prioriser les problèmes majeurs ainsi que les domaines les plus susceptibles d'aider à un développement plus efficace (**FDA, 2004**).

Ces molécules peuvent être obtenues par trois moyens différents (**Peltier, 2011**):

- par isolement d'une molécule naturelle issue de végétaux, d'animaux, de minéraux, qui peut avoir un effet bénéfique sur l'homme (par exemple : antibiotique) ;
- par synthèse chimique de molécules dérivées de substances que l'on connaît et dont on suppose les propriétés thérapeutiques, ou de substances inconnues mais qui possèdent une structure potentiellement intéressante.
- Médicaments obtenus par biotechnologie (par exemple : insuline, les hormones peptidiques, les anticorps monoclonaux...Etc)

Il existe également des recherches qui visent à améliorer la forme galénique des médicaments, c'est-à-dire les modes d'administration de molécules déjà existantes.

En effet, sur 5000 à 10 000 molécules initialement choisies comme étant de potentiels futurs médicaments pour une cible thérapeutique définie, une seule en moyenne va aller jusqu'au bout du processus et obtenir une autorisation de mise sur le marché (**Berthelemy, 2014**). On rapporte que le développement d'un seul médicament est un processus coûteux car il représente un investissement de 800 millions à 1 milliard d'euro d'après PhRMA (Pharmaceutical Research and

Manufacturers of America) et un processus long car il nécessite en moyenne de 10 à 15 ans de recherche et de développement (**PhRMA, 2006**) (**Grudzinskas, 2001**).

### **I.7.2. Développement préclinique**

L'étude préclinique permet de comprendre le mode d'action du médicament et de tester l'activité et la toxicité des molécules in vitro et in vivo sur l'animal avant son administration à l'homme.

#### **I.7.2.1. Etudes de l'activité pharmacodynamique**

L'activité de la molécule doit être établie avec précision, et son mode d'action doit être connu. Ces études se font sur l'animal entier, sur des organes isolés, des cellules isolées... permettent de déterminer d'une manière approfondie les propriétés principales du médicament et de mieux comprendre son fonctionnement (**Peltier, 2011**).

#### **I.7.2.2. Études de pharmacocinétique**

Ces études mettent en évidence le comportement et le devenir de la molécule dans un organisme vivant et son élimination.

#### **I.7.2.3. Etudes d'innocuité**

Les études de toxicité doivent se faire chez au moins deux espèces de mammifères, dont l'une autre que rongeur (par exemple chez le chien ou chez le singe). Ces études visent entre autres à caractériser la toxicité du produit ainsi ses effets indésirables dans certains organes cibles, et ce par rapport à la dose et à la durée du traitement (**Atkinson et al, 2012**). Ces études permettent la détermination d'une dose sans risque pour l'homme pour l'entrée en phase I des essais cliniques. On établit une marge de sécurité basée sur la dose ou si possible sur l'exposition plasmatique, située entre la NOEL (No Observed Effect Level - dose sans effets) et la NOAEL (No observed Adverse Effect Level – dose sans effets défavorables) (**Detilleux et al, 2010**).

La toxicité doit être évaluée suivant une dose unique (toxicité aiguë), souvent à des doses croissantes à court terme (toxicité subaiguë), et suivant des doses répétées à long terme (toxicité chronique). Les effets toxiques sur la reproduction doivent également être évalués ainsi que la génotoxicité. Les études précliniques donnent des renseignements utiles pour estimer une dose de départ qui soit la plus sécuritaire possible pour les premiers essais cliniques chez les humains (**Atkinson, 2012**)(**Santé Canada, 1998**).

### **I.7.3. Etudes cliniques**

Les études cliniques ont pour objectif de démontrer l'efficacité et l'innocuité du produit chez l'humain. Un protocole strict est alors mis en place selon les bonnes pratiques cliniques (BPC), et

son suivi est contrôlé par des organismes officiels pour assurer la protection des personnes volontaires aux essais cliniques appelés comités de protection des personnes (CPP) ou comité d'éthique.

« La firme doit déposer une demande d'autorisation auprès des autorités réglementaires et doit justifier exactement pourquoi elle fait l'essai et quelles sont les conditions de sécurité » **(Philippe Lechat, Afssaps)**. « L'autorisation des essais cliniques est donnée par l'autorité réglementaire. En plus, l'autorisation des essais cliniques passe par l'avis du CPP ou comité d'éthique, donc il y a un double filtre. Les CPP évaluent aussi la méthodologie et la qualité de l'information de ces essais. » **(Peltier, 2011)**.

Ces études comportent 4 phases :

➤ **Phase 1**

La phase 1 correspond à l'évaluation de la toxicité et de la tolérance du médicament. Généralement, cette phase a lieu sur un nombre limité de volontaires sains, auxquels sont injectées des doses croissantes de médicaments, sous haute surveillance. Les résultats permettent de vérifier les doses tolérables du médicament chez l'homme qui avaient été calculées à partir des résultats obtenus chez l'animal. De plus, on recherche d'éventuels effets secondaires et l'on étudie le devenir du médicament dans l'organisme **(Grudzinskas, 2001) (Santé Canada, 1997)**.

➤ **Phase 2**

La phase 2 correspond à la vérification de l'efficacité du médicament, et à la détermination de la relation dose-effet chez les patients. Elle permet donc d'explorer le potentiel thérapeutique d'un médicament et de voir si le mécanisme proposé chez l'animal se traduit par une activité cliniquement significative et ce avec un bon profil d'innocuité chez un petit groupe de patients volontaires.

➤ **Phase 3**

Un essai à grande échelle, qui est effectué sur un large panel de patients, représentatif des personnes à qui est destiné le médicament. Celui-ci doit être comparé à un médicament déjà existant, ou au cas échéant à un placebo. Ces tests sont effectués en double-aveugle, où ni le médecin ni le patient ne sait quelle molécule est donnée. Les essais de phase 3 doivent permettre d'établir le rapport bénéfices/risques du médicament étudié, ce qui implique de pouvoir établir des comparaisons avec les traitements de référence utilisés dans la pathologie visée par l'indication du nouveau médicament **(Cucherat, 2009)**.

La phase 3 aboutit à la présentation du dossier d'Autorisation de mise sur le marché (AMM). Si elle est accordée, cette AMM comportera la définition des conditions d'utilisation du médicament

rassemblées dans le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP), la notice d'information aux patients et les conditions d'étiquetage des boîtes de médicaments.

Enfin, parallèlement au développement des médicaments chez l'adulte, les industriels doivent déposer et suivre un plan de développement des médicaments chez l'enfant afin que les présentations galéniques et les doses puissent être correctement adaptées chez l'enfant. Il s'agit des plans d'investigations pédiatriques (PIP) (**Europa, 2014**).

#### ➤ **Phase 4**

Elle a lieu après l'obtention de l'AMM du médicament. C'est une longue phase de surveillance, destinée à détecter d'éventuels effets secondaires du médicament tout au long de sa commercialisation. La surveillance et les études réalisées en post-AMM doivent se conformer aux plans de pharmacovigilance et au plan de gestion des risques (PGR) définis dans le cadre de l'AMM (**Peltier, 2011**).

#### **1.7.4. Dossier d'AMM ou Décision d'enregistrement DE**

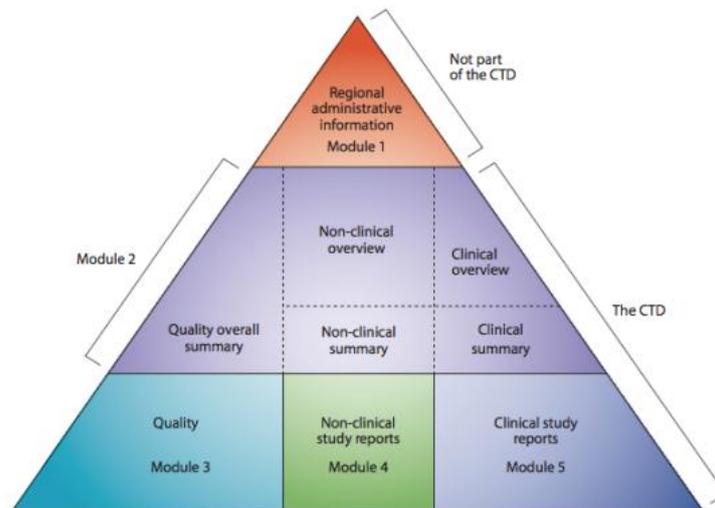
Le dossier de demande d'AMM est présenté par le laboratoire pharmaceutique aux autorités réglementaires des médicaments. C'est un premier document réglementaire permettant la commercialisation du produit. Il comporte plusieurs parties dont la structure est harmonisée au niveau international: la qualité, l'efficacité et la sécurité, d'après les données obtenues au cours des études cliniques et précliniques (**Dangoumau et al, 2006**).

- **Qualité** : renseigne tous les aspects liés à la fabrication industrielle du médicament : principalement la production des matières premières, du produit fini, et les procédures de contrôle mises en place pour garantir une parfaite reproductibilité du procédé de fabrication.
- **Sécurité** : compile les études conduites lors du développement préclinique, c'est à dire les données de comportement in vivo dans l'organisme non humain du médicament : pharmacologie, toxicologie et pharmacocinétique principalement.
- **Efficacité** : correspond à l'ensemble des résultats des études cliniques, menées sur l'homme sain et ou malade, qui permettent de définir les conditions exactes de l'utilisation du médicament et d'établir le rapport bénéfice / risque qui doit être favorable en vue de son utilisation commerciale (**Peltier, 2011**).

##### **1.7.4.1. Format CTD**

Le dossier doit être présent sous un format « Common Technical Document » (CTD) (**figure6**) qui est une forme de présentation du dossier pharmaceutique harmonisée, recommandée par l'ICH (International Conference On Harmonization) qui pour les industries, a permis les soumissions de demandes d'AMM sous le même format, qu'importe l'autorité réglementaire à

laquelle s'adresse le demandeur (Agence Nationale de Sécurité du médicament et des produits de santé, 2014) (Dangoumau et al, 2006).



**Figure 6 :** Triangle CTD : Common Technical Document organisé en cinq modules : le module 1 est spécifique de la région et les modules 2, 3,4 et 5 sont destinés à être communs à toutes les régions (Dangoumau et al, 2006).

#### **I.7.4.2 Procédure d'enregistrement en Algérie:**

La demande d'enregistrement d'un médicament en Algérie est adressée à l'agence nationale des produits pharmaceutiques (ANPP). L'AMM est accordé par l'ANPP après avis de la commission nationale de nomenclature (Décret, 1992) (Voir l'annexe F).

# **Chapitre II**

## **Absorption intestinale des médicaments**

## II.1. Définition de l'absorption intestinale

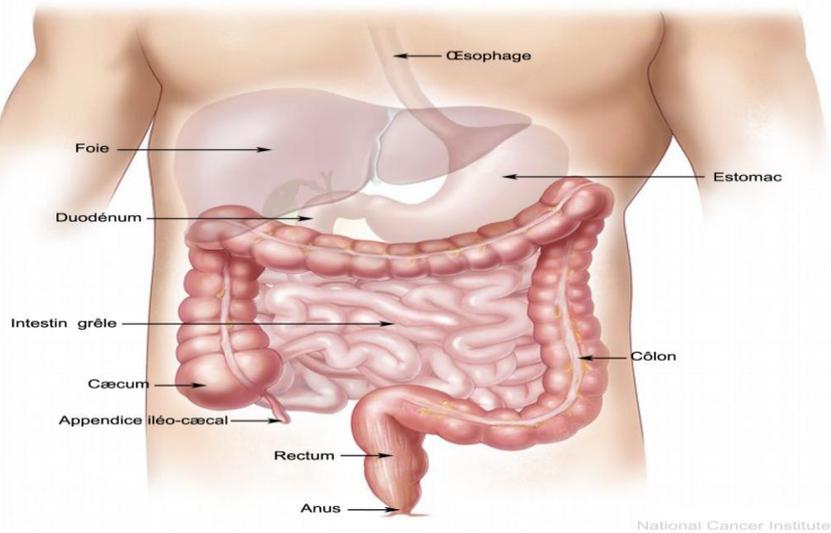
L'absorption intestinale est définie comme l'ensemble des mécanismes par lesquels une substance pénètre naturellement dans l'organisme à travers la paroi de l'intestin afin d'atteindre la circulation systémique. Ce phénomène module la biodisponibilité d'une molécule administré par voie orale (**Faure et al, 2014**). Cette dernière est la voie d'administration de choix des médicaments. Elle présente de nombreux avantages car elle permet une bonne observance et acceptabilité par le patient, du fait de sa possibilité d'auto-administration sans douleur. Elle utilise le tractus gastro-intestinal TGI pour introduire les molécules actives généralement sous forme solide (comprimés, gélules...) dans l'organisme. Après son administration, le principe actif PA doit dans un premier temps, se solubiliser, puis être absorbé à travers la membrane intestinale, le plus souvent au niveau de l'intestin grêle (approximativement 90%), pour atteindre la circulation générale afin de promouvoir son effet pharmacologique (**Chen et Langer , 1998**).

## II.2. Physiologie et anatomie de l'intestin

La majorité des substances actives sont absorbées au niveau du TGI -qui débute avec la bouche et se termine par l'anus- plus particulièrement dans la partie haute de l'intestin. L'intestin est constitué de l'intestin grêle, du colon (gros intestin) et se termine par le rectum. L'intestin grêle s'étend du pylore jusqu'à la valvule iléocœcale du colon. Il est composé de 3 segments, le duodénum, jéjunum et l'iléon (**Reed et Wickham, 2009**). En regroupant ces trois parties, l'intestin grêle atteint une taille comprise entre 5 et 6 mètres et un diamètre de 3 centimètres en moyenne (**Gosling et al, 2003**) (**figure 7**). Sa composition enzymatique, son pH et les structures spécifiques de sa muqueuse sont des paramètres intervenant dans la capacité d'absorption des molécules actives (**Reed et Wickham, 2009**). L'absorption des PAs est plus importante au niveau du jéjunum et de l'iléon grâce à la présence d'une forme cylindrique constituée de valvules conniventes, de nombreuses villosités et microvillosités, augmentant la surface d'échange (**Ganong, 2005**). Le pH intestinal est entre 5 et 8 (**Avdeef, 2003**). Le pH dans les différentes parties d'intestin grêle ainsi que le temps de transit intestinal sont montrés dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Temps de transit et pH dans l'intestin grêle (**Aïache et al, 1978**)

Région	pH moyens	Temps de séjour moyens
Duodénum	4 à 6	5 à 15 minutes
Jéjunum	6 à 7	2 à 3h30
Iléon	7 à 8	3 à 6h (stagnation assez longue avant le passage dans le cæcum)

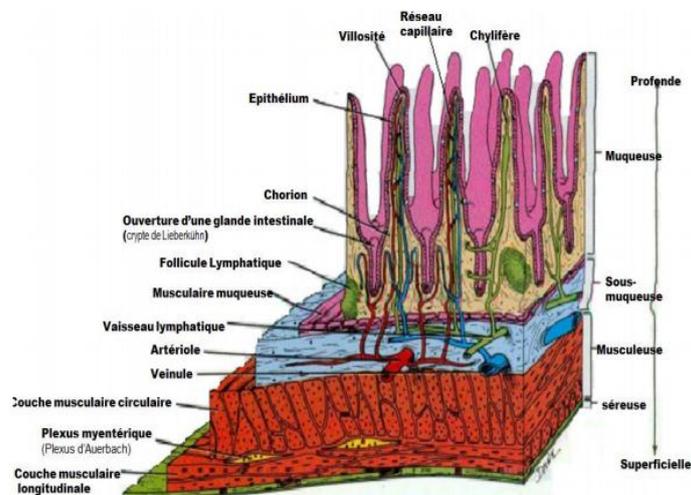


**Figure 7 :** Organisation de l'intestin humain selon l'axe gastro-colique (Martzolff, 2007).

### II.2.1. Membrane intestinale

La membrane intestinale se divise en quatre couches cellulaires (Figure 8) (Windelspecht, 2004) (Lucius et al, 2011) :

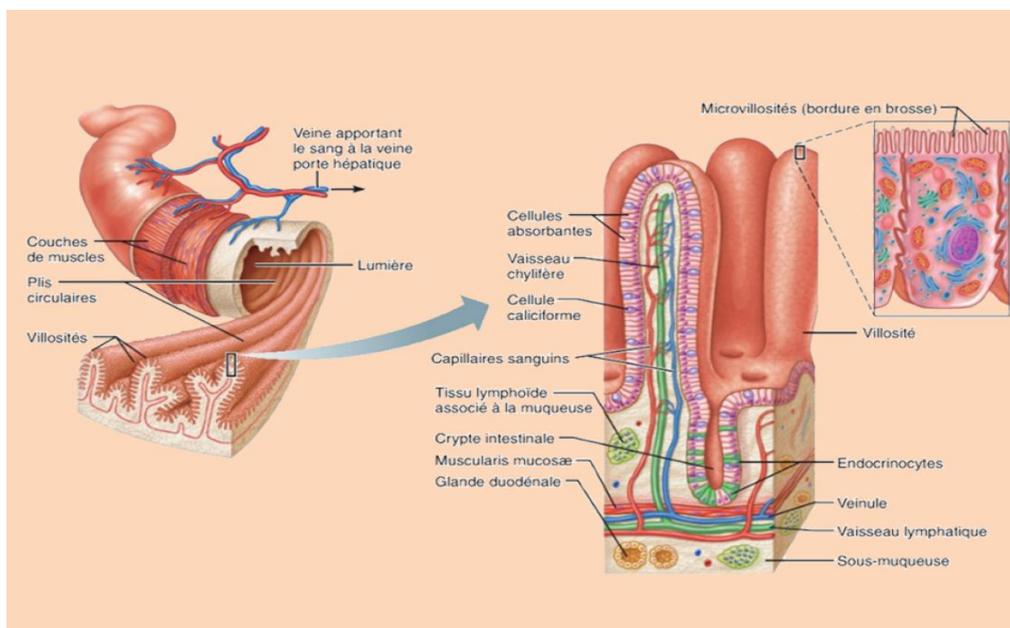
- **Muqueuse**, en contact direct avec la lumière intestinale, est bordée par des cellules épithéliales de différentes natures.
- **Sous-muqueuse** est un tissu conjonctif dense qui soutient la muqueuse. Elle est composée de vaisseaux sanguins et lymphatiques et du tissu nerveux (Meissner).
- **Musculeuse** est composée de deux couches de muscles lisses, entre lesquelles se situe le plexus nerveux myentérique d'Auerbach coordonnant la segmentation et le péristaltisme.
- **Séreuse**, est une couche protectrice constituée de tissu conjonctif lâche et forme le péritoine viscérale, recouvrant la musculeuse de l'intestin grêle à l'exception du duodénum.



**Figure 8 :** Coupe de l'intestin grêle montrant les chylifères et les vaisseaux sanguins du chorion (Tortora et Grabowski, 1994).

Le passage du médicament dans le sang s'effectue au niveau de la muqueuse intestinale. Lorsqu'on réalise une coupe dans l'intestin grêle, on observe un nombre considérable de replis appelés valvules conniventes (**Gosling, 2003**). Chacune de ces valvules porte elle-même 10 à 40 petits replis par millimètre carré appelés les villosités intestinales dont chacune mesure d'environ 1 millimètre (**Figure 9**) (**Ganong, 2005**). La membrane des cellules qui compose chacune des villosités est elle-même repliée en microvillosités d'environ 1 micromètre, ces derniers vont constituer une bordure en brosse (**Boroujerdi, 2015**).

La surface intestinale est estimée à plus de 250 mètre carré grâce aux replis de l'intestin, aux replis de la paroi intestinale, aux villosités et aux microvillosités. Chaque villosité contient un réseau lymphatique et de très nombreux capillaires sanguins (**figure 10**), qui grâce à eux, les produits captés par les cellules dans la lumière intestinale passent ensuite dans le sang (**Boroujerdi, 2015**).



**Figure 9** : Structure macroscopique de l'intestin grêle (**Marieb et Hoehn, 2010**).

## II.2.2. Cellules constitutives de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est composé d'une monocouche de différentes cellules, liées les unes aux autres par des jonctions. Parmi lesquelles on retrouve :

- ✓ **Cellules souches « stem cells »** situées au fond des cryptes, assurent un renouvellement rapide des cellules épithéliales de l'intestin grêle environ tout les 5 à 6 jours (**Messmann, 2011**).
- ✓ **Entérocytes** représentent environ 95% de la population cellulaire totale des villosités intestinales, responsables de l'absorption intestinale grâce à la présence des microvillosités à leur surface apicale, reliées par des jonctions serrées (**Tortora et Grabowski, 1994**). Ces jonctions sont retrouvées de manière régulière tout autour de la cellule intestinale, et ont

pour rôle d'empêcher la diffusion de macromolécules, mais aussi de limiter le passage de certaines molécules plus petites au niveau des espaces intercellulaires (**Lodish et al, 2005**).

- ✓ **Cellules caliciformes** ou « **goblet cells** » sont des cellules sécrétrices de mucus protègent l'intestin contre les agents pathogènes, les toxines et les blessures induites mécaniquement. Il joue également le rôle de lubrifiant permettant le transport du chyme de l'intestin grêle jusqu'au colon (**Johansson et al, 2011**). Dans l'intestin grêle, le mucus est à une seule couche, tandis que dans le colon, il est constitué de deux couches (**Johansson et al, 2013**).
- ✓ **Cellules entéroendocrines** secrètent des hormones qui contrôlent l'activité du TGI (**Reed et Wickham, 2009**).
- ✓ **Cellules paneth**, des cellules exocrines productrices d'enzymes qui protègent l'intestin contre les bactéries (**Reed et Wickham, 2009**).
- ✓ **Cellules M**, localisées au niveau des plaques de Peyer, responsable de l'absorption par voie lymphatique (**Reed et Wickham, 2009**).

### **II.2.3. Enzymes impliquées dans le métabolisme intestinal**

L'intestin est l'organe extra-hépatique exprimant le plus d'enzymes du métabolisme qui a lieu lors de la phase d'absorption des xénobiotiques, administrés par voie orale, au moment où les molécules doivent traverser l'épithélium intestinal pour atteindre la circulation systémique. Il joue donc un rôle important dans l'effet de premier passage (**Lin et al, 1999**).

#### **II.2.3.1. Enzymes de phase I :**

Chez l'humain, les CYP3A4 et CYP3A5 sont certainement les enzymes intestinales de phase I les plus importantes, ils métabolisent un grand nombre de composés par des réactions d'hydroxylation et de N-déalkylation et limite ainsi leur absorption, et ils correspondent seuls à environ 80 % du contenu total de CYP (**Kaminsky et Zhang, 2003**). En comparaison, le contenu total en CYP dans l'intestin représenterait environ 1 % de celui du foie (**Paine et al, 1997**).

L'expression des CYP dans l'intestin est plus élevée dans le duodénum et le jéjunum et diminue considérablement dans l'iléum avec pratiquement aucune expression dans le colon humain. De plus, les CYP sont exprimées plus fortement dans les entérocytes matures présents au bout des villosités intestinales (**Lin et al, 1999**).

#### **II.2.3.2. Enzymes de phases II :**

On trouve des acétyltransférases, des glutathion S-transférases, des méthyltransférases, des sulfotransférases et des UDP- glucuronyltransférases(UGT), aminopeptidases qui sont exprimés par les entérocytes, trypsine et carboxypeptidases qui proviennent du pancréas (**Kaminsky et Zhang, 2003**).

La glucuronidation est la réaction de phase II la plus importante et la mieux caractérisée du métabolisme intestinal des médicaments (**Kaminsky et Zhang, 2003**). Plusieurs isoformes des UGT sont exprimées dans le tube gastro-intestinal, les UGT1A7, 1A8, 1A10 et 2B17 sont exprimés spécifiquement dans l'intestin et sont indétectables dans le foie. Contrairement aux CYP, les UGT ne diminuent pas systématiquement dans le colon (**Ohno et Nakajin, 2009**).

#### **II.2.3.3. Autres enzymes importantes :**

Outre le métabolisme de Phase I et de Phase II, l'intestin joue aussi un rôle important dans la conversion de plusieurs promédicaments. Par exemple, il arrive souvent qu'un groupement phosphate soit ajouté à une molécule afin d'améliorer sa solubilité. Dans ce cas, le promédicament sera converti en médicament à la membrane des cellules intestinales par l'alcaline phosphatase et sera rapidement absorbé (**Yuan et al, 2009**). La fosphénytoïne est un exemple de promédicament phosphate utilisé pour améliorer la solubilité de la phénytoïne (**Burstein et al, 1999**).

#### **II.2.4. Transporteurs membranaires d'efflux intestinal**

La phospho-glycoprotéine (P-gp) est une protéine de la membrane cellulaire exprimée chez l'homme par le gène MDR (multidrug resistance). Elle appartient à la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) qui sont des transporteurs transmembranaires fonctionnant comme une pompe ATP- dépendante (Adénosine TriPhosphate). Elle est présente notamment au niveau des cellules endothéliales des capillaires sanguins de la barrière hémato-encéphalique (BHE), et tout au long de l'intestin, davantage au niveau du jéjunum et de l'ileum, où elle est exprimée à la surface apical des cellules de l'épithélium (entérocytes). Elle participe à la protection du milieu intracellulaire en rejetant à l'extérieur de la cellule des molécules intracellulaire (**Lin et al, 1999**).

### **II.3. Mécanisme de l'absorption intestinale des médicaments**

Un médicament administré par voie orale, doit traverser plusieurs membranes cellulaires semi- perméables avant d'atteindre la circulation systémique. Ces membranes sont des barrières biologiques qui interdisent sélectivement le passage des molécules actives selon différents mécanismes (**Washington et Wilson, 2001**).

L'étude de la structure et de la fluidité de la membrane permettra de mieux comprendre les différents mécanismes d'absorption.

#### **II.3.1. Structure et composition de la membrane cellulaire**

La membrane cellulaire est composée d'une bicouche lipidique et de protéines transmembranaires : les protéines porteuses et les canaux ioniques. Ces constituants assurent son intégrité et sa fluidité membranaire (**Washington et Wilson, 2001**).

Les lipides membranaires possèdent une tête polaire hydrophile et de longues chaînes carbonées lipophiles, ces dernières présentent un milieu hydrophobe particulièrement imperméable aux ions et aux molécules polarisées. Ils sont composés majoritairement en trois familles : les phosphoglycérides, sphingolipides et le cholestérol (**Cooper, 2009**). Les feuillettes extérieure et intérieure de la bicouche cellulaire de la membrane intestinale sont de composition lipidique différente, ce qui leur permet d'assurer des fonctions distinctes (**Karp, 2013**). Les proportions et les types de lipides qui composent les membranes influencent donc leur comportement et leur fluidité, cette dernière joue un grand rôle dans l'absorption, en d'autres termes, plus la membrane est fluide, plus la perméabilité est grande (**Leclaire, 2014**).

### II.3.2. Mécanismes d'absorption

Le choix de mécanismes et de voies d'absorption est souvent en fonction de la nature et des propriétés physicochimiques de la molécule. Le passage de cette molécule à travers l'épithélium suit deux voies (**Smith et al, 1992**):

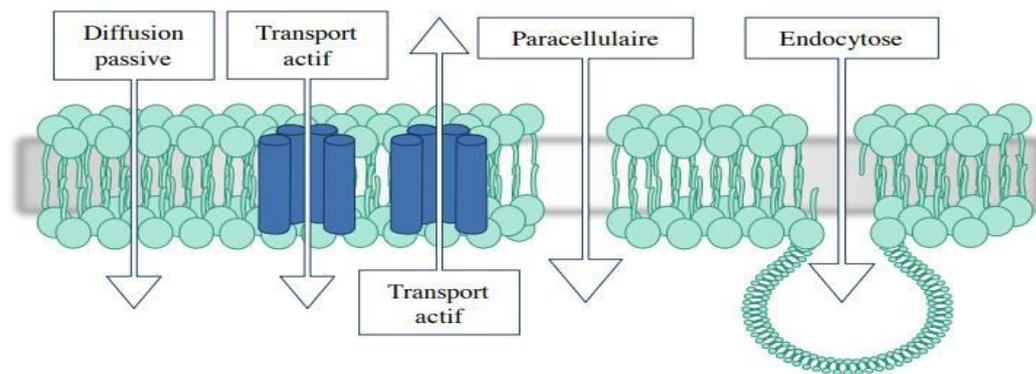
- ✓ **Voie transcellulaire**, correspond au passage de molécule à travers les cellules intestinales.
- ✓ **Voie paracellulaire** est le passage d'ions et de petites molécules hydrophiles polaires entre deux cellules épithéliales adjacentes au niveau des jonctions serrées.

Les cellules épithéliales montrent une polarisation permettant la génération de gradient de concentration par expression de transporteurs spécifiques, tant sur le côté apical que sur le côté basolatéral. Des systèmes de transport spécifique et non spécifique peuvent être distingués (**Gropper et Smith, 2012**):

- **Diffusion passive** est le mécanisme principal de l'absorption des médicaments. Les médicaments traversent la bicouche lipidique de la membrane selon un gradient de concentration, du côté le plus concentré, vers le côté le moins concentré. Ce passage ne nécessite pas un apport énergétique, n'est pas saturable et est non spécifique (**Faure, 2014**) (**Leblanc et al, 1997**).
- **Diffusion facilitée** est le passage des molécules à travers la membrane à l'aide des protéines transporteuses paracellulaires ou transcellulaires. Ce passage ne nécessite aucune source d'énergie et se fait également selon un gradient de concentration, mais une reconnaissance cellulaire de la molécule par la protéine transporteuse spécifique est nécessaire. Ce mécanisme est saturable à des concentrations élevées en médicament et elle peut être inhibée de façon compétitive par un analogue structural (**Faure, 2014**) (**Leblanc et al, 1997**).
- **Transport actif** est le passage sélectif des molécules à travers la membrane à l'aide d'une protéine transmembranaire. Il nécessite une reconnaissance cellulaire spécifique et un apport d'énergie et s'effectue contre un gradient de concentration. La compétition peut survenir

entre deux molécules différentes qui se lient au même site ou survenir par saturation du site de liaison par une même molécule présente en trop grande concentration (**Faure, 2014**) (**Leblanc et al, 1997**).

- **Endocytose** désigne l'incorporation (absorption) de particules (phagocytose) ou de liquide (pinocytose) par l'invagination de la membrane cellulaire formant finalement des vésicules intracellulaires. une dépense énergétique est nécessaire. Il permet le transport des macromolécules et joue un petit rôle dans l'absorption des médicaments (**Leblanc, 1997**).
- **Filtration** se fait par passage des ions et de très petites molécules neutres, de poids moléculaire entre 150 et 400 gramme/ mole, à travers des pores et exige un mouvement de solvant (gradient hydrostatique) résultant d'une différence de pression de part et d'autre de la membrane (**Leblanc et al, 1997**).



**Figure 10** : Mécanismes d'absorption des molécules par la paroi intestinale (**Leclaire, 2014**).

#### II.4. Facteurs influençant l'absorption intestinale

Tous les facteurs susceptibles de modifier les barrières physiques (couche de mucus et la membrane plasmique) et biochimiques peuvent également entraîner une modification de la biodisponibilité. En relation avec divers paramètres liés à l'individu ou liés au médicament, on cite : pH intestinal, vidange gastrique, alimentation, liposolubilité, dissolution, interactions médicamenteuses.

- ✓ Caractéristiques du médicament

##### • Caractères physico-chimiques

Les médicaments présentent en générale, soit un caractère acide faible ou base faible, ils seront donc susceptibles de s'ioniser en fonction du pH du milieu, et de leur pka, selon l'équation H/H d'Henderson-Hasselbach, par conséquent conditionnent leur site d'absorption (**Leblanc et al, 1997**).

Pour les bases, la formule d'Henderson-Hasselbach s'écrit comme suit :

$$\log \frac{\textit{non ionisé}}{\textit{ionisé}} = \textit{pH} - \textit{pKa}$$

Et pour les acides elle devient :

$$\log \frac{\textit{non ionisé}}{\textit{ionisé}} = \textit{pKa} - \textit{pH}$$

#### • **Stabilité**

La stabilité du PA, sous forme solide ou en solution à divers pH, doit être étudiée. Par exemple un produit instable en milieu acide ne doit pas être administré par voie orale donc il faudra concevoir un enrobage gastro-résistant qui protège le PA des agressions, ou modifier la structure chimique de la molécule pour la rendre résistante. A l'inverse, certaines molécules doivent passer par un milieu acide pour être activées (**Leblanc et al, 1997**).

#### • **Hydro/liposolubilité**

Le caractère lipidique de la membrane facilite le passage des substances lipophiles dont le coefficient de partage huile/eau est élevé. Ce coefficient a une grande influence sur le coefficient de diffusion ; plus il est élevé, plus la molécule a une affinité pour les lipides membranaires. Cependant, le degré d'hydro-solubilité doit être conservé pour assurer la dissolution du médicament. Les substances peu hydrosolubles sont faiblement résorbées au niveau digestif, donc l'hydrosolubilité est un facteur limitant de la dissolution des médicaments (**Leblanc et al, 1997**).

#### • **Taille et morphologie de la molécule**

La vitesse de transfert d'un médicament est inversement proportionnelle à sa masse molaire: plus l'agitation moléculaire est importante, plus la probabilité d'un transfert rapide à l'intestin de l'organisme est grande, cette agitation diminue avec l'augmentation de la taille des molécules médicamenteuses (**Leblanc et al, 1997**).

#### • **Forme galénique**

Elle joue un rôle important dans les différentes phases qui conduisent à la solubilisation du médicament (**Leblanc et al, 1997**).

- ✓ Les caractéristiques de l'individu

#### • **Vidange gastrique**

La vidange gastrique règle la vitesse à laquelle le médicament est transporté jusqu'à l'intestin grêle. Tout facteur susceptible de ralentir ou d'accélérer la vidange gastrique modifie la vitesse de résorption des médicaments, tel que l'exercice physique, l'alimentation, position corporelle et les interactions médicamenteuses (**Claverie et Hedde, 2003**).

#### • **Motilité intestinale**

Lorsque la motilité intestinale est élevée le temps de contact est réduit par conséquent l'absorption est faible et vice-versa (**Leblanc et al, 1997**).

- **pH digestif**

Le pH influe sur le degré d'ionisation des molécules et joue un rôle dans la mise en solution et l'absorption du médicament. Certains aliments, médicaments ou pathologies peuvent le modifier (**Leblanc et al, 1997**).

- **Alimentation**

La consommation d'aliments simultanément à l'ingestion de médicaments peut influencer le processus de résorption. En effet, la prise d'un repas entraîne des modifications physiologiques : augmentation du débit sanguin splanchnique, diminution de la vidange gastrique, stimulation de la sécrétion biliaire (**Leblanc et al, 1997**).

- **Couche de mucus**

La maturité de la couche de mucus et l'augmentation de son épaisseur dans le TGI, constitue, l'un des facteurs important qui participe à la restriction de la perméabilité intestinale des médicaments. Le mucus peut ralentir ou diminuer l'absorption de certaines molécules par la création des liaisons hydrogènes ou ioniques (**Barthe, 1999**).

- **Âge**

Au cours du vieillissement, il y a (**Leblanc et al, 1997**) :

- Une diminution de la sécrétion en acide gastrique.
- Une diminution de la vitesse de la vidange gastrique.
- Une diminution de la motilité gastro-intestinale.
- Une diminution du débit sanguin.

- **La grossesse**

S'accompagne de (**Leblanc et al, 1997**) :

- Une diminution de la motilité intestinale.
- Une augmentation du pH gastrique.

- **Traitements associés**

Les interactions médicamenteuses peuvent soit, rendre le médicament de traitement principal moins efficace, soit provoquer des effets secondaires non répertoriés ou soit augmenter l'action d'un des médicaments (**Izzo et al, 2001**).

- **Pathologies gastro-intestinales**

L'absorption intestinale des médicaments, peut être modifiée par les perturbations du transit intestinal (diarrhée et constipation), des sécrétions (absences des facteurs intrinsèques dans l'anémie de Biermer) et l'état de la muqueuse intestinale (maladie de Crohn). La plupart des infections diminuent l'absorption, alors qu'une inflammation peut l'augmenter (**Leblanc et al, 1997**).

- **Sécrétions intestinales**

Le transporteur membranaire P-glycoprotéine (P-gp) influence l'absorption de certaines substances médicamenteuses prises par voie orale par une diminution de leur absorption en excréant vers la lumière intestinale les PA. Parmi les médicaments transportés par cette protéine, on trouve des agents anticancéreux, des  $\beta$  bloquants, des antibiotiques (**Lin et al, 1999**).

# **Chapitre III**

## **Evaluation préclinique de l'absorption intestinale des médicaments**

### **III.1. Modèles expérimentaux d'étude de l'absorption**

Avant une première administration chez l'homme sain ou malade, tout nouveau traitement ou outil diagnostique ayant pour finalité une mise sur le marché, doit impérativement faire l'objet d'une évaluation préclinique avant leur mise sur le marché. Cette recherche doit permettre d'obtenir des données d'ordre pharmacocinétique ou d'établir les caractéristiques et performances du produit, ainsi que des informations sur le nouveau traitement ou outil diagnostique.

Différentes techniques permettent de faire le screening des molécules en terme de perméabilité ou de mieux comprendre certains mécanismes intervenant dans l'absorption. Les critères de choix de ces techniques sont le temps de mise en oeuvre, la simplicité, le cout et le domaine d'application.

#### **III.1.1. Modèles in vitro**

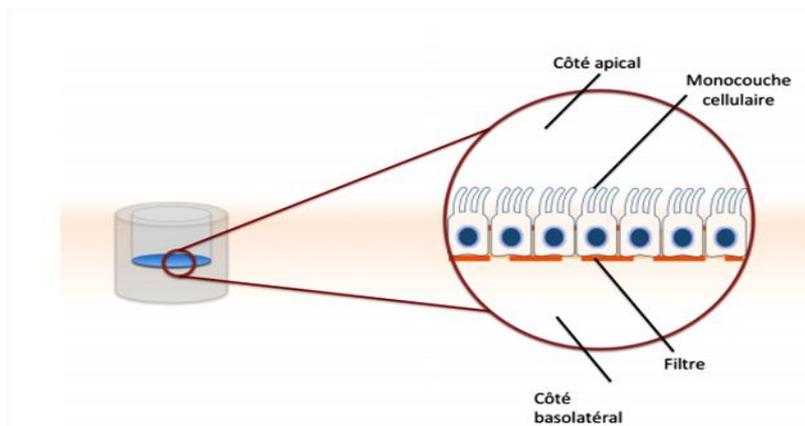
##### **III.1.1.1. Modèle cellulaires**

Les modèles cellulaires les plus utilisés sont obtenus à partir des variétés de cellules immortalisées. Ils peuvent être obtenus à partir du tissu normal, à partir des tumeurs chimiquement induites ou à partir des cancers du côlon humains qui est le plus utilisé généralement (**Barthe et al, 1999**).

##### **III.1.1.1.1. Modèle Caco2**

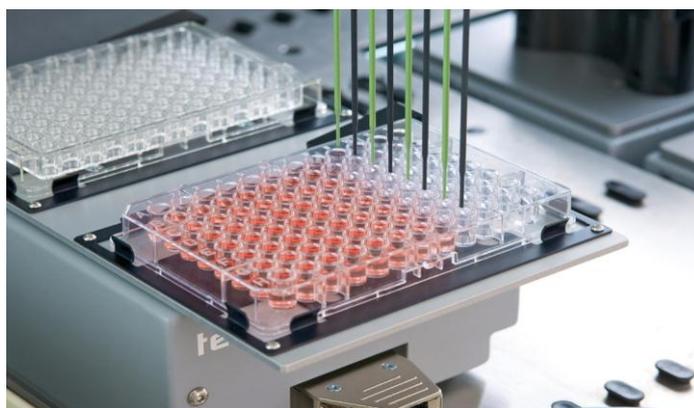
Ce modèle a été établi par Fogh en 1974 (**Barthe et al, 1999**). Dans les années 1990, Hidalgo et Al ont introduit une technique biologique permettant de mesurer l'absorption intestinale d'un grand nombre de molécules actives (**Hidalgo et al, 1990**). La lignée cellulaire Caco-2, dérivée d'adénocarcinome colique, se différencie spontanément pour former une monocouche polarisés d'entérocytes semblables à ceux présents dans l'intestin grêle, ce qui lui rend un des modèles cellulaires la plus utilisée pour modéliser in vitro l'épithélium intestinal (**Faure, 2014**)(**Carsten et kwang, 2011**).

En général, les cellules sont cultivées sur un support poreux, habituellement pendant une période de 15 à 21 jours dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco additionné de 20% de sérum de veau fœtal, 1% d'acides aminés non essentiels et 2 mM de L-glutamine. Elles sont cultivées dans une étuve à 37°C en présence de 10% de dioxyde de carbone et d'une humidité relative de 95%. Le milieu de culture est changé en deux jours. L'étude de transport est réalisée lorsque les cellules sont à confluence en modifiant le milieu de culture par une solution saline balancée de Hanks ajustée à un pH de 6,5 du côté apical et de 7,4 du côté basolatéral (**figure12**) (**Hubatsch et al, 2009**).



**Figure 11:** Diagramme d'une monocouche de cellules Caco-2 cultivées (Hubatsch et al, 2009).

Après une courte incubation de 30 min où les cellules sont maintenues sous agitation, les tampons sont remplacés avec de nouvelles solutions et les solutions diluées contenant les composés d'intérêt sont introduites du côté apical (ou basolatéral). À des intervalles donnés, des échantillons sont prélevés du côté basolatéral (ou apical) afin de déterminer la quantité de médicaments ayant diffusé (Hubatsch et al, 2009). En effet, la perméabilité du pôle apical vers le pôle basal renseigne sur l'absorption. Tandis que, la perméabilité du pôle basal vers le pôle apical renseigne sur les modalités de diffusion (Faure, 2014).



**Figure 12:** Remplissage automatique d'une plaque microtitre de 96 échantillons avec un milieu de culture cellulaire au moyen du système Freedom EVO® (Ong et al, 1996).

Lors de l'étude de passage de molécules d'intérêt pharmacologique à travers les cellules en culture, différents paramètres peuvent être déterminés (Faure, 2014) :

- **Le coefficient de perméabilité apparenté ( $P_{app}$ )**, qui représente la capacité du principe actif à diffuser à travers la membrane cellulaire. Il est exprimé en cm/s et répond à la formule (Faure, 2014) :

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0}$$

D'où :

- $\frac{\Delta Q}{\Delta t}$  (mM/s) est la vitesse de transport des médicaments (en  $\mu\text{g/s}$ ).
  - A est la surface de la membrane utilisée ( $\text{cm}^2$ ) ;
  - $C_0$  est la concentration initiale de la molécule dans le compartiment apical (mm).
- **Résistance électrique transépithéliale (TEER)** exprimée en  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  renseigne sur l'intégrité de la monocouche cellulaire Caco2 tout au long du processus de transport. Les cellules Caco2 ont un TEER entre 150-600  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . La valeur du TEER est déterminée par la relation :

$$TEER = A (R_{\text{monocouche cellulaire}} - R_{\text{filtre}})$$

Avec :

- $R_{\text{monocouche cellulaire}}$  est la résistance de la monocouche cellulaire
- $R_{\text{filtre}}$  est la résistance du filtre de la membrane de culture
- A est la surface de la membrane utilisée. (Faure, 2014) (Carsten et kwang, 2011)

#### III.1.1.1.2. Cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney)

La lignée cellulaire MDCK, originaire du rein de chien, a gagné une popularité et est devenue fréquemment utilisée par les compagnies pharmaceutiques pour l'évaluation du transport des médicaments. Lorsqu'elle est cultivée dans des conditions de culture standard, développe des jonctions serrées et forme des monocouches de cellules polarisées au bout de 3-7 jours (Carsten et kwang, 2011).

#### III.1.1.1.3. Cellules HT-29

Il s'agit d'une autre lignée cellulaire originaire des cellules cancéreuses du colon humain. L'évolution de cette lignée en monocouche n'est pas spontanée mais elle est très dépendante des conditions expérimentales avec lesquelles elles sont cultivées. Dans des conditions expérimentales standards et en présence de glucose, elles peuvent former des multicouches de cellules non différenciées. Lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu de culture exempt de glucose ou contenant un inducteur de différenciation, elles croissent en monocouche de cellules absorptives polarisées sécrétant du mucus (Ungell, 2003). Elle est utilisée pour étudier l'effet de la mucine sur l'absorption intestinale (Barthe et al, 1999).

#### III.1.1.1.4. Cellules de Lewis Lung Carcinoma –Porcine Kidney (LLC-PK1)

Ces cellules, dérivées des cellules épithéliales du rein de porc, sont des alternatives aux cellules Caco-2 pour évaluer la perméabilité des composés d'essai (Carsten et kwang, 2011). Une fois cultivées, ces cellules se développent rapidement en couche unitaire bien formée avec des microvillosités sur leur surface cellulaire apicale (COX et al, 2008). Les cellules LLC-PK1 sont plus facilement transfectées que les cellules Caco-2. Elles ont été rapportées comme un outil pour étudier le transport bidirectionnel des composés (Carsten et kwang, 2011).

### III.1.1.1.5. Cellules 2/4/A1

Tavelin et al ont récemment rapporté un nouveau modèle de cellules intéressantes le 2/4/A1 qui provient d'intestin de rat fœtal et forme des couches unitaires différenciées avec des jonctions serrées, des enzymes et des transporteurs (**Praveen et al, 2005**). Ce modèle pourrait mieux imiter la perméabilité de l'intestin grêle humain, en particulier en ce qui concerne le transport paracellulaire passif. Le taux de transport de composés médiocrement perméables (exp mannitol et créatinine) dans ces monocouches était comparable à celui de jéjunum humain et était jusqu'à 300 fois plus élevé que dans les couches unitaires des cellules Caco-2. Le transport des médicaments à haute perméabilité était comparable pour les deux modèles (caco 2 et 2/4/A1) (**Carsten et kwang, 2011**).

### III.1.1.2. Tests physico-chimiques

Ces dernières années, l'intérêt de recherche s'est focalisé sur l'aspect important de l'association des médicaments avec les membranes biologiques ainsi, la capacité de ce médicament à traverser la membrane cellulaire par un transport passif.

#### III.1.1.2.1. Test de coefficient de partage n-octanol/eau

Le coefficient de partage n-octanol/eau permet de mesurer la lipophilie de la molécule et donne une indication du comportement du médicament à travers une biomembrane. L'octanol est souvent utilisé pour ses propriétés lipophiles similaires à celles de la membrane biologique (**Avdeef, 2005**). Ce coefficient de partage, mesuré à l'aide d'une méthode par agitation de flacon comme suit (**Ruell et al, 2003**):

$$P_{oe} = \frac{C_{n-octanol}}{C_{eau}}$$

Avec :

- $P_{oe}$  : Coefficient de partage octanol/eau.
- $C_{n-octanol}$  : Concentration de la substance à l'équilibre dans du n-octanol.
- $C_{eau}$  : Concentration de la substance à l'équilibre dans l'eau.

Il est souvent quantifié par logarithme décimal du coefficient de partage (log P) (**Balon et al 1999**). Il existe un autre coefficient de partage, plus pertinent, qui prend compte du degré d'ionisation des composés et varie en fonction du pH est le coefficient de distribution (log D) (**Ashford, 2007**).

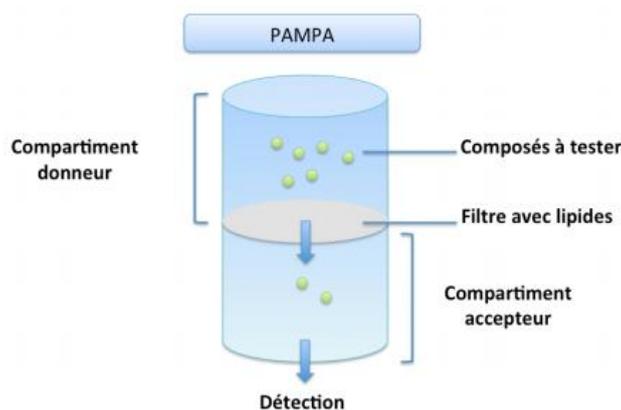
Malheureusement, l'octanol ne pourra jamais reproduire les interactions ioniques des phospholipides présents dans les membranes biologiques avec les molécules (**Balon et al, 1999**). et pour cette raison plusieurs systèmes utilisant des membranes biologiques ont été développées tels

que les modèles de liposomes (fabriquée par Bangham en 1965) ou la membrane artificiel immobilisé MAI (introduit en 1989 par Pidgeon et al) (Peetla et al, 2009) (Ong et al, 1996). Ce dernier est un test rapide, fiable et simple à réaliser et facilement automatisable puisque cette technique utilise une chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et une phase stationnaire en silice sur laquelle des phospholipides ont été greffées (Edward et al, 2008) (Ong et al, 1996).

Test PAMPA, une extension de la membrane artificielle, reste le modèle le plus utilisé par les entreprises pharmaceutiques et consiste à évaluer la perméabilité des molécules d'un compartiment donneur à un compartiment receveur à travers une couche de phospholipides.

### III.1.1.2.2. Test PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay)

Plus récemment, vers les années 2000, le test PAMPA a fait ses débuts comme test de criblage primaire de perméabilité. Le test original, introduit par Kansy et al de la compagnie Roche consiste à créer une membrane artificielle à partir de composés présents dans la membrane biologique et ceci en imbibant un filtre hautement poreux avec une solution lipidique de 10% lécithine de jaune d'œuf dans du n-dodécane. Le choix de la lécithine d'œuf est inspiré du fait que les phosphatidylcholines sont prédominantes dans les membranes cellulaires des mammifères. Cette membrane, sépare la solution contenant les composés à tester de la solution tampon, et permet l'étude cinétique d'uniquement la diffusion passive des molécules à tester et d'établir une corrélation hyperbolique entre les flux mesurés et les valeurs d'absorption humaine tout comme celles existantes pour le test Caco-2 (Kansy et al, 1998) (Avdeef, 2003).



**Figure 13** : Schéma de principe du test PAMPA (Egan et lauri, 2002).

La version commerciale de ce test est en « sandwich » et est constituée d'un ensemble de deux plaques 96 puits. Le dosage de la perméabilité du composé est réalisé par lecteur de plaque ultraviolet ou par HPLC ou LC/MS (Edward et al, 2008) (Faure, 2014). Ce modèle a été sujet à une modification au niveau du type de filtre. En effet, Zhu et coll ont remplacé le filtre de polyfluorure de vinylidène (PVDF) hydrophobe utilisé par Kansy par un filtre de PVDF hydrophile

permettant de réduire la durée de l'expérience de 15 à 2 heures (**Kansy et al, 1998**) (**Avdeef, 2003**) (**Bermejo et al, 2004**).

Deux ans après, plusieurs compagnies ont développé leurs propres versions du test. Ces tests se différenciaient par la nature du filtre utilisé, la composition de la membrane, le pH dans les compartiments donneur et accepteur, la présence de conditions d'extrême dilution dans le compartiment accepteur et le temps d'incubation (**Avdeef, 2003**) (**Avdeef, 2005**). Parmi eux, on peut citer :

#### **III.1.1.2.2.1. Modèle PION ou PAMPA-DOPC**

Il a été rapporté par Avdeef et al et qui présente plusieurs caractéristiques supplémentaires comme la détermination de la rétention de la membrane ou l'évaluation de l'effet du pH (Ruell, 2003). Ce test utilise un phospholipide synthétique, la dioléoylphosphatidylcholine (DOPC) qui présente une faible rétention pour une grande gamme de composés, et une température de transition très basse ( $T_m = -16,5^\circ\text{C}$ ), ce qui permet une manipulation aisée à température ambiante (Carsten, 2011). Ce test utilise les plaques PION avec un mélange de 2% (w/v) DOPC dissoute dans du n-dodecane (**Ruell et al, 2003**).

#### **III.1.1.2.2.2. Modèle n-hexadecane : HDM-PAMPA (Modèle Novartis)**

Faller et Wohnsland ont développé un test exempt de phospholipides utilisant seulement un filtre en polycarbonate de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur imbibé dans l'hexadecane. Ils ont démontré que l'utilisation d'un solvant inerte tel que le n-hexadecane pouvait améliorer les résultats des tests de perméabilité des composés simples. Ce test a également permis la prédiction du coefficient de partage alcane/eau, souvent très difficile à mesurer de façon directe (**Avdeef, 2003**).

#### **III.1.1.2.2.3. PAMPA biomimétique: BBLM-PAMPA (Brush-Border Lipid Membrane)**

Sugano et al ont essayé de reproduire les conditions que présente la bordure en brosse en dissolvant dans du 1,7-octadiène un mélange de phospholipides qui ressemble fortement à celui présent dans les membranes biologiques. Une telle composition permet une plus grande rétention au niveau de la membrane lorsque des composés lipophiles sont évalués. Le pH dans le compartiment donneur et accepteur est ajusté entre 5 et 7,4. Ce test a contribué à une amélioration significative de la prédiction de l'absorption intestinale (**Avdeef, 2003**).

#### **III.1.1.2.2.4. Double-Sink : DS-PAMPA**

Cette méthode a été mise au point par Avdeef en utilisant, tout comme le PAMPA décrit par Kansy, un mélange lipidique à base de lécithine. Par contre il a substitué les conditions traditionnelles par un système de deux gradients « double-sink ». De ce fait, le PAMPA-DS utilise un pH entre 5 et 7,4 dans le compartiment donneur, et un pH 7,4 dans le compartiment accepteur,

permettant aux acides faibles de passer à travers la membrane grâce au faible pH dans le compartiment donneur, et de rester piégées dans le compartiment accepteur sous leurs formes chargées. Ce gradient de pH constitue la première condition « sink ». La présence de surfactants dans le compartiment accepteur rend unidirectionnelle la perméabilité des composés lipophiles à travers la membrane et constitue la deuxième condition « sink » (Avdeef, 2003).

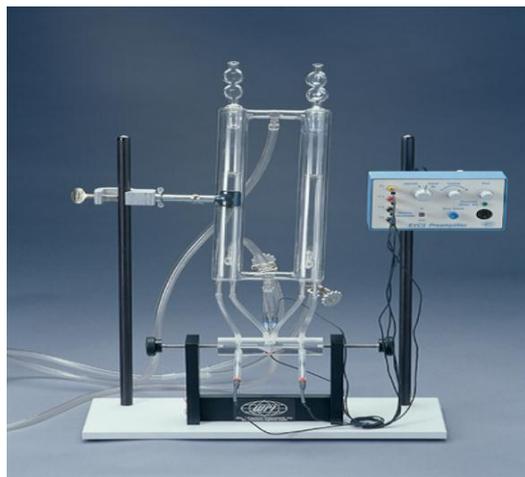
### III.1.2. Modèles ex vivo

Les méthodes ex vivo utilisent des tissus membranaires des animaux fraîchement prélevés, afin d'y mesurer le passage transmuqueux. Les modèles nécessitent cependant de travailler en un temps limité du fait de la manque d'innervation et de vascularisation et la perte de viabilité au cours de l'expérience. Parmi les modèles les plus populaires et les plus utilisés, on retrouve:

#### III.1. 2.1. Tissus intestinaux isolés (chambre d'Ussing)

La chambre d'Ussing a été mise au point par Hans Ussing et k. Zerahn en 1951 pour l'étude du transport actif du sodium. Actuellement, ce modèle est utilisé pour l'étude d'absorption intestinale (Le Ferrec et al, 2001) (Faure, 2014).

Cette chambre est composée de deux demi-chambres en plexiglas, déterminant un compartiment muqueux et un compartiment séreux, séparés par des tissus isolés de la muqueuse intestinale, coupés en bande après avoir enlevé la musculature. Ces compartiments sont remplis avec une solution de Ringer tamponnée à pH = 7,6 à 37 °C. La solution est sans interruption intoxiquée avec un carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>) et est maintenu sous agitation pour pouvoir contrôler l'épaisseur de la couche d'eau stationnaire (Carsten et kwang, 2011).



**Figure 14:** Ussing System for Epithelial Research from World Precision Instruments. Instrumenting ideas scientific ideas (Peters et al, 2009).

Le médicament est introduit dans le compartiment donneur et la quantité passée à travers la membrane, appelée le coefficient Papp, et est mesurée dans le compartiment receveur en fonction du temps (Barthe et al, 1999) (Rozehnal al, 2012). On écrit :

$$P_{app} = \frac{J_i}{C} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0}$$

D'où :

- C = la concentration initiale en produit (i) du milieu donneur en nano mole/cm<sup>3</sup>.
- J<sub>i</sub> = le flux mesuré en nano moles/cm<sup>2</sup>/h
- A = la surface exposée du tissu en cm<sup>2</sup>

La chambre d'Ussing couplée à des clamps de voltage permet de vérifier l'état de la membrane par la mesure en permanence des paramètres électriques : le courant de court-circuit (I<sub>sc</sub>), la conductance G (**Carsten et kwang, 2011**).

### III.1.2.2. Anneaux intestinaux éversés

Cette technique utilise un segment complet de 1 à 2 cm excisé à partir d'intestin de rat, noué d'un bord, et soigneusement éversé de l'autre en le plaçant sur une tige en verre. Ce segment est coupé en anneaux incubés dans un tampon oxygéné contenant le médicament, sous agitation et à 37°C. Après un temps défini, il est possible de calculer la quantité de médicament absorbée par gramme de tissu mouillé (mol g<sup>-1</sup> temps<sup>-1</sup>) après avoir rincé l'anneau avec du tampon glacé et séché minutieusement (**Ashford, 2007**).

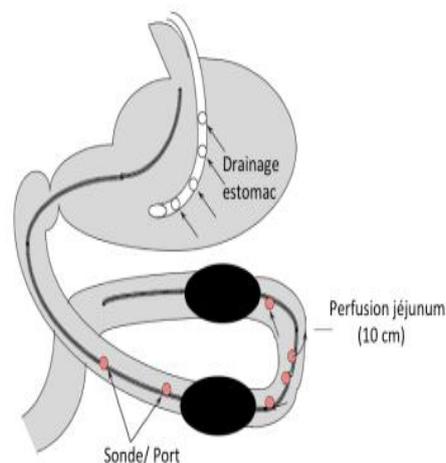
### III.1.2.3. Sac intestinal retourné

Cette technique a été mise au point par Wilson et Wiseman en 1954, sur des rats et des hamsters, pour l'étude du transport de sucres et d'acides aminés de la muqueuse à la surface de la séreuse (**Faure, 2014**). Il s'agit de segments d'intestin de plusieurs centimètres prélevés de l'animal, retournés et fermés aux deux extrémités sous forme d'un sac en présence d'un tampon oxygéné. Ainsi, la surface muqueuse qui représente la lumière intestinale est présentée vers l'extérieur. Les sacs sont placés dans un tampon également oxygéné à 37°C contenant le médicament ce qui permet d'évaluer l'absorption par un mécanisme de diffusion passive. On peut également introduire le médicament à l'intérieur du sac à l'aide d'une seringue pour permettre l'évaluation de l'absorption par un mécanisme de transport actif (**Eichmann et al, 1997**).

### III.1.3. Modèles in vivo : Anse intestinale (perfusion intestinale chez l'homme)

Le principe de base de cette technique est de faire infuser une solution du composé d'intérêt et un marqueur non absorbé tel que le PEG-4000 dans un segment intestinal d'un volontaire et de prélever les échantillons de perfusât suite à leur passage à travers le segment. La quantité absorbée est déduite à travers la différence entre les concentrations initiales et finales. Cette technique permet l'étude du transport et du métabolisme intestinal, l'étude de perméabilité et la cinétique de nouvelles molécules (**Barthe et al, 1999**).

Plusieurs approches de perfusion ont été adoptées dans les intestins grêles: perfusion à système ouvert, semi-ouvert et fermé. Lennernäs et coll. ont développé un instrument de perfusion qui consiste en un tube à canaux multiples avec deux ballons gonflables, créant un segment de 10 cm et qui permet la perfusion intestinale segmentaire. Ce système à six canaux comprend quatre larges canaux situés au centre dont deux sont pour l'infusion et deux pour l'aspiration du perfusât. Les deux restants sont périphériques et utilisés pour l'administration du marqueur ou pour le drainage (**Barthe et al, 1999**).



**Figure 15 :** Segment perfusé chez l'homme crée avec le tube multicanaux et les deux ballons gonflables (**Yang et Yu, 2009**).

Le tube est introduit oralement après une anesthésie locale. Une fois le tube en place, les ballons sont gonflés et le segment intestinal est créé. Le segment est rincé et ensuite perfusé avec la solution de perfusion contenant le composé d'essai. Le débit d'absorption  $P_{eff}$  (perméabilité effective) est calculé à partir du taux de disparition du composé du segment perfusé comme suit:

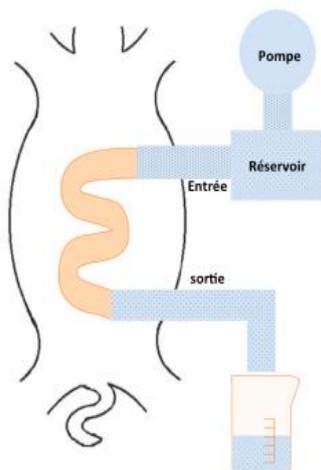
$$P_{eff} = \frac{Q_{in}}{2\pi RL} \frac{(C_{in} - C_{out})}{C_{out}}$$

Où :  $Q_{in}$  est le taux de perfusion d'admission ;  $C_{in}$  et le  $C_{out}$  sont les concentrations de la drogue à l'entrée et en sorti respectivement, de perfusion ;  $R$  est le rayon et  $L$  est la longueur du segment intestinal (**Barthe et al, 1999**).

#### III.1.4. Modèles in Situ

Cette méthode a été introduite à la fin des années 1960 et qui doit être réalisée sur deux espèces animales différentes incluant un rongeur et un non rongeur (chat, chien, mini-porc...). Le modèle de rongeur utilisé pour les études d'absorption est le rat, qui reflète bien la physiologie humaine. Elle met en place des segments d'intestins d'animaux anesthésiés, et placés sur une plaque chauffante, pour maintenir la température corporelle constante à 37 °C , et puis perfusés par

une solution contenant le médicament grâce à une canule dans le but de déterminer la quantité de médicament qui passe à travers les intestins (Barthe et al, 1999) (Carsten et kwang, 2011).



**Figure 16 :** Étude in situ de l'absorption d'un médicament avec perfusion intestinale (Yang et Yu, 2009).

La méthode in situ est la plus proche de celle in vivo puisque le flux sanguin est maintenu intact et les barrières que le composé doit traverser pour atteindre la circulation systémique sont les mêmes dans les deux méthodes (Barthe et al, 1999).

La procédure expérimentale pour un **passage unique in situ** a été décrite par Fagerholm. Les rats sont laissés à jeun pendant au moins 12 h, puis un segment intestinal d'environ 10 à 20 cm est isolé à l'aide d'une canule. Ce segment est rincé avec une solution isotonique (pour éliminer les matières fécales et les débris) avant d'être perfusé en continu avec une solution contenant le médicament d'intérêt. Le perfusât est prélevé à des intervalles déterminés. Ainsi, le coefficient de perméabilité effective ( $P_{eff}$ ) du médicament administré est calculé comme suit (Barthe et al, 1999) :

$$P_{eff} = -\frac{Q_{in}}{2\pi rL} \times \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)$$

Où :  $C_{in}$  et  $C_{out}$  sont les concentrations de la drogue à l'entrée de l'intestin et les concentrations en sortie de perfusion ;  $Q_{in}$  est le taux de perfusion d'admission du segment intestinal ;  $2\pi rL$  est la superficie de transfert de masse dans le segment intestinal qui est la surface d'un cylindre avec une longueur  $L$  et un rayon  $r$ .

Afin de vérifier la viabilité du tissu au cours de l'expérience, une récupération totale du PEG-4000 (composé non absorbé) ainsi qu'un flux d'eau stable doivent être observés (Barthe et al, 1999).

### III.1.5. Modèles in silico

Ces méthodes sont principalement des modèles mathématiques utilisés pour déterminer la biodisponibilité des molécules. Ils sont enrichis par des données expérimentales et sont construits en se basant sur les propriétés essentielles d'un médicament : (ADMET). Elles servent à présélectionner des molécules avant de les tester au laboratoire et donc évitent l'échec plus tard dans la phase de développement (**Egan et lauri, 2002**).

### III.1.5.1. Règles de base

#### ➤ "Règle des cinq" de Lipinski

Établie en 1997, et décrit des conditions synonymes de mauvaise perméabilité pour une molécule. Si deux des points suivants sont respectés, la molécule est presque certainement non biodisponible (**Lipinski et al, 1997**):

- $\log P > 5$
- poids moléculaire (MW) > 500D
- groupements donateurs d'hydrogène  $H > 5$  (les OH et NH)
- groupements accepteurs d'hydrogène  $H > 10$  (les O et N).
- Les substrats de transporteurs sont exclus de cette règle.

#### ➤ Règle de Veber

Permet de prédire la perméabilité et la bonne biodisponibilité des molécules pharmaceutiques en basant sur les règles suivantes (**Edward et al, 2008**) :

- Nombre de liaisons rotatives  $\leq 10$  ;
- L'aire de la surface de la molécule polaire PSA (polar surface area)  $\leq 140 \text{ \AA}^2$  ;
- Total des liaisons d'hydrogène (accepteurs + donateurs)  $\leq 12$ .

#### ➤ "Règle des trois" d'Oprea

Les molécules entrant en phase clinique sont souvent plus complexes et plus grandes que les leads à partir desquels elles ont été dérivées (**György et al, 2009**). Ainsi, Hann et Oprea ont créés des filtres plus restrictifs permettant de prédire la perméabilité et d'obtenir des composés plus simples, en basant sur les règles suivantes (**Hann et al, 2004**) :

- Masse moléculaire < 460Da ;
- $-4 < \log P < 4, 2$  ;
- $\log Sw \geq -5$  ;
- Nombre de liaisons rotatives < 10 ;
- Nombre de cycles < 4 ;
- Nombre de donateurs de liaisons  $H < 5$  ;
- Nombre d'accepteurs de liaisons  $H < 9$

### ➤ D'autres règles

De manière assez similaire, Congreve et coll. définissent une règle analogue à celle de Lipinski mais adaptée à la sélection de molécules pour du criblage sur fragments (**Congreve et al, 2003**). L'idée est également de sélectionner des molécules plus petites et plus simples :

- Masse moléculaire < 300Da ;
- Log P < 3 ;
- Nombre de donneurs de liaisons H < 3 ;
- Nombre d'accepteurs de liaisons H < 3.

Sans l'inclure explicitement à la règle originale énoncée dans l'article, les auteurs suggèrent également une extension de cette règle en ajoutant deux critères supplémentaires : nombre de liaisons pouvant tourner < 3 et l'aire de surface polaire < 60 Å<sup>2</sup>.

Récemment, de nouveaux critères ont également été introduits afin de caractériser les molécules pouvant servir de modulateurs des interactions protéine-protéine. Ainsi, à partir d'un ensemble de 39 inhibiteurs d'interactions protéine-protéine, Morelli et al définissent une nouvelle règle de 4 permettant de définir le profil générique de tels inhibiteurs (**Morelli et al, 2011**) :

- Masse moléculaire > 400Da ;
- ALog P > 4 ;
- Nombre de cycles > 4 ;
- Nombre d'accepteurs de liaisons H > 4.

### III.1.5.2. Approches de modélisation utiles en pharmacocinétique

#### III.1.5.2.1 Modélisation pharmacocinétique fondée sur la physiologie PBPK

Elle décrit les processus ADME en se basant sur des considérations anatomiques, physiologiques, biochimiques et physicochimiques. Dans ce modèle, les organes de l'espèce étudiée sont représentés par des compartiments. Chaque compartiment est caractérisé par un flux sanguin, un volume et un coefficient de partition tissu/plasma (**Faure, 2014**).

Différentes sociétés ont développé des logiciels de modélisation PBPK tels que, le simulateur **Simcyp**, analyse la variabilité au sein de la population humaine, **GastroPlus™**, décrit les mécanismes de l'absorption orale, **PK-Sim®**, **GI-Sim** et **Cloe® PK**. Ces logiciels sont fondés sur des principes similaires mais diffèrent par leurs puissance et applications. Le choix du logiciel se fait selon le but recherché et selon les compétences de l'utilisateur (**Peters et al, 2009**).

#### III.1.5.2.2. Modules de quantification des relations structure-activité QSAR

Ils permettent de déterminer des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques à partir de structures moléculaires. Ces modèles sont basés sur le principe que des molécules ayant



<b>Ex vivo</b>	Chambre d'Ussing  (Barthe et al, 1999) (Carsten et kwang, 2011) (Ashford, 2007)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- évaluer la perméabilité et le passage des médicaments dans les différents segments intestinaux.</li> <li>- étude de transport bidirectionnel.</li> <li>- étude des différents types de tissus.</li> <li>- permet de vérifier l'état de la membrane par la mesure des paramètres électriques.</li> <li>- nécessite une faible quantité de médicaments et éviter la contamination.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- manque d'innervation et de vascularisation.</li> <li>- sous-estimation possible du transport de composés lipophiles.</li> <li>- non utilisé pour le criblage primaire.</li> <li>- changement morphologique et fonctionnel du tissu au cours du prélèvement et du montage dans les chambres.</li> </ul>
	Anneaux intestinaux éversés  (Ashford, 2007)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- test simple et rapide.</li> <li>- le contrôle grâce au nombre d'anneaux générés à partir d'un segment d'intestin.</li> <li>- étude de mécanisme d'absorption.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- test biologique.</li> <li>- modèle animal.</li> <li>- n'assure pas la viabilité.</li> </ul>
	Sac intestinal retourné  (Faure, 2014) (Ashford, 2007)(Le Ferrec, 2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- facile, rapide et pas chère.</li> <li>- étude de transport bidirectionnel.</li> <li>- étude d'absorption dans les différents segments d'intestin.</li> <li>- adapté pour les molécules faiblement perméables.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- modèle animal.</li> <li>- la perte de viabilité au cours de l'expérience.</li> <li>-lésions morphologiques.</li> </ul>
<b>In vivo</b>	Perfusion intestinale chez l'homme  (Barthe, 1999) (COX, 2008) (Le Ferrec, 2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- modèle de référence.</li> <li>- permettre l'étude chez l'homme.</li> <li>- bonne corrélation avec l'étude pharmacocinétique.</li> <li>-présence des facteurs physiologiques qui influencent l'absorption.</li> <li>- étude de mécanisme d'absorption.</li> <li>- étude de biodisponibilité.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- technique complexe, difficile, lente et chère.</li> <li>- n'est pas pratique pour le criblage.</li> <li>-considération éthique.</li> </ul>
<b>In situ</b>	Perfusion intestinale mono passe chez le rat  (Barthe, 1999) (COX, 2008) (Le Ferrec, 2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- étude d'absorption dans les différents segments d'intestin.</li> <li>- le test le plus proche du modèle in vivo.</li> <li>-méthode robuste, facile à réaliser et fiable.</li> <li>- confirme les résultats de perméabilité des modèles in vitro.</li> <li>- outil pour classification BCS.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- utilisé dans le développement mais pas souvent.</li> <li>- nécessite un grand nombre animaux.</li> <li>- modèle lent.</li> <li>- la manipulation chirurgicale et l'anesthésie diminuent l'absorption.</li> </ul>
<b>In silico</b>	(Lipinski,1997) (Peters, 2009)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-économiques en temps et en coût.</li> <li>-test prédictif mathématique.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- technique incomplète.</li> </ul>

### III.3. Système de classification biopharmaceutique (BCS)

Le système de classification biopharmaceutique (Biopharmaceutical Classification System, BCS) qui a été introduite en 1995 par G. L. Amidon et al et adopté par FDA classe les molécules actives selon leur solubilité et de leur perméabilité. Cette classification permet de prévoir le comportement des molécules in vivo et ainsi d'orienter le travail de formulation nécessaire à chaque molécule. Les principes actifs sont classés selon quatre catégories (Amidon et al, 1995) (Lindenberg et al, 2004) :

- ✓ **Classe I** : PAs très solubles et très perméables. Le PA sera dans ce cas facilement absorbé et c'est le temps de transit gastro-intestinal qui devient le facteur limitant de la vitesse d'absorption.
- ✓ **Classe II** : PAs peu solubles et très perméables. Ils sont rapidement absorbés grâce à leur grande perméabilité. La solubilité du PA sera le facteur limitant de la biodisponibilité, car les molécules non dissoutes pendant le temps de transit ne pourront pas être absorbées.
- ✓ **Classe III** : PAs très solubles et peu perméables. Malgré une dissolution rapide, l'absorption de ces composés est limitée par leur difficulté à pénétrer l'épithélium intestinal.
- ✓ **Classe IV** : PAs peu solubles et peu perméables. L'administration orale de ces PAs est limitée par des problèmes de solubilisation ainsi que d'absorption. Elle mène à une mauvaise biodisponibilité.

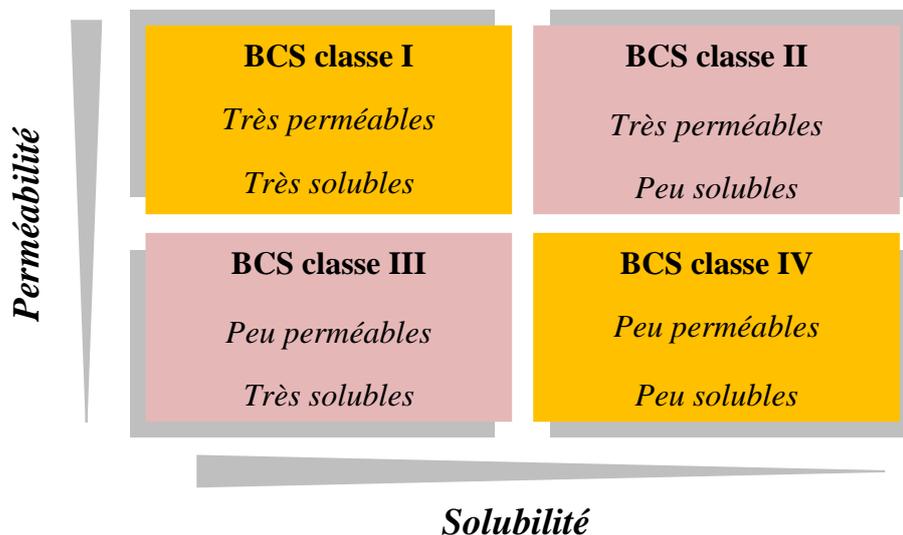


Figure 17 : Système de classification biopharmaceutique (BCS) (originale)

# Etude expérimentale

## **I. Objectifs**

L'évaluation préclinique de l'absorption intestinale des médicaments est une étape cruciale dans le développement pharmaceutique pour fabriquer des formulations efficaces, c'est à dire capables d'assurer une absorption intestinale suffisante et donc de générer un profil pharmacocinétique satisfaisant par voie orale.

La détermination de la perméabilité intestinale va permettre d'établir une classification BCS présentant un intérêt considérable à un stade précoce du développement d'un médicament. En effet, plusieurs méthodes expérimentales sont couramment utilisées à cette fin et leur valeur prédictive à été rapportée tels que, les tests in vitro dans les cellules caco2 et MDCK, chambre d'Ussing, PAMPA et la perfusion intestinale in situ (SPIP).

L'objectif principal de la présente étude est de déterminer la perméabilité intestinale effective du Naproxène chez le rat par perfusion intestinale in situ avec un seul passage (SPIP) pour vérifier la faisabilité et la possibilité de réalisation de la technique dans l'évaluation de l'absorption en comparant les résultats obtenus avec les données de BCS relatives à la perméabilité intestinale du Naproxène établies antérieurement.

## **II. Matériels et méthodes**

### **II.1. Choix de la méthode**

La méthode in situ est une méthode robuste qui permet l'étude de la perméabilité intestinale et la cinétique de nouvelles molécules, elle est la plus fiable entre les différentes techniques précliniques et les études du modèle de rat présentent une bonne corrélation aux études in vivo chez l'homme puisque le flux sanguin est maintenu intact et les barrières que le composé doit traverser pour atteindre la circulation systémique sont les mêmes. En plus, elle fournit des conditions expérimentales plus proches de ce qui se passe après l'administration orale.

Le choix a été conditionné également par la faisabilité de la technique et la disponibilité du réactif animal puisque l'étude a été réalisée au niveau du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques qui dispose d'une animalerie.

### **II.2. Choix de la molécule**

Le choix dans la présente étude, est porté sur le Naproxène de sodium parce que c'est une molécule qui figure sur la liste des molécules de référence de la FDA pour la validation des méthodes de perméabilité intestinale. Cette molécule est caractérisée par une haute perméabilité chez l'homme avec un facteur d'absorption connu qui est de 100% (EMEA 2011).

Cependant, la réalisation d'une technique de perméabilité in situ nécessite l'administration concomitante d'un indicateur non absorbé pour corriger le flux d'eau. Donc, la mesure expérimentale du Naproxène va être réalisée en présence du Rouge de phénol connu pour avoir une absorption nulle au niveau intestinal.

La détermination de la perméabilité intestinale par perfusion in situ chez le rat va se dérouler en deux phases : l'expérimentation animale et le dosage bio-analytique des échantillons.

## II.3. Matériels

### II.3.1. Réactif animal

Quatre rats albinos pesant entre 200 et 300 g provenant de l'élevage du Service de Pharmaco-toxicologie de LNCPP sont utilisés. Les rats sont logés dans une pièce maintenue dans des conditions standards tout en fournissant de l'eau et de la nourriture sèche.



**Figure 18:** Rats albinos utilisés pour l'expérience

### II.3.2. Equipements



Plaque homéo-thérmiq

Pompe péristaltiq

Bain marie



pH mètre



Centrifugeuse



HPLC



Balance

**Figure 19** : Différents équipements utilisés.

### II.3.3. Consommables

- Spatules.
- Seringues.
- Compresses.
- Matériel de dissection.
- Membrane filtre à 0.45  $\mu\text{m}$ .
- Vials pour chromatographie.
- Pipettes et micropipettes.
- Fioles jaugées.

### II.3.4. Matière première

- Naproxène de sodium.
- Rouge de phénol.

### II.3.5. Réactifs chimiques

- Sérum glucosé.

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
- NaCl.
- KCl.
- Acétonitril grade HPLC.
- Acide Orthophosphorique
- Eau purifiée filtrée.
- Méthanol grade HPLC.
- Triéthylamine grade HPLC.

### **II.3.6. Molécule à perfuser**

Un anti inflammatoire non stéroïdien : Naproxène de sodium sous forme de matière première, bien connu pour son utilisation clinique dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres troubles musculo-squelettiques douloureux.

- N° de lot : 136312487
- FAB : 23.11.2013
- EXP : 22.11.2016
- du Assay: 99.7 %

## **II.4. Expérimentation animale**

### **II.4.1. Principe de la méthode**

Cette méthode est basée sur la mesure de la décroissance des concentrations lumenales à l'équilibre, d'une solution contenant la substance d'intérêt perfusée à un débit constant à travers un segment du jéjunum intestinal maintenu irrigué et innervé chez un rat anesthésié. Ce qui va aboutir à la détermination du coefficient de perméabilité effective.

### **II.4.2. Préparation de la solution pour perfusion intestinale**

#### **✓ Préparation de la solution tampon pour perfusion**

Dans une fiole de 1000 ml, la solution de perfusion consiste en 2805,12 mg de NaCl, 402.6 mg de KCl, 479.92 mg de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 397.48 mg de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et un volume de 20 ml du sérum glucosé à 5%, on complète avec 1 L d'eau distillée jusqu'au trait de jauge. A l'aide d'un pH mètre, le pH de la solution est vérifié et ajusté au pH 6.5 avec une osmolarité de 280 mosmol/l.

#### **✓ Préparation de 250 ml de solution pour perfusion intestinale contenant la molécule d'intérêt :**

La concentration de Naproxène utilisé est de 0.1 mg/ml dissout dans 250 ml de la solution tampon.

0.1 mg       $\longrightarrow$       1 ml  
m             $\longrightarrow$       250 ml

$$m = 250 \times 0.1 = 25 \text{ mg}$$

La concentration du Rouge de phénol est de 0.02 mg/ml dissout dans 250 ml de la solution tampon, il est utilisé comme marqueur non absorbable des échanges liquidiens, donc à ajuster les concentrations lumineales en cas de changement de volume liquidien pouvant avoir une influence significative sur la concentration lumineale du Naproxène.

0.02 mg       $\longrightarrow$       1 ml  
m             $\longrightarrow$       250 ml

$$m = 250 \times 0.02 = 5 \text{ mg}$$

Dans une fiole de 250 ml, on met 25 mg de naproxène, 5 mg de rouge de phénol et on complète avec la solution tampon jusqu'au trait de jauge.



**Figure 20 :** Solution pour perfusion intestinale contenant le Naproxene de sodium et le Rouge de phénol.

#### II.4.3. Mode opératoire

##### ✓ Pesée des animaux

Chaque rat est mis à jeun 18h avant d'effectuer l'expérience avec un accès à l'eau seulement. On pèse les rats à jeun à chaque fois avant de commencer l'expérience (**figure 24**) afin qu'une dose adéquate d'anesthésie puisse être calculée. Et les résultats sont illustrés dans le tableau 3.



**Figure 21 :** Pesée d'un rat à jeun avant l'administration d'anesthésie.



**Figure 22 :** Injections contenant la solution de thiopental

✓ **Injection d'anesthésiant par voie IP**

L'anesthésie est induite avec une administration de thiopental à raison de 40 mg/Kg par voie intra-péritonéale IP en tenant le rat vers le bas, et avec un angle de 45° on insère une aiguille dans le cadran inférieur gauche de l'abdomen, puis on injecte un volume de 0.5 ml et on note l'heure de l'injection (voir tableau 3).



**Figure 23 :** Administration d'anesthésie par voir IP.

✓ **Manipulation animale**

Le rat est placé sur une plaque homéo-thermique pour maintenir sa température corporelle de 37 °C. Par une incision longitudinale sur la ligne médiane, l'abdomen est ouvert et un segment jéjunal est isolé tout en maintenant l'irrigation et l'innervation intacte, puis il est canulé aux deux extrémités et relié à une pompe péristaltique qui est liée elle-même par une tubulure à la solution de perfusion qui se trouve dans un bain marie à 37 °C. Le segment est rincé en faisant passer la solution tampon à un débit de 0.2 ml/min pour éliminer les matières fécales et les débris. Dès que la solution de rinçage devient claire, le perfusât intestinal est recueilli pendant 20 minute afin de l'utiliser comme blanc analytique. Après rinçage, l'expérience est initiée en laissant passer la solution de perfusion contenant le Naproxène de sodium et le Rouge de phénol dans le segment intestinal pendant 1h à un débit de 0.2 ml/ min. La zone chirurgicale est recouverte avec une compresse imbibée dans le sérum physiologique pour éviter le dessèchement. Au total, cinq (5) prélèvements sont recueilli à la sortie Pout (P0, P1, P2, P3 et P4), en plus d'un prélèvement à l'entrée de l'intestin (Pin), et un autre au niveau du réservoir de la solution (PinF). Ce dernier, sert seulement à vérifier qu'il n'y a pas eu de phénomène d'adsorption des composés sur la tubulure.



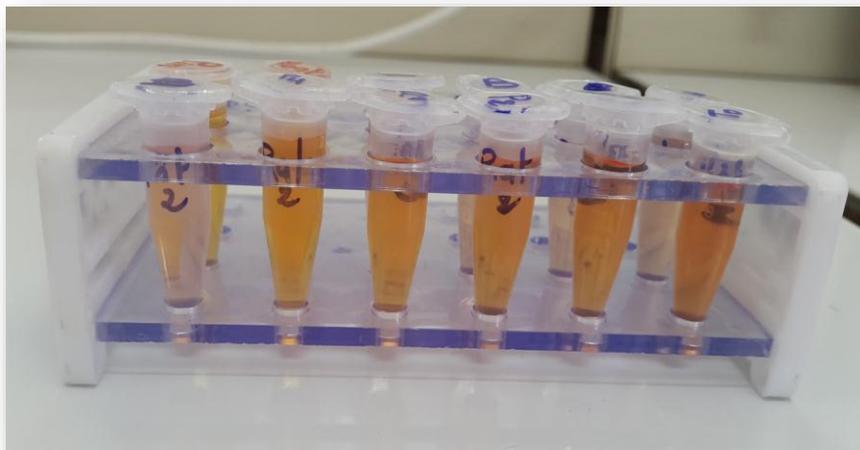
**Figure 24 :** Perfusion de la solution dans le s gment de rat.

Les échantillons de perfusât effluent du bout distal de l'intestin sont recueillis dans des micro-tubes chaque 10 minutes. La longueur du segment est mesurée à la fin de perfusion pour chaque rat et les résultats sont illustrés dans le tableau 3. Le diamètre étant fixé à 0,18mm (diamètre adopté généralement pour ce type d'études).

**Tableau 3 :** Paramètres liés à chaque rat notés durant l' xp rience.

N� de rat	Sexe	Poids (g)	Anesthésie IP (heure)	Longueur de segment intestinal (cm)	Diamètre de segment intestinal (mm)
<b>Rat 1</b>	M�le	270	11 :15	18	0,18
<b>Rat 2</b>	femelle	219	10 :43	10	0.18
<b>Rat 3</b>	femelle	225	10 :23	15	0.18
<b>Rat 4</b>	femelle	195	10 :47	12	0.18

Les échantillons sont centrifugés à 3000 tour/min pendant 5 min, puis congelés et conservés à -20  C en attente d'analyse.



**Figure 25 :** Échantillons de perfusât intestinal recueillis.

## **II.5. Dosage bio-analytique du Naproxène et du Rouge de phénol par HPLC**

### **II.5.1. Principe**

Dosage du Naproxène et du Rouge de Phénol dans le perfusât intestinal de rat par une méthode HPLC en phase inverse couplée à un détecteur UV à 270 nm.

### **II.5.2. Choix de la méthode bio-analytique**

C'est une méthode chromatographique simple avec détection UV à 270 nm développée (**Zakeri-Milani et al 2004**) pour la quantification du Naproxène de sodium avec le Rouge de phénol pour les études de perméabilité in situ.

C'est une méthode dont le matériel nécessaire pour sa réalisation est disponible au niveau de laboratoire de la cinétique de dissolution au LNCPP.

### **II.5.3. Conditions chromatographiques**

Le système chromatographique est ajusté afin de réunir les paramètres présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Paramètres du système chromatographique HPLC

<b>Colonne</b>	Type	Gemini C18
	Dimension	100 × 4.6 mm
	Porosité	5 µm
	Température	Ambiante
<b>Pompe</b>	Débit	1.5 ml/mn
<b>Détecteur</b>	Type	UV
	Longueur d'onde	270 nm
<b>Passeur d'échantillon</b>	Volume injecté	20 µl
	Température	Ambiante

Le temps d'analyse est de 10 min pour chaque injection.

#### **II.5.4. Validation de la méthode bio-analytique**

La validation de la méthode bio-analytique comprend toutes les procédures qui démontrent qu'un procédé particulier utilisé pour la mesure quantitative de substances à analyser dans une matrice biologique donnée, est fiable et reproductible pour l'utilisation prévue.

Les paramètres fondamentaux pour une validation d'une méthode de bio-analyse sont : La linéarité, la fidélité, la précision, l'exactitude, la justesse, la spécificité, la sensibilité, la reproductibilité et la stabilité. Malgré que, la technique utilisée dans cette étude (**Zakeri-Milani et al 2004**) est déjà validée, certains paramètres doivent être vérifiés pour s'assurer la validité de chaque analyse lancée (within-run validation). Les paramètres étudiés sont : La linéarité, la justesse, précision et exactitude, et qui sont suffisants pour prouver que les résultats obtenus sont fiables dans des limites bien définies.

#### **II.5.5. Intervalle de dosage et échantillons de contrôle qualité**

- La limite inférieure de quantification LIQ est égale à 30 µg/ml.
- Intervalle de dosage pour Naproxène 30-150 µg/ml, de façon à contenir les points de gamme suivants : 30, 45, 60, 90, 120, et 150 µg/ml.
- Echantillons de contrôle qualité :
  - CQ inférieur = [30-45] µg/ml.
  - CQ moyen = [60-90] µg/ml.
  - CQ supérieur = [120-150] µg/ml.

- Intervalle de dosage pour Rouge de phénol 6-30 µg/ml, de façon à contenir les points de gamme suivants : 6, 9, 12, 18, 24, et 30 µg/ml.
- Echantillons de contrôle qualité :
  - CQ inférieur = [6-9] µg/ml.
  - CQ moyen = [12-18] µg/ml.
  - CQ supérieur = [18-30] µg/ml.

## **II.5.6. Mode Opérateur**

### **II.5.6.1. Préparation des réactifs et des solutions standards**

#### **II.5.6.1.1. Préparation de la phase mobile**

La phase mobile est constituée d'un mélange de 20% de méthanol, 28% d'acétonitril, 52% d'eau purifiée et 0.4 ml de triéthylamine (ajustée à pH 3.2 en utilisant de l'acide orthophosphorique).

#### **II.5.6.2. Préparation des solutions standards**

##### **✓ Préparation de la solution mère du Naproxène**

Peser avec précision environ 46.87 mg du Naproxène puis la dissoudre dans une fiole de 25 ml de méthanol pour obtenir une solution mère SM1 de 1,875 mg/ml. Préparer une deuxième solution SM2 avec la même quantité de Naproxène qui va servir pour la préparation des échantillons de contrôle qualité.

##### **✓ Préparation de la solution mère du Rouge de phénol**

Peser avec précision environ 37.5 mg de Rouge de phénol et la dissoudre dans une fiole de 25 ml d'un mélange de 50% méthanol et 50 % d'eau purifiée pour obtenir une solution mère SM1 de 1,5 mg/ml. Préparer une deuxième solution SM2 avec la même quantité de Rouge de phénol qui va servir pour la préparation des échantillons de contrôle qualité.

##### **✓ Préparation des standards de la gamme de calibration en milieu aqueux**

Six (06) standards aqueux sont préparés à partir de la SM1 du Naproxène. Et six standards aqueux sont préparés à partir de la SM1 de Rouge de phénol. Pour chaque standard aqueux, un volume correspondant de la solution mère est dilué dans une fiole de 5 ml par la phase mobile. Les standards seront par la suite vortexés pendant 20 secondes.

**Tableau 5 :** Concentrations et les volumes prélevés pour chaque standard aqueux du Naproxène.

Standard	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Volume prélevé ( $\mu\text{l}$ )	Volume final (ml)
Saq1	30	800	5
Saq2	45	1200	5
Saq3	60	1600	5
Saq4	90	2400	5
Saq5	120	3200	5
Saq6	150	4000	5

**Tableau 6 :** Concentrations et les volumes prélevés pour chaque standard aqueux de Rouge de phénol.

Standard	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Volume prélevé ( $\mu\text{l}$ )	Volume final (ml)
Saq1	6	200	5
Saq2	9	300	5
Saq3	12	400	5
Saq4	18	600	5
Saq5	24	800	5
Saq6	30	1000	5

✓ **Préparation des standards de la gamme d'étalonnage en milieu biologique**

Six standards en milieu biologique sont préparés à partir des standards aqueux correspondants, en diluant à  $1/10^{\text{ème}}$  ces derniers dans le perfusât intestinal recueilli à fin de la phase de rinçage dans des vials. Les standards seront par la suite vortexés pendant 20 secondes.

**Tableau 7 :** Concentrations et les volumes prélevés du standard aqueux ainsi du perfusât intestinal pour chaque standard biologique.

Standards	Concentration (Naproxène) (µg/ml)	Concentration (Rouge de phénol) (µg/ml)	Volume prélevé du standard aqueux du Naproxène (µl)	Volume prélevé du standard aqueux de Rouge de phénol (µl)	Volume du perfusât intestinal (µl)
S1	30	6	30	30	300
S2	45	9	30	30	300
S3	60	12	30	30	300
S4	90	18	30	30	300
S5	120	24	30	30	300
S6	150	30	30	30	300

✓ **Préparation des échantillons de contrôle qualité**

Trois (3) échantillons de CQ sont préparés de la même manière que les standards avec une deuxième solution mère du Naproxène de sodium et une deuxième solution mère de Rouge de phéno

✓ **Préparation des échantillons de contrôle qualité en milieu aqueux**

**Tableau 8:** Concentrations et les volumes prélevés pour chaque échantillon de contrôle qualité du Naproxène.

	Ech de CQ	Concentration	Volume prélevé	Volume final
Rat1 +	CQI	30	800	5
	CQM	60	1600	5
Rat2	CQS	120	3200	5
Rat3 +	CQI	45	1200	5
	CQM	90	2400	5
Rat4	CQS	150	4000	5

**Tableau 9 :** Concentrations et les volumes prélevés pour chaque échantillon de contrôle qualité du Rouge de phénol.

	Ech de CQ	Concentration (µg/ml)	Volume prélevé (µl)	Volume final (ml)
<b>Rat1</b> +	CQI	6	200	5
	CQM	12	400	5
<b>Rat2</b>	CQS	18	600	5
<b>Rat3</b> +	CQI	9	300	5
	CQM	18	600	5
<b>Rat4</b>	CQS	30	1000	5

✓ **Préparation des échantillons de contrôle qualité en milieu biologique**

**Tableau 10 :** Concentrations et les volumes prélevés des CQ aqueux ainsi du perfusât intestinal pour chaque échantillon de contrôle biologique.

	Ech de CQ	Concentration (Naproxène) (µg/ml)	Concentration (Rouge de phénol) (µg/ml)	Volume prélevé du CQ du Naproxène (µl)	Volume prélevé du CQ de Rouge de phénol (µl)	Volume du perfusât intestinal (µl)
<b>Rat1</b> +	CQI	30	6	30	30	300
	CQM	60	12	30	30	300
<b>Rat2</b>	CQS	120	18	30	30	300
<b>Rat3</b> +	CQI	45	9	30	30	300
	CQM	90	18	30	30	300
<b>Rat4</b>	CQS	150	30	30	30	300

**II.5.6.3. Préparation des échantillons à analyser**

✓ **Préparation des prélèvements**

Pour chacun des six (06) prélèvements constituant un essai (P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>in</sub>) 300 µl sont prélevés dans des vials et auxquels sont ajoutés 60 µl de phase mobile. Qui seront ensuite vortexées pendant 20 secondes puis misent dans l'auto-injecteur du système d'HPLC en attente d'analyse.

### ✓ Préparation de blanc

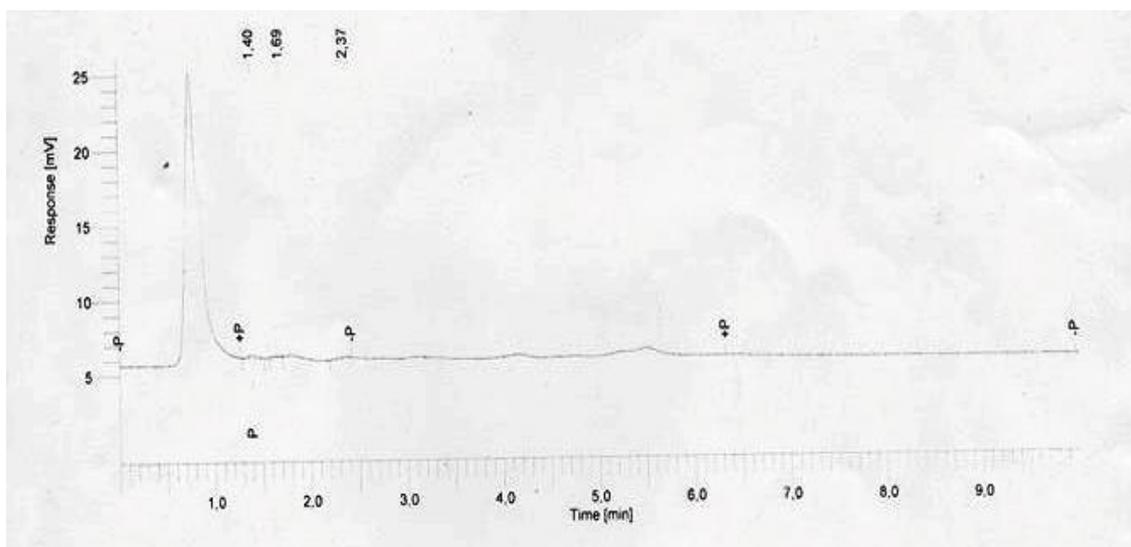
Dans une vial, 300 µl du blanc est mélangé avec 60 µl de phase mobile, qui sera vortexée aussi pendant 20 secondes. Il a pour intérêt de vérifier qu'il n'y a pas une interférence entre les molécules et la matrice biologique.

## III. Résultats et interprétation

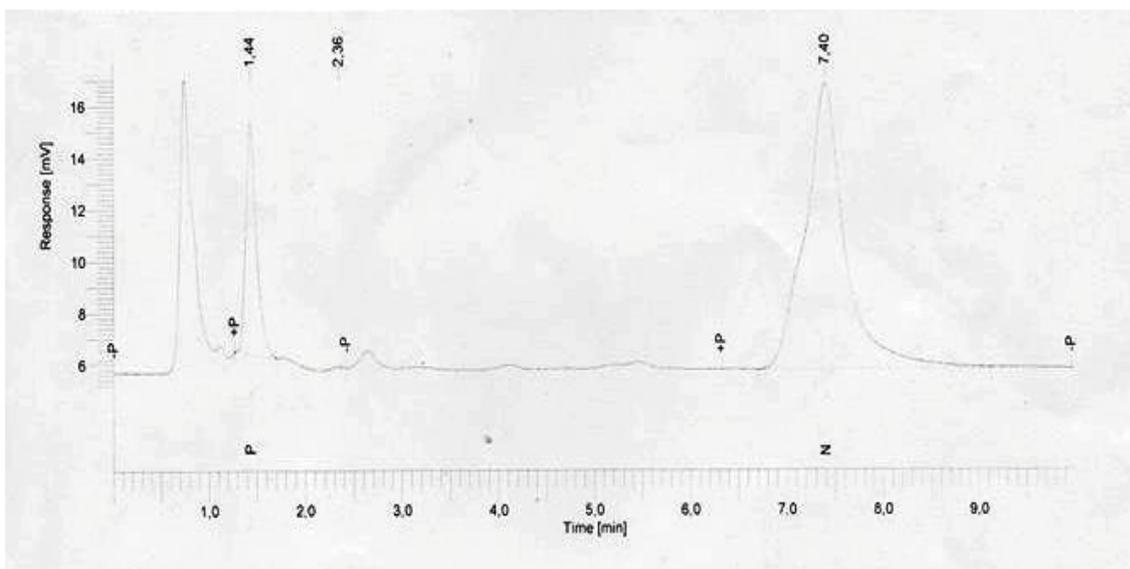
### III.1. Dosage bio-analytique du Naproxène et du Rouge de Phénol

Les critères d'acceptation adoptés dans cette étude seront ceux exigés par la ligne directrice de l'EMA concernant la validation des méthodes bio-analytique, 2011.

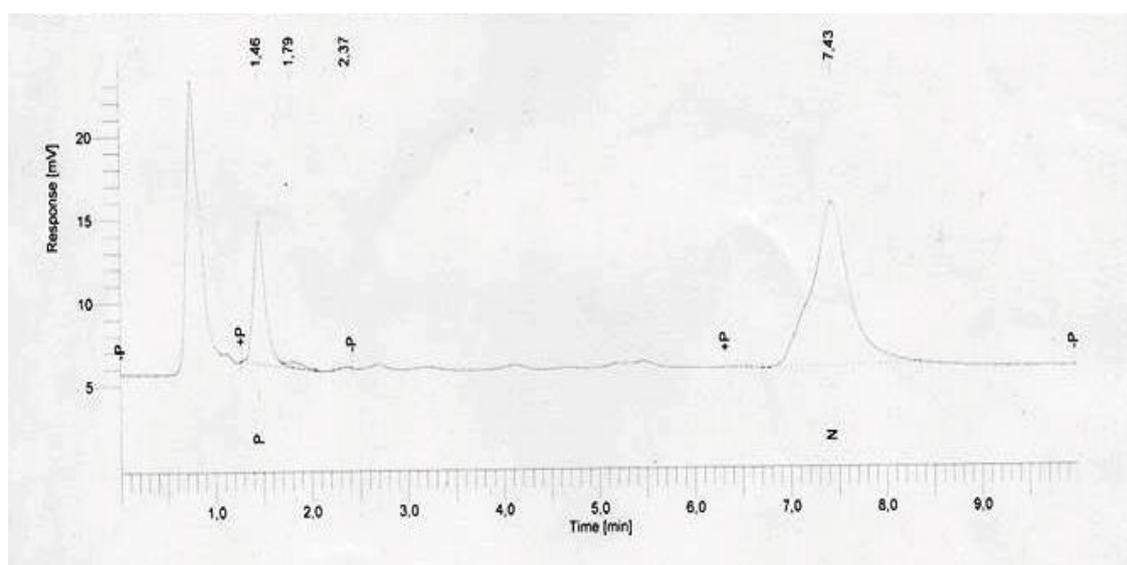
Les résultats présentés ci-dessous, sont à titre exemple pour le rat 1. Les résultats des rats 2, 3 et 4 sont traités de la même manière que le premier rat pour le calcul des différentes concentrations ainsi les coefficients de  $P_{\text{eff}}$ , et les résultats sont représentés dans les annexes C, D et E respectivement.



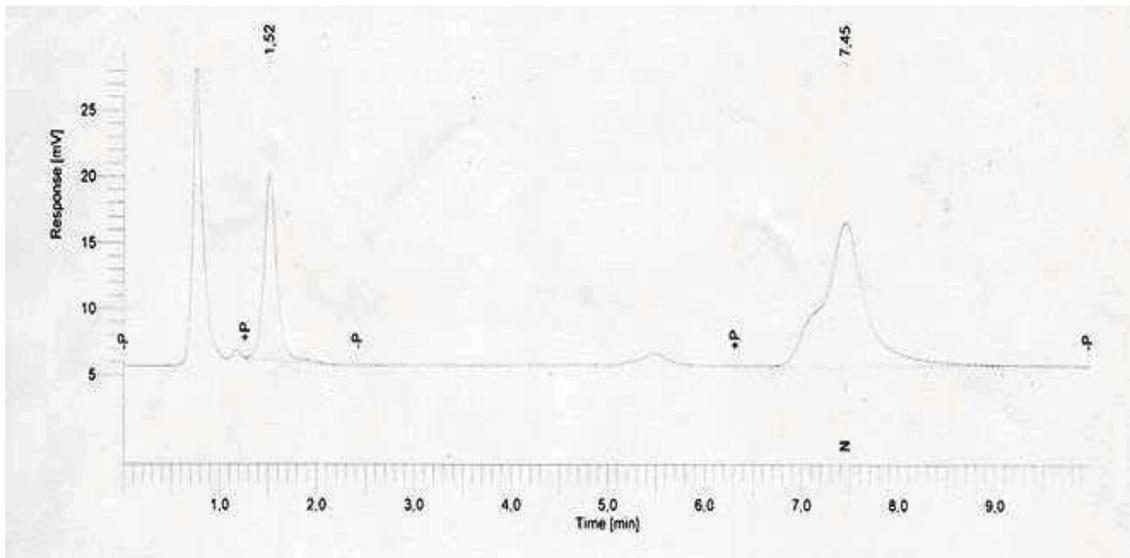
**Figure 26:** Chromatogramme représentatif du blanc du rat1.



**Figure 27:** Chromatogramme représentatif du Standard 3 de perfusât intestinal du rat1.



**Figure 28:** Chromatogramme représentatif d'échantillon de contrôle qualité moyen de perfusât intestinal du rat1.



**Figure 29:** Chromatogramme représentatif d'un échantillon P4 de perfusion intestinale du rat 1.

Les temps de rétention est approximativement de 1.5 min et 7 min pour le Rouge de phénol et le Naproxène respectivement.

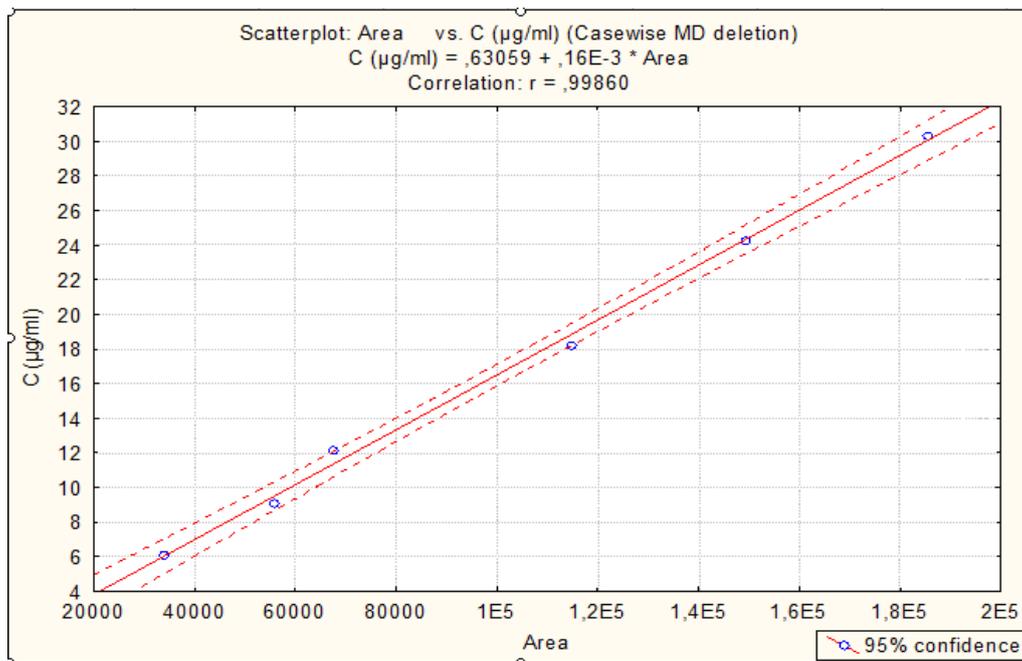
Le temps d'analyse chromatographique de chaque échantillon est de 10 minutes, ce qui permet d'analyser les échantillons de 2 rats dans une même séquence d'analyse.

Le chromatogramme du blanc ne présente aucun pic pouvant interférer avec les deux composés.

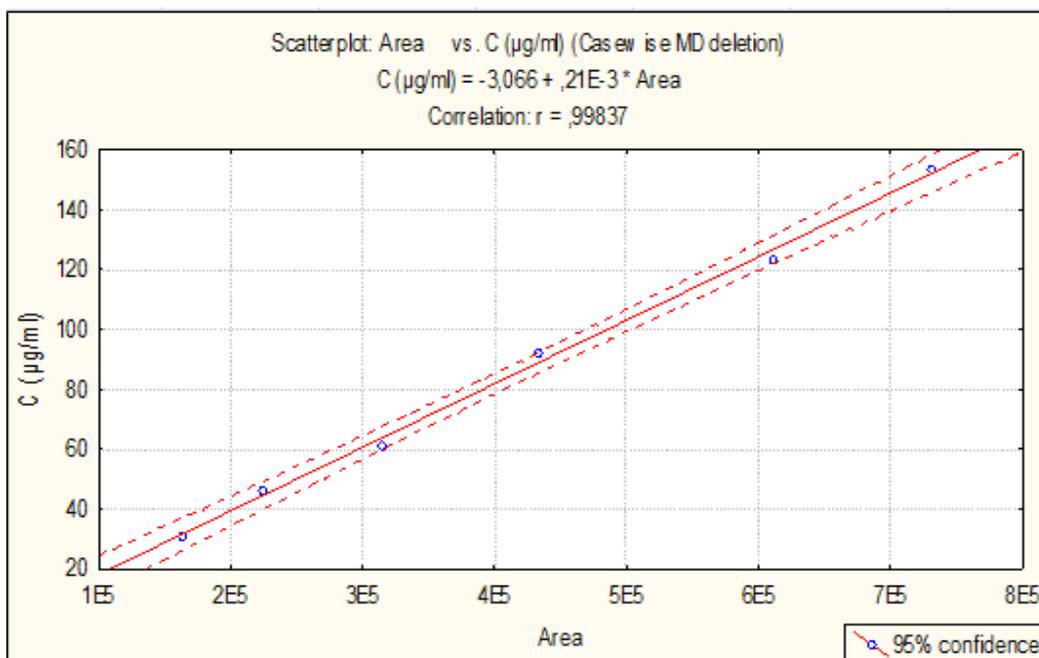
### III.1.1. Courbe d'étalonnage

Les surfaces des six standards préparés en milieu biologique vont servir pour tracer la courbe d'étalonnage.

La régression linéaire est déterminée à l'aide du logiciel STATISTICA 8 dont le coefficient de corrélation  $r$  doit être supérieur à 0.98.



**Figure 30:** Courbe de calibration des concentrations de Rouge de phénol (µg/ml) en fonction de la surface des pics chromatographiques des standards de rat 1.



**Figure 31:** courbe de calibration des concentrations de Naproxène (µg/ml) en fonction de la surface des pics chromatographiques des standards de rat 1.

➤ **Linéarité**

Les paramètres de la régression linéaire des deux courbes d'étalonnage de Rouge de phénol et du Naproxène respectivement du premier rat sont représentés dans le tableau 12.

**Tableau 11** : Paramètres de la régression linéaire des courbes d'étalonnage du naproxène et du rouge de phénol du rat 1

Equation de regression	Naproxène du sodium	Rouge de phenol
Domaine de linéarité	30-150 µg/ml	6-30 µg/ml
Pente b	- 3.066	0.63059
Intercept (ordonné à l'origine) a	0.21. 10 <sup>-3</sup>	0.16.10 <sup>-3</sup>
Coefficient de corrélation r	0.998	0.999

L'équation de régression de chaque courbe est donnée par la relation suivante :  $y = a .x + b$

Où, x est l'aire du pic et y est la concentration en µg / ml.

r est le coefficient de corrélation.

La technique s'est avérée linéaire dans l'intervalle de 6-30 µg/ml pour le Rouge de phénol et de 30-150 µg/ml pour le Naproxène de sodium car le coefficient de corrélation des courbes d'étalonnage des deux substances pour les 4 rats est supérieur à la limite d'acceptation (r = 0.999).

➤ **La justesse**

Les concentrations estimées sont calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage et le biais relatif est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Biais relatif (\%)} = \frac{C \text{ théorique} - C \text{ estimée}}{C \text{ théorique}} . 100$$

Le biais relatif ne doit pas dépasser 20% pour la concentration la plus faible (S1), et 15% pour les autres standards.

75% des points de la gamme doivent répondre à ces critères.

**Tableau 12 :** Concentrations et les biais relatifs des standards de Rouge de phénol et du Naproxène du rat 1.

Rat 1	Standard	C théorique (µg/ml)	Surface	C estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation
Rouge de phénol	S1	6,07	33981	6,07	1,00	20%
	S2	9.11	55942	9,58	6,38	15%
	S3	12.14	67625	11,45	4,64	15%
	S4	18.21	114657	18,98	5,38	15%
	S5	24.28	149418	24,54	2,21	15%
	S6	30.35	185585	30,32	1,06	15%
Naproxène de Sodium	S1	30.78	163074	31,18	1,30	20%
	S2	46.18	224717	44,12	4,44	15%
	S3	61.57	315042	63,09	2,48	15%
	S4	92,35	432471	87,75	4,98	15%
	S5	123,14	611353	125,32	1,77	15%
	S6	153,92	731488	150,55	2,19	15%

✓ **Echantillons de Contrôle qualité**

Trois échantillons de contrôle de qualité avec des concentrations dans la plage d'étalonnage sont utilisés pour le rouge de phénol et le naproxène pour déterminer l'exactitude et la précision de la méthode.

Les concentrations calculées des contrôles de qualité ne doivent pas s'écarter de plus de 20% pour le CQI dont CQI égale à la LIQ et 15% dont le CQI est supérieur à la LIQ et de plus de 15 % pour les autres CQ par rapport aux concentrations théoriques.

**Tableau 13 :** Précision intra-essais obtenue à partir de la courbe d'étalonnage avec 3 niveaux d'échantillons de Control Qualité du rat 1.

Composés	CQ	C théorique (µg/ml)	Surface	C estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limite d'acceptation
Rouge de phénol	CQI	6,07	36400	6,45	7,45	20%
	CQM	12,03	71237	12,02	0,18	15%
	CQS	18,00	124918	20,62	14,5	15%
Naproxène de sodium	CQI	31,36	138000	25,91	17,37	20%
	CQM	62,72	265235	52,63	16,08	15%
	CQS	125,44	552324	112,92	9,98	15%

### ➤ Précision et exactitude

D'après les résultats représentés dans le tableau 13 du premier rat, et les résultats représentés dans les annexes C, D et E pour les rats 2, 3 et 4 respectivement, 92% des valeurs des biais relatifs sont inférieures aux limites d'acceptation donc la méthode est exacte sur le domaine 6-30 µg/ml et 30-150 µg/ml pour le rouge de phénol et le naproxène respectivement.

### III.1.2. Détermination des concentrations des échantillons

Les concentrations des échantillons sont calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage.

**Tableau 14 :** Concentrations estimées des échantillons calculées à partir de la courbe de calibration du rat 1.

Composés	Prélèvements	Surface	C estimée (µg/ml)
Rouge de phénol	P0	156645	25,69
	P1	154111	25,28
	P2	148684	24,41
	P3	137983	22,70
	P3	125969	20,78
	Pin	171812	28,11
	PinF	162674	26,65
Naproxène de sodium	P0	355497	71,59
	P1	282973	56,36
	P2	280361	55,81
	P3	266062	52,81
	P4	329897	66,21
	Pin	549415	112,31
	PinF	519998	106,13

### III.2. Détermination de Perméabilité effective $P_{eff}$

Avant le calcul de  $P_{eff}$  du Naproxène, les concentrations du Naproxène doivent être corrigées par les concentrations de Rouge de phénol pour tenir compte des échanges de fluides dans le segment en utilisant l'équation suivante :

$$C'_{out N} = C_{out Naproxene} \times \left( \frac{C_{in R}}{C_{out R}} \right)$$

Où,

$C_{in}$  R : est la concentration du Rouge de phénol à l'entrée de l'intestin,  $C_{out}$  R : est la concentration du Rouge de phénol en sortie,  $C'_{out}$  N : est la concentration corrigée du Naproxène à la sortie.

**Tableau 15 :** Concentrations du Naproxène après perfusion à l'équilibre corrigées par le Rouge de phénol du rat 1.

Prélèvements	$C_{out}$ de rouge de phénol ( $\mu\text{g/ml}$ )	$C_{out}$ du naproxène ( $\mu\text{g/ml}$ )	$C'_{out}$ du naproxène ( $\mu\text{g/ml}$ )	$P_{eff}$ ( $\times 10^{-4}$ ) cm/s
P0	25,69	71,59	78,35	0.59
P1	25,28	56,36	62,67	0.95
P2	24,41	55,81	64,27	0.91
P3	22,70	52,81	65,40	0.88
P4	20,78	66,21	89,59	0.37
Pin	28,11	112,31	112,31	-
PinF	26,65	106,13	111,96	-

L'augmentation de la concentration corrigée du Naproxène en sorti indique la perte de fluide dans le segment. Comme le montre le tableau 15,

Les coefficients de perméabilité effective ( $P_{eff}$ ) sont calculés à partir des concentrations à l'état d'équilibre de composés dans le perfusât collecté en utilisant l'équation suivante selon le modèle de tube parallèle et les résultats sont représentés dans le tableau 15:

$$P_{eff} = -\frac{Q}{2\pi r l} \ln \frac{C_{out}(corrected)}{C_{in}}$$

Où :  $Q$  est le débit (0.2 ml/min),  $r$  est le rayon intestinal du rat (0.18 cm) et  $l$  est la longueur du segment.

**Tableau 16 :** Coefficients et la moyenne de perméabilité intestinale du Naproxène chez les 4 rats.

	Rat n°	$P_{eff}$ ( $\times 10^{-4}$ ) cm/s	Moyenne $P_{eff}$ ( $\times 10^{-4}$ ) cm/s	Ecart type ( $\times 10^{-4}$ )	CV (%)
Naproxène	Rat 1	0.78	1.10	0.95	86
	Rat 2	0.46			
	Rat 3	2.52			
	Rat 4	0.65			

Les coefficients de la perméabilité effective des rats 1, 2, 3 et 4 sont de  $0.78 \times 10^{-4}$  cm/s,  $0.46 \times 10^{-4}$  cm/s,  $2.52 \times 10^{-4}$  cm/s et  $0.65 \times 10^{-4}$  cm/s respectivement avec une moyenne de  $1.102 \times 10^{-4}$  cm/s ( $\pm 0.95$ ). Le coefficient de variation (CV) est de 86% calculé avec l'équation suivante :

$$CV (\%) = \frac{\text{Ecart type}}{\text{Moyenne de } P_{eff}} \times 100$$

#### IV. Discussion

La méthode utilisée pour l'évaluation de la perméabilité intestinale du Naproxène est la perfusion intestinale en un seul passage dans un segment jéjunal de rat. Les concentrations lumineuses à l'équilibre sont déterminées par la suite avec un dosage chromatographique par HPLC dans le perfusât intestinal.

Dans la présente étude la valeur de coefficient de perméabilité intestinale effective de Naproxène est de  $1.1 \times 10^{-4}$  ( $\pm 0.95$ ) cm/s chez quatre rats.

**Tableau 17:** Résultats des études de perméabilité de naproxène par le modèle SPIP.

Etude expérimentale	Le coefficient de perméabilité effective $P_{eff} \times 10^{-4}$ (cm / s)	L'écart type $\times 10^{-4}$ (cm/s)	Le coefficient de variation (%)
Notre étude	1.10	0.95	86
Salphati et al	1.67	0.82	49
Fagerholm et al	2.10	0.41	19
Kim et al.	1.19	0.12	10
Zakeri-Milani et al	1.17	0.23	20

Le résultat obtenu est approximativement similaire à ceux obtenus dans des études antérieures ayant examiné la perméabilité du naproxène de sodium en utilisant une perfusion intestinale en un seul passage chez le rat comme le montre le tableau 17. En effet, Salphati et al, ont rapporté un coefficient de perméabilité intestinale effective de  $1.67 \times 10^{-4}$  ( $\pm 0.82$ ) cm/s pour le Naproxène de sodium. Tandis que Fagerholm et al (1996) l'estiment à de  $2.1 \times 10^{-4}$  ( $\pm 0.41$ ) cm/s ; Zakeri-Milani et al (2005) l'évaluent à  $1.17 \times 10^{-4}$  ( $\pm 0.23$ ) cm/s et Kim et al à  $1.19 \times 10^{-4}$  ( $\pm 0.12$ ) cm/s.

D'après les résultats illustrés dans le tableau 16 ci-dessus, la  $P_{eff}$  du troisième rat, s'écarte de la tendance des résultats des trois autres rats, sachant que celle-ci a été calculée sans prendre en compte le changement de la concentration du Naproxène au niveau de la tubulure (absence de  $P_{in}$ ).

Ce qui nous fait croire que c'est à cause de cette valeur qu'on a obtenu un coefficient de variation aussi élevé (CV=86%). Effectivement, le calcul de la  $P_{\text{eff}}$  et le coefficient de variation sans compter la valeur de 3<sup>ème</sup> rat permet de réduire le CV jusqu'à 25% avec une perméabilité moyenne effective de  $0.63 \times 10^{-4} (\pm 0.16)$  cm/s.

La grande variabilité entre les résultats peut également être due à plusieurs facteurs, parmi eux : la variabilité interindividuelle chez les rats, la manipulation chirurgicale, le choix des rats (poids, sexe, l'âge) ainsi que la stabilité des échantillons.

La manipulation chirurgicale et l'anesthésie peuvent entraîner une diminution de débit sanguin et de la motilité intestinale qui provoque une diminution des transports. Les anesthésies peuvent aussi directement affecter les membranes cellulaires. (Yuasa et al 1993) ont rapporté que les barbituriques ont le moins d'effet sur la perméabilité intestinale chez le rat. Toutefois, On a utilisé dans cette étude le thiopental comme agent anesthésiant.

Il est à signaler que la durée entre la collecte des échantillons et le dernier dosage chromatographique est d'environ trois mois, durant laquelle on a essayé trois méthodes de dosage bio-analytique différentes jusqu'à l'obtention des résultats attendus. **(Walter et al 1996)** ; **(Takamatsu et al 1997)**; **(Zakeri-Milani et al 2004)**. Ce qui justifie l'absence de quelques échantillons qui ont été épuisés. Ceci a généré également des cycles de congélation / décongélation qui pourraient altérer la stabilité des échantillons. Donc il est important de vérifier la stabilité des échantillons durant la période de conservation.

Dans la présente étude, aucune différence liée au sexe n'est étudié auparavant, on a utilisé un rat mâle et trois rates femelles en raison du manque des rats mâles au niveau de service de pharmacotoxicologie. Cependant, des études précédentes **(Neal et al 1994)** ont montré que le sexe n'a aucune influence sur la perméabilité des AINS.

Bien que, la dépendance à l'âge de la perméabilité intestinale chez le rat doit être considérée comme un aspect important. Dans la présente étude l'âge n'est pas connu sachant qu'avec le vieillissement une diminution de la perméabilité peut être remarquée. Par ailleurs, Zakeri-Milani et al 2005 ont montré que l'âge n'a aucune influence sur la perméabilité jéjunale chez le rat dans l'intervalle de 5 à 30 semaines.

Dans la technique SPIP les médicaments avec  $P_{\text{eff, rat}}$  supérieur à  $0.2 \times 10^{-4}$  cm/s sont considérés comme des molécules très perméable (Patel et Brave 2012). Cela nous permet de dire que le résultat obtenu pour le naproxène dans notre étude concorde avec les résultats des molécules hautement perméables.

Des études précliniques antérieures ont évalué la perméabilité intestinale de Naproxène en utilisant d'autres méthodes. Lozoya-Agullo et al (2015) ont obtenu une perméabilité apparente de  $0.31 \times 10^{-4}$  ( $\pm 0.043$ ) cm/s en utilisant la lignée cellulaire caco-2. Tandis que, sugano et al (2003) ont obtenu une Papp de  $0.49 \times 10^{-4}$  ( $\pm 3.2$ ) cm/s en utilisant le test de PAMPA. Par ailleurs, Lennernas et al (2002) ont estimé la perméabilité intestinale du Naproxène dans le jéjunum humain à  $8.3 \times 10^{-4}$  ( $\pm 4.8$ ) cm/s. En comparant ces résultats avec ceux obtenus en utilisant la technique de SPIP, cette dernière donne des résultats plus proches de ceux in vivo.

Bien que les résultats qu'on a obtenu dans cette étude sont satisfaisants, plusieurs obstacles et difficultés ont été rencontrés tels que :

- la disponibilité des rats : bien que l'idéal était d'avoir quatre rats males, on s'est contenté d'un rat male et trois rats femelle en raison de l'indisponibilité de rats males de poids adéquat.
- la difficulté de la mise en œuvre de l'expérimentation animale : celle-ci ne peut aboutir qu'en cas de maîtrise poussée de plusieurs actes à la fois : contention, administration IP, anesthésie, dissection, suture,..., de plus que la durée de l'expérimentation est assez longue, ce qui nous a limité à un seul rat par jour.
- La méthode de dosage et la disponibilité de la chaine HPLC: on a du essayer trois méthodes différentes avant d'arriver aux résultats attendu ce qui généré un délai entre l'expérimentation animale et le dosage des prélèvements.

En dépit de ces limites, la méthode de perméabilité intestinale in situ chez le rat reste la méthode la plus accessible et la plus fiable par rapport aux conditions pratiques qui nous ont été disponible.

# Conclusion

Les études précliniques de perméabilité permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Les expérimentations sont essentiellement menées sur l'animal.

Notre étude expérimentale nous a permis d'évaluer la perméabilité intestinale d'une molécule de référence qui est le Naproxène de sodium, en utilisant la perfusion intestinale en un seul passage dans un segment jéjunal de rat SPIP avec l'utilisation de Rouge de phénol comme marqueur non absorbable pour corriger le flux d'eau.

La valeur de perméabilité  $P_{\text{eff}}$  obtenue pour le Naproxène est de  $1.1 \times 10^{-4}$  ( $\pm 0.95$ ) cm/s. Ce résultat concorde avec les résultats des molécules hautement perméables.

En effet, il y a une bonne corrélation entre la perméabilité effective in situ et la perméabilité in vivo chez l'homme, déterminée dans la présente étude pour le Naproxène de sodium par SPIP, les résultats de cette étude indiquent que ce modèle convient pour déterminer la perméabilité intestinale ainsi d'étudier les différents facteurs pouvant influencer l'absorption intestinale du composé, et semble être le modèle le plus robuste et le plus précis qui offre des avantages uniques du contrôle expérimental (concentration, taux de perfusion...) ce qui contribuera à classer les candidats médicaments en fonction de BCS.

Dans une perspective d'améliorer les résultats obtenus avec cette technique dans les prochaines études, il serait intéressant de :

- Augmenter le nombre des rats/essai.
- Sélectionner des rats de même sexe et dont l'âge est entre 5 à 30 semaines.
- Doser les échantillons de perfusât intestinal dans les brefs délais afin d'éviter tout problème lié à la stabilité.
- Optimiser la méthode de dosage colorimétrique du rouge de phénol et confronter les résultats avec ceux obtenus avec le dosage chromatographique.
- Evaluer d'autres molécules de référence ayant des profils d'absorption différents (faible, moyenne et forte perméabilité).

En fin, on souhaite que ce travail servira de support pour d'autres travaux futur qui viseront à compléter et continuer ce qu'on a entrepris et qu'on aimerait bien voir aboutir.

# Références bibliographiques

## LIVRES ET REVUES

- Aïache I-M; Devissaguet I-Ph : Guyot-Hermann A-M. Biopharmacie. Paris: Technique et documentation, 1978.
- Ansel. HC; Allen. LV; Popovich Ng. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 7e éd: Lippincott Williams and Wilkins; 1999.
- Ashford M. Assessment of biopharmaceutical properties, in Aulton's Pharmaceutics: The design and manufacture of medicines, M.E. Aulton, Editor 2007.
- Atkinson Arthur; Jr.Shiew-Mei; Huang Juan; LertoraSanford Markey. Principales of Clinical Pharmacology, 2012.
- Avdeef A. Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state. Wiley-interscience. 2003.
- Avdeef A. The rise of PAMPA. Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology. 2005.
- Barthe L; Woodley J; Houin G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. Review Fundam. Clin. Pharmacol. Elsevier.1999.
- Bender Andreas and Glen Robert C. Molecular similarity: a key technique in molecular informatics. Org. Biomol. Chem. 2004.
- Carsten Ehrhardt; Kwang-Jin Kim. Drug absorption studies in situ, in vitro and in silico models. Springer 2011.
- Chast François. Histoire contemporaine des médicaments. Paris : Éd de la découverte, coll. Histoire des sciences, 1995, revue n°27 : 22-23, juin 1999.
- Claverie I ; Hedde H. Pharmacologie générale, toxicologie: mécanismes fondamentaux ; 2eme édition ; 2003.
- Cloutier ; Bibiane et Nicole Ménard. Pharma-Fiches, 4e édition, Montréal, Gaëtan Morin, 2005.
- Cox Gad Shayne; PH.D; D.A.B.T. Peclinical Development Handbook: ADME and Biopharmaceutical Properties. Wiley-interscience. 2008.
- Dangoumau ; Nicholas Moore ; Mathieu Molimard, Annie Fourrier-Reglat ; Karin Latry ; Françoise Haramburu ; Ghada Miremont-Salame ; Karine Titier .Pharmacologie Générale. Edition 2006.
- Edward H; Kerns; Di Li. Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods. From ADME to Toxicity Optimization: Elsevier; 2008.
- Faure Sébastien ; Guerriaud Mathieu ; Clère Nicolas. Bases fondamentales en pharmacologie édition 2014, Elsevier Masson SAS.

- Ganong W, Physiologie médicale. De Boeck Supérieur, 2005.
- Gibson GG; Skett P. Introduction to Drug Metabolism. 3e éd: Nelson Thornes Publishers; 2001.
- Gosling J. A; Harris P. F ; Whitmore I ; and Willan P. L. T, Anatomie humaine: Atlas en couleurs. De Boeck Supérieur, 2003.
- Gropper S.S; and Smith J.L. Advanced Nutrition and Human Metabolism: Cengage Learning; 2012.
- Grudzinskas CV: Design of Clinical Development programs dans Principles of clinical pharmacology, édité par Atkinson AJ, Daniels CE, Dedrick RL, Grudzinskas CV, Markey SP, San Diego: Academic Press, 2001.
- Karp G. Cell and molecular biology: concepts and experiments. 7th ed. éd: Hoboken, NJ : John Wiley; 2013.
- Le Ferrec Eric; Chesne Christophe; Artusson Per; Brayden David Et Coll. In Vitro Models Of The Intestinal Barrier. The Report And Recommendations Of Ecvam Workshop 46. European Centre For The Validation Of Alternative Methods. 2001.
- Le Hir A ; Jean-Claude ; Chaumeil ; Denis Brossard. Pharmacie galénique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. Edition 2009
- Leblanc P-P ; Aiache J-M ; Besner J-G ; Buni P ; Lesne M et coll. Traité de biopharmacie et de pharmacocinétique 3eme édition. Vigot 1997.
- Lodish M. H; Berk M. A; Matsudaira P; and J. Darnell. Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck Supérieur, 2005.
- Lucius, R ; and Schwegler ; J.S. Der Mensch - Anatomie und Physiologie: Thieme; 2011.
- Marieb EN ; Hoehn K. Anatomie et physiologie humaines. 4e éd: Pearson Education, Inc.; 2010
- Messmann; H. Klinische. Gastroenterologie: Thieme; 2011
- Rang HP; Dale MM; Ritter JM; Flower RJ. Rang and Dale's Pharmacology. 6e éd: Elsevier; 2007.
- Smith; P.L; et al. Routes of delivery. Case studies (5): oral absorption of peptides and proteins. Adv Drug Deliv Rev 1992.
- Tortora et Grabowski. Principe d'Anatomie et de physiologie 2ième éd. De Boeck Université. 1994.
- Ungell Anna-Lena; J.K. Cell cultures in drug discovery: An industrial perspective, in Drug bioavailability: Estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability, H.L. Han van de Waterbeemd, Per Artursson, Editor 2003.
- Washington N. Physiological pharmaceuticals: barriers to drug absorption. 2nd ed. éd. Washington C, Wilson CG, rédacteurs. London: Taylor & Francis; 2001.
- Windelspecht M. The digestive system. Greenwood Press. 2004.
- Yang, Y. and Yu L.X, Chapter 12 - Oral drug absorption, evaluation, and prediction, in developing solid oral dosage forms, Q. Yihong, et al., Editors. 2009, Academic Press: San Diego. p. 289-308.

## ARTICLES ET THESES

- Amidon GL ; Lennernäs H ; Shah VP ; Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *PHARMACEUTICAL RESEARCH*. 1995.
- Balon K; B.U. Riebesehl and Muller B.W. Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption. *Pharm Res*, 1999.
- Bermejo Marival; Avdeef A; Ruiz Ana; Nalda Ricardo et coll. PAMPA—a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier 2004.
- Berthelemy Marion. Thèse Sur L'évaluation Du Rapport Bénéfice/Risque Des Médicaments En Europe. Faculté De Pharmacie, Université De Lorraine. 2014.
- Boroujerdi M. *Pharmacokinetics and Toxicokinetics*: CRC Press; 2015
- Burstein AH; Cox DS; Mistry B; Eddington ND. Phenytoin pharmacokinetics following oral administration of phenytoin suspension and fosphenytoin solution to rats. *Epilepsy research*. 1999.
- Chen H; Langer R. Oral particulate delivery: Status and future trends. *Adv Drug Deliv Rev* 1998.
- Congreve Miles; Carr Robin; Murray Chris; and Harren Jhoti. A 'rule of three' for fragment-based lead discovery. *Drug Discovery Today*. 2003.
- Cooper GM. *The cell: a molecular approach*. 5th ed. éd. Hausman RE, rédacteur. Washington, DC: Sunderland, MA: ASM Press: Sinauer Associates; 2009.
- Cucherat Michel. *Interprétation des essais cliniques pour la pratique médicale - Faculté de Médecine Lyon – Laennec - Mis à jour : aout 2009*
- DAVIES Neal M,Wrught Matthew R Et Jamali Fakhreddin. *Anti-Inflammatory Drug-Induced Small Intestinal Permeability: The Rat Is A Suitable Model*. 1994
- Dossou-Yovo. Thèse sur la Modification de la biodisponibilité orale des médicaments : interactions “ Herb-Drugs ” “ DrugsDrugs”. *Médecine humaine et pathologie*. 2014.
- Egan W.J and Lauri G. Prediction of intestinal permeability. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002.
- Eichmann J, D A. Bakry Yassin, E and J. Robinson. The influence of in vivo carbonation on GI physiological processes and drug permeability. *European J of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1997.
- EMEA, *Guideline on bioanalytical method validation*. European Medicines Agency. 2011
- Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H, *Pharm. Res*. 13 (1996) 1336–1342.
- György M. Keserü and Gergely M. Makara. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2009.

- Hann, Mike M and Oprea Tudor I. Pursuing the leadlikeness concept in pharmaceutical research. *Current opinion in chemical biology*, 2004.
- Hidalgo, I.J. and R.T. Borchardt. Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1990.
- Hubatsch I; E.G; E. Ragnarsson and P. Artursson, Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature protocols*, 2009.
- Izzo; A.A. and E. Ernst, Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. *Drugs*, 2001.
- Johansson M.E.V; Sjövall H; and Hansson, G.C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013
- Johansson M.E; J.M. Larsson; and G.C. Hansson, The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011.
- Kaminsky LS ; Zhang Q-Z. The Small Intestine as a Xenobiotic-Metabolizing Organ. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2003.
- Kansy M; F Senner; and K. Gubernator. Physicochemical high throughput screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the description of passive absorption processes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1998.
- Kim Jae-Seung, Mitchell Stefanie, Kijek Paul, Tsume Yasuhiro, Hilfinger John, and Gordon L. Amidon The Suitability of an in Situ Perfusion Model for Permeability Determinations: Utility for BCS Class I Biowaiver Requests. *Molecular Pharmaceutics*.2006.
- Leclaire Marie-Eve. Thèse sur la Validation et conditionnement d'un test PAMPA amélioré pour l'évaluation de la perméabilité membranaire de médicaments. *Faculté de pharmacie, Université de Montréal*. juillet, 2014.
- Lelong-Boulouard V. Notions pharmacocinétiques de base – Janvier 2007 publié par J.Alexandre. principes de pharmacocinétique. atelier pharmacologie DESC PCET mai 2015.
- Lin JH ; Chiba M ; Baillie TA. Is the Role of the Small Intestine in First-Pass Metabolism Overemphasized. *Pharmalogical Reviews*. 1999.
- Lindenberg M; Kopp S; Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004.
- Lipinski C.A; Lombardo F; Dominy B.W; and Feeney, P.J. Experimental and computational methods approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997.

- Lozoya-Agullo Isabel, Isabel Gonzalez- Alvarez, Marta Gonzalez-Alvarez, Matilde Merino-Sanjuan, Marival Bermejo. In Situ Perfusion Model in Rat Colon for Drug Absorption Studies: Comparison with Small Intestine and Caco-2 Cell Model. 2015.
- Morelli Xavier; Bourgeas Raphael; and Roche Philippe. Chemical and structural lessons from recent successes in protein-protein interaction inhibition (2P2I). *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011.
- Ohno S; Nakajin S. Determination of mRNA expression of human UDP glucuronosyl transferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2009.
- Ong, S; H. Liu; and C. Pidgeon. Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. *Journal of Chromatography A*, 1996.
- Paine MF; Khalighi M; Fisher JM; Shen DD; Kunze K; et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997. Epub 1998
- Patel J. R et Kalyani H. Barve. Intestinal Permeability of Lamivudine Using Single Pass Intestinal Perfusion. *Journal pharma*. 2012.
- Peetla, C; A. Stine; and V. Labhasetwar. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol Pharm*, 2009.
- Peters SA; Ungell AL; Dolgos H. Physiologically based pharmacokinetics (PBPK) modelling and simulation: applications in lead optimization. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009.
- Praveen V; Balimane and Saeho Chong. Cell-Culture based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discovery Today Reviews* 2005.
- Reed KK; Wickham R. Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro. *Semin Oncol Nurs* 2009.
- Rozehnal V ; Nakai D ; Hoepner U ; Fischer T ; Kamiyama E ; et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *Eur J Pharm*. 2012.
- Ruell; J.A; Tsinman K.L; and Avdeef A. PAMPA—a drug absorption in vitro model: 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and pKaflux—optimized design (pOD-PAMPA). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003.
- Salphati L, Childers K, Pan L, Tsutsui K, Takahashi L. *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (2001) 1007–1013.
- Sugano Kiyohiko, Yoshiaki Nabuchi, Minoru Machida, Yoshinori Aso. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003.

- Takamatsu N; Welage L.S; Idkaidek N.M; Liu D.Y; Lee P.I-D; Hayashi Y; Rhie J.K; Lennernas H; Barnett J.L; Shah V.R; Lesko L; Amidron G.L. Human intestinal permeability of piroxicam, propranolol, phenylalanine, and PEG 400 determined by jejunal perfusion, *Pharm.Res.* 1997, 14, 1127-1132.
- Thelen K; Dressman JB. Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *Journal of pharmacy and pharmacology.* 2009.
- Van de Waterbeemd H; Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise. *Nature reviews Drug discovery.* 2003.
- Walter E; Janich S; Roessler B.J; Hilfinger J.M.; Amidon G.L. HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: In vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans, *J.Pharm.Sci.*, 1996, 85, 1070-1076.
- Washington, DC .Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, *Pharmaceutical Industry Profile.* 2006.
- Willett Peter. Similarity searching using 2D structural fingerprints. *Methods in Molecular Biology,* 2011.
- Yang J; Jamei M; Yeo KR; Tucker GT; Rostami-Hodjegan A. Prediction of Intestinal First-Pass Drug Metabolism. *Current Drug Metabolism.* 2007.
- Yuan H; Li N; Lai Y. Evaluation of in vitro models for screening alkaline phosphatase mediated bioconversion of phosphate ester prodrugs. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 2009.
- Yuasa.H; Mustapha.J; Watanabe. Influence of anesthetic regimens on intestinal absorption in rats. *Pharm Res,* 10:884-888, 1993.
- Zakeri-Milani Parvin , Mohammad Barzegar-Jalali a, Hosniyeh Tajerzadeh b, Yadollah Azarmi a, Hadi Valizadeh. Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*2005.

## **LOI ET DECRET**

- L'article 14 de décret n° 76-139 du 23 octobre 1976 portant réglementation des produits pharmaceutiques.
- Décret exécutif n°92-284 du 6 juillet 1992 relatif à l'enregistrement des produits pharmaceutiques à usage de la médecine humaine.algérie 1992.
- L'article 4 de la loi 08/13 du 03 aout 2008 complétant l'article 169 de la loi 85-05 du 16 février 1985.

## SITES INTERNET

- Agence Nationale de Sécurité du médicament et des produits de santé. Autorisation de mise sur le marché de médicaments à usage humain. Publié septembre 2014- [http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/Constitution-de-dossier-d-AMM/\(offset\)/1](http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/Constitution-de-dossier-d-AMM/(offset)/1). consulté le : 16-0-2018.
- Detilleux Philippe G; DVM, PhD, Diplomate ACVP, Deputy Head, Global Drug Safety Evaluation. Toxicologie: grands principes - Septembre 2010 <http://docplayer.fr/7237675-Toxicologie-grands-principes.html>
- Europa – Synthèse de la Législation de l’UE – Médicaments à usage pédiatrique. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=LEGISSUM%3A122148> .Dernière modification le: 05.05.2014. Consulté le : 15-04-2018.
- Food and Drug Administration (U.S): Innovation or Stagnation: Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products, publié par 2004, <http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/whitepaper.Pdf>. Consulté le: 20-01-2018.
- Les étapes de développement d’un médicament publié par ROCHE FRANCE sur <http://www.roche.fr/medias.html>. Consulté le: 27-02-2018.
- Martzloff R. Encyclopédie Médicale Vulgaris. <http://video.vulgaris-medical.com/index.php/2007/07> . Consulté le: 25-03- 2018.
- Peltier Clair. Futura sciences. Le cycle de médicament. Publié le 22/02/2011, Modifié le 05/04/2017 <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-cycle-medicament-1125/> . Consulté le : 25-03-2018.
- Santé Canada: Direction des produits thérapeutiques, Calendrier des études d'innocuité précliniques pour la conduite d'essais cliniques de produits pharmaceutiques sur des sujets humains. 1998.
- Santé Canada: Direction générale des produits de santé et des aliments, Ligne directrice à l'intention de l'industrie: Considérations générales relatives aux études cliniques. 1997.
- Sciences du médicament Master 1 UE R&D et enregistrement du médicament <https://docplayer.fr/60968740-Master-1-sciences-du-medicament-ue-r-d-et-enregistrement-du-medicament.html>
- Site pédagogique de l’association des enseignants en pharmacologie de la faculté de médecine. France, 2018. <https://pharmacomedicale.org/>. Consulte-le: 15-03- 2018.

**Annexe**

## **Liste des annexes**

**Annexe A:** Différents consommables utilisés.

**Annexe B:** Différents réactifs chimiques utilisés.

**Annexe C:** Résultats de dosage du naproxène et rouge de phénol par HPLC pour rat 2

**Annexe D:** Résultats de dosage du naproxène et rouge de phénol par HPLC pour rat 3

**Annexe E:** Résultats de dosage du naproxène et rouge de phénol par HPLC pour rat 4

**Annexe F:** Décret d'enregistrement des médicaments en Algérie.

## Annexe A



Spatules



Seringues



Compresse



Matériel de dissection



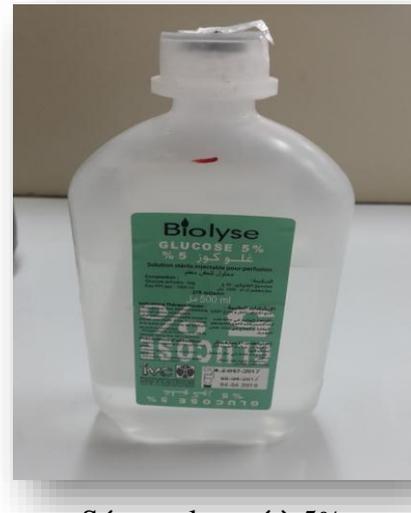
Vials

**Figure 1:** Différents consommables utilisés.

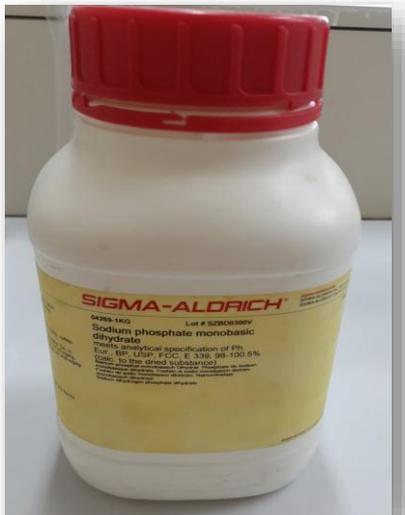
## Annexe B



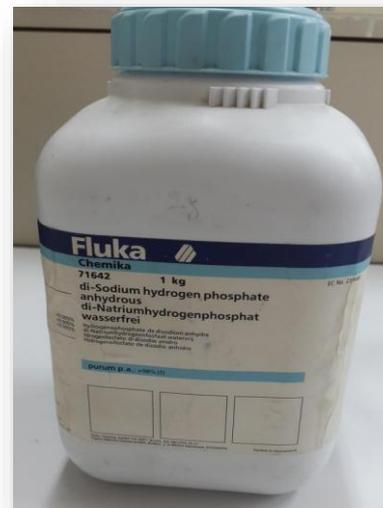
Eau distillé



Sérum glucosé à 5%



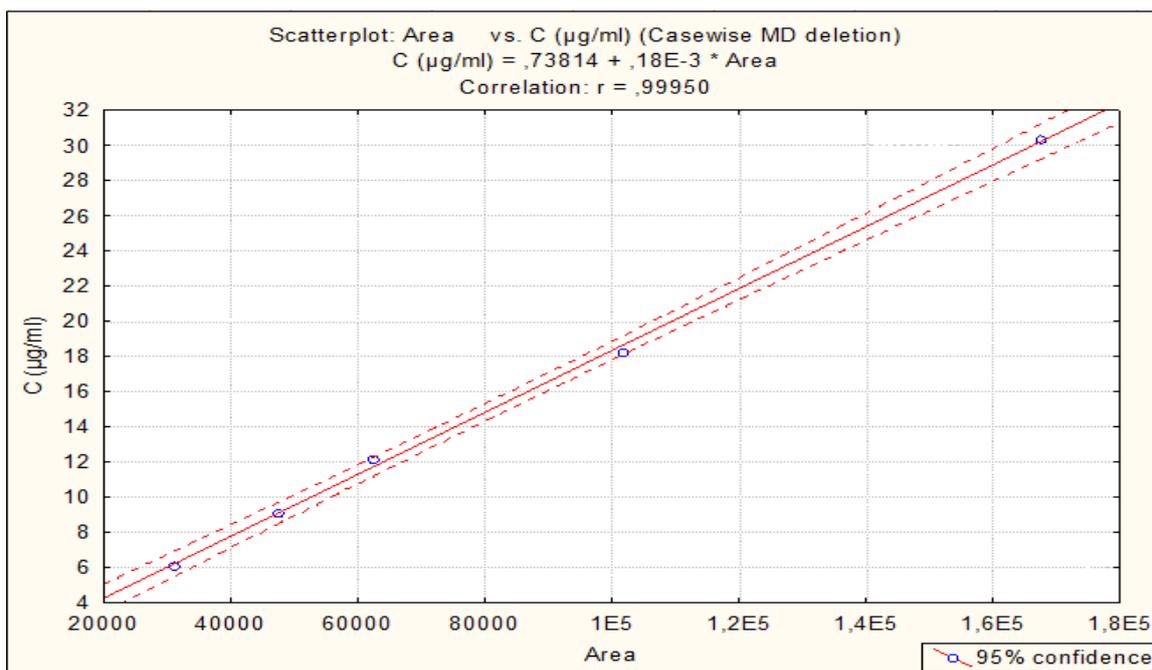
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$



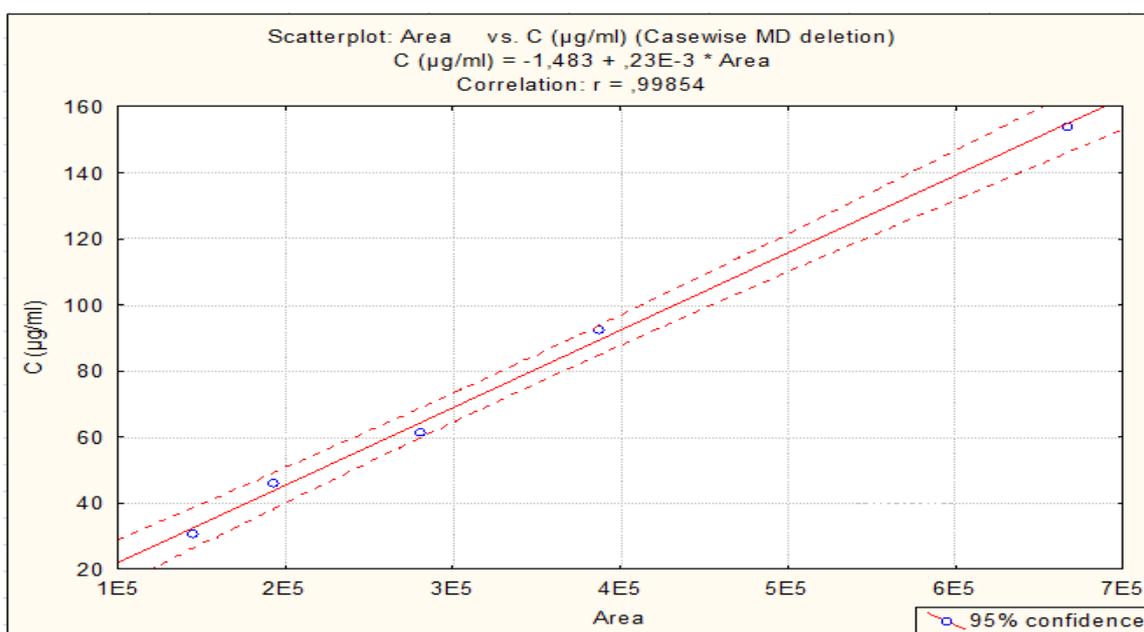
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$

**Figure 2:** Différents réactifs chimiques utilisés pour la préparation des solutions.

## Annexe C



**Figure 3:** Courbe de calibration des concentrations de Rouge de phénol (µg/ml) en fonction de la surface des pics chromatographiques des standards de rat 2.



**Figure 4:** courbe de calibration des concentrations de Naproxène (µg/ml) en fonction de la surface des pics chromatographiques des standards de rat 2.

**Tableau 1:** Paramètres de la régression linéaire des courbes d'étalonnage du Naproxène et du Rouge de phénol du rat 2.

Equation de regression rat 2	Naproxène	Rouge de phénol
Domaine de linéarité	6-30µg/ml	30-150µg/ml
Pente b	$0.23 \times 10^{-3}$	$0.18 \times 10^{-3}$
Intercept (ordonné à l'origine) a	-1,483	0,73814
Coefficient de corrélation r	0.99854	0.9995

**Tableau 2:** Concentrations et les coefficients de variation des standards de Rouge de phénol et du Naproxène du rat 2.

Composés	STD	C théorique (µg/ml)	Surface	C estimée (µg/ml)	Biais relatif(%)	Limite d'acceptation
Rouge de phénol	Std 1	6,07	31007	6,32	4,10	20%
	Std 2	9,11	47403	9,27	1,81	15%
	Std 3	12,14	62534	11,99	1,21	15%
	Std 4	18,21	101683	19,04	4,56	15%
	Std 5	24,28	64507	12,35	49,14	15%
	Std 6	30,35	167573	30,90	1,81	15%
Naproxène	Std 1	30,78	145102	31,89	3,61	20%
	Std 2	46,18	192813	42,86	7,17	15%
	Std 3	61,57	280874	63,12	2,52	15%
	Std 4	92,35	386719	87,46	5,29	15%
	Std 5	123,14	269798	60,57	50,81	15%
	Std 6	153,92	666400	151,79	1,38	15%

**Tableau 3:** Précision intra-essais obtenue à partir de la courbe d'étalonnage avec 2 niveaux d'échantillons de control qualité du rat 2.

Composés	CQ	C théorique (µg/ml)	Surface	C estimée (µg/ml)	Biais relatif(%)	Limite d'acceptation
Rouge de phénol	CQI	6,02	36014	7,22	20,02	20%
	CQS	24,06	132624	24,61	2,27	15%
Naproxène	CQI	31,36	155725	34,33	9,48	20%
	CQS	125,44	594334	135,21	7,79	15%

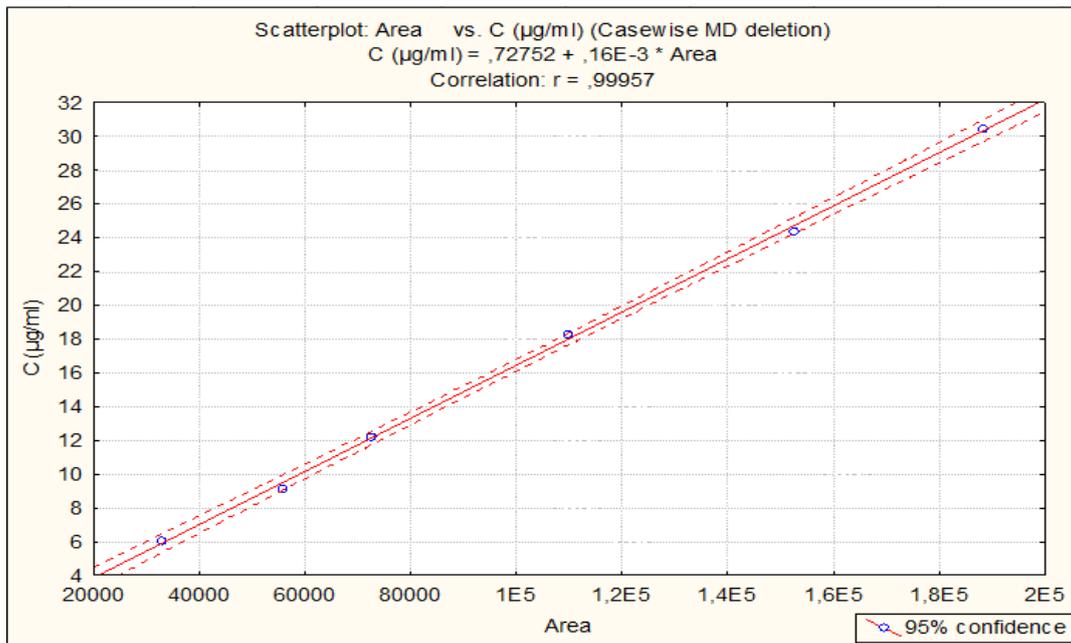
**Tableau 4:** Concentrations estimées des échantillons calculées à partir de la courbe de calibration du rat 2.

Composés	Prélèvements	Surface	C estimée (µg/ml)
Rouge de phénol	P1	118384	22,05
	P2	128049	23,79
	P3	130968	24,31
	P4	131988	24,5
	Pin	194108	35,68
Naproxène	P1	399794	90,47
	P2	365880	82,67
	P3	383783	86,79
	P4	453811	102,89
	Pin	700124	159,54

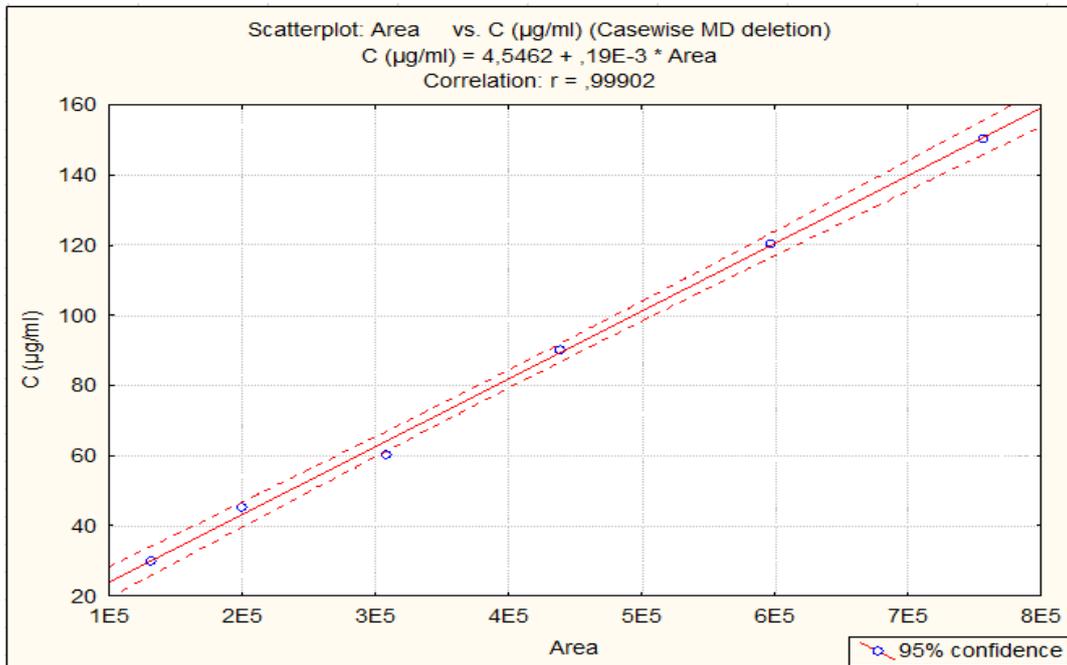
**Tableau 5:** Concentrations du Naproxène après perfusion à l'équilibre corrigées par le Rouge de phénol du rat 2.

Prélèvements	C <sub>out</sub> de Rouge de phénol (µg/ml)	C <sub>out</sub> du Naproxène (µg/ml)	C' <sub>out</sub> du Naproxène (µg/ml)	P <sub>eff</sub> (x 10 <sup>-4</sup> ) cm/s
P0				
P1	22,05	90,47	146,40	0.25
P2	23,79	82,67	123,99	0.74
P3	24,31	86,79	127,36	0.66
P4	24,49	102,89	149,86	0.18
Pin	35,68	159,54	159,54	
PinF				

## Annexe D



**Figure 5:** Courbe de calibration des concentrations de Rouge de phénol (µg/ml) en fonction de la surface des pics chromatographiques des standards de rat 3.



**Figure 6:** courbe de calibration des concentrations de Naproxène (µg/ml) en fonction de la surface des pics chromatographiques des standards de rat 3.

**Tableau 6:** Paramètres de la régression linéaire des courbes d'étalonnage du naproxène et du rouge de phénol du rat 3.

Equation de regression rat 3	Naproxène	Rouge de phénol
Domaine de linéarité	6-30µg/ml	30-150µg/ml
Pente b	$0.19 \times 10^{-3}$	$0.16 \times 10^{-3}$
Intercept (domaine à l'origine) a	4.5462	0.72752
Coefficient de corrélation r	0.99902	0.99957

**Tableau 7:** Concentrations et les coefficients de variation des standards de Rouge de phénol et du Naproxène du rat 3.

Composés	STD	C théorique (µg/ml)	Surface	C estimée (µg/ml)	Biais relatif(%)	Limite d'acceptation
Rouge de phénol	Std 1	6,10	32991	6,01	1,47	20%
	Std 2	9,14	55847	9,66	5,68	15%
	Std 3	12,19	72398	12,31	0,98	15%
	Std 4	18,29	109770	18,29	0,01	15%
	Std 5	24,38	152399	25,11	2,98	15%
	Std 6	30,48	188332	30,86	1,25	15%
Naproxène	Std 1	30,11	131483	29,53	1,94	20%
	Std 2	45,17	199237	42,40	6,12	15%
	Std 3	60,22	307994	63,06	4,72	15%
	Std 4	90,34	438022	87,77	2,84	15%
	Std 5	120,48	596395	117,86	2,17	15%
	Std 6	150,56	756266	148,24	1,54	15%

**Tableau 8:** Concentrations et les coefficients de variation des standards de Rouge de phénol et du Naproxène du rat 3.

Composés	CQ	C théorique (µg/ml)	Surface	C estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limite d'acceptation
Rouge de phénol	CQI	9,01	47077	8,16	9,45	15%
	CQM	18,01	106295	17,63	2,13	15%
	CQS	30,02	163633	26,80	10,72	15%
Naproxène	CQI	45,38	217138	45,80	0,92	15%
	CQM	90,77	451341	90,30	0,51	15%
	CQS	151,28	761162	149,17	1,40	15%

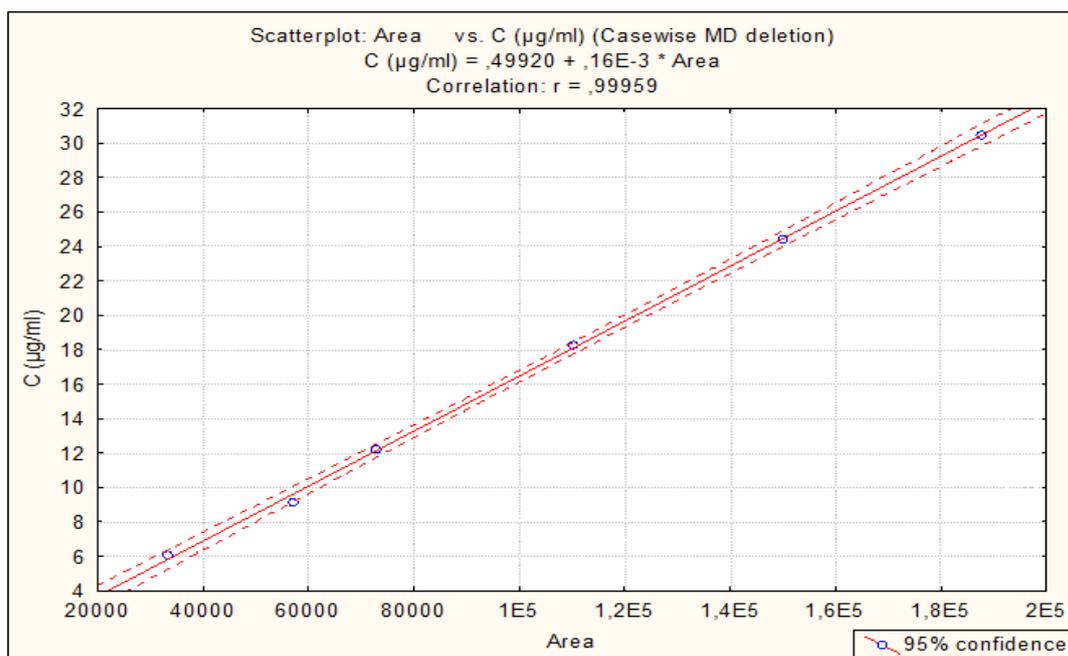
**Tableau 9:** Concentrations estimées des échantillons calculées à partir de la courbe de calibration du rat3.

Composés	Prélèvements	Surface	C estimée (µg/ml)
Rouge de phénol	P0	126114	20,91
	P2	109472	18,24
	P3	118297	19,65
	P4	130721	21,64
	PinF	63884	10,95
Naproxène	P0	307847	63,04
	P2	171953	37,22
	P3	452109	90,45
	P4	255655	53,12
	PinF	566851	112,25

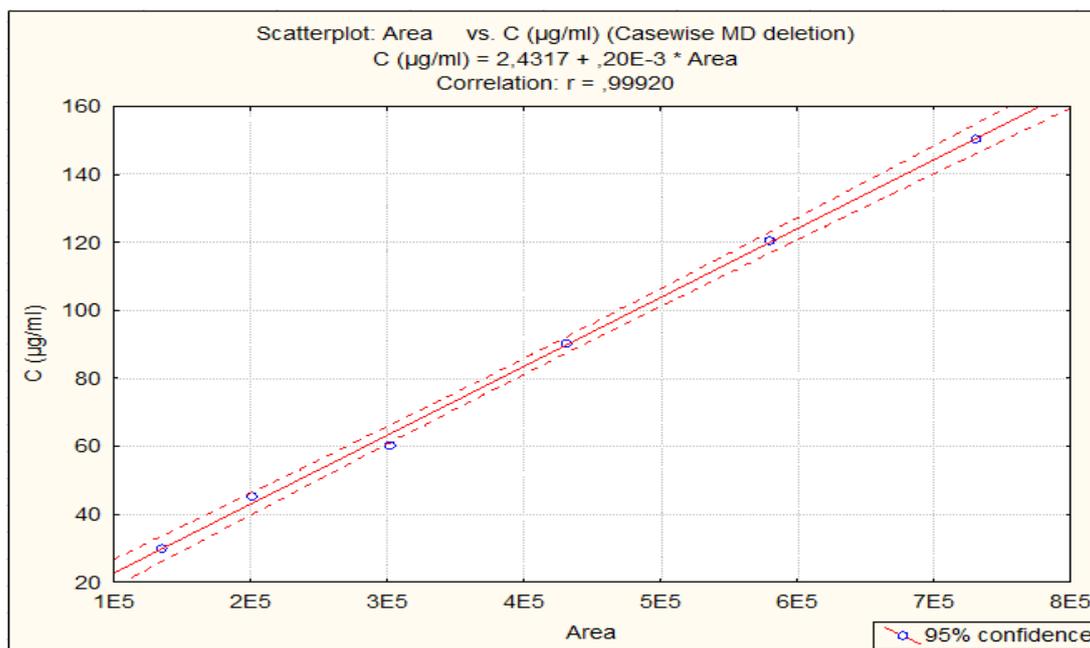
**Tableau 10:** Concentrations du Naproxène après perfusion à l'équilibre corrigées par le Rouge de phénol du rat 3.

Prélèvements	C <sub>out</sub> de rouge de phénol (µg/ml)	C <sub>out</sub> du Naproxène (µg/ml)	C' <sub>out</sub> du Naproxène (µg/ml)	P <sub>eff</sub> (x 10 <sup>-4</sup> ) cm/s
P0	20,90	63,04	33,01	2.40
P1				
P2	18,24	37,22	22,34	3.17
P3	19,65	90,45	50,38	1.57
P4	21,64	53,12	26,87	2.80
Pin				
PinF	10,95	112,25	112,25	

## Annexe E



**Figure 7:** Courbe de calibration des concentrations de Rouge de phénol (µg/ml) en fonction de la surface des pics chromatographiques des standards de rat 4.



**Figure 8:** courbe de calibration des concentrations de Naproxène (µg/ml) en fonction de la surface des pics chromatographiques des standards de rat 4.

**Tableau 11:** Paramètres de la régression linéaire des courbes d'étalonnage du naproxène et du rouge de phénol du rat 4.

Equation de regression rat 4	Naproxène	Rouge de phénol
Domaine de linéarité	6-30µg/ml	30-150µg/ml
Pente b	$0.20 \times 10^{-3}$	$0.16 \times 10^{-3}$
Intercept (domaine à l'origine) a	2,4317	0,4992
Coefficient de corrélation r	0.9992	0.99959

**Tableau 12:** Concentrations et les coefficients de variation des standards de Rouge de phénol et du Naproxène du rat 4.

Composés	STD	C théorique (µg/ml)	Surface	C estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limite d'acceptation
Rouge de phénol	Std 1	6,10	33263	5,82	4,51	20%
	Std 2	9,14	57140	9,64	5,44	15%
	Std 3	12,19	72841	12,15	0,31	15%
	Std 4	18,29	110160	18,12	0,89	15%
	Std 5	24,38	150118	24,52	0,55	15%
	Std 6	30,48	187552	30,51	0,09	15%
Naproxène	Std 1	30,11	134820	29,40	2,38	20%
	Std 2	45,17	200925	42,61	5,65	15%
	Std 3	60,22	302505	62,93	4,50	15%
	Std 4	90,34	430881	88,61	1,91	15%
	Std 5	120,48	579652	118,36	1,76	15%
	Std 6	150,56	730161	148,46	1,39	15%

**Tableau 13:** Précision intra-essais obtenue à partir de la courbe d'étalonnage avec 3 niveaux d'échantillons de control qualité du rat 4.

Composés	CQ	C théorique (µg/ml)	Surface	C estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limite d'acceptation
Rouge de phénol	CQI	9,01	44657	7,64	15,13	15%
	CQM	18,01	99267	16,38	9,06	15%
	CQS	30,02	153794	25,11	16,37	15%
Naproxène	CQI	45,38	204848	43,40	4,37	15%
	CQM	90,77	417756	85,98	5,27	15%
	CQS	151,28	698546	142,14	6,04	15%

**Tableau 14:** Concentrations estimées des échantillons calculées à partir de la courbe de calibration du rat 4.

Composés	Prélèvements	Surface	C estimée (µg/ml)
Rouge de phénol	P0	114442	18,81
	P1	107094	17,63
	P2	111461	18,33
	P3	107543	17,71
	P4	107902	17,76
	Pin	174460	28,41
	PinF	163625	26,68
Naproxène	P0	402615	82,95
	P1	251124	52,66
	P2	278151	58,06
	P3	289806	60,39
	P4	306082	63,65
	Pin	594195	121,27
	PinF	520141	106,46

**Tableau 15:** Concentrations du Naproxène après perfusion à l'équilibre corrigées par le Rouge de phénol du rat 4.

Prélèvements	C <sub>out</sub> de rouge de phénol (µg/ml)	C <sub>out</sub> du Naproxène (µg/ml)	C' <sub>out</sub> du Naproxène (µg/ml)	P <sub>eff</sub> (x 10 <sup>-4</sup> ) cm/s
P0	18,81	82,95	125,30	0.08
P1	17,63	52,66	84,84	0.88
P2	18,33	58,06	89,98	0.73
P3	17,71	60,39	96,91	0.55
P4	17,76	63,65	101,80	0.43
Pin	28,41	121,27	121,27	-
PinF	26,68	106,46	113,38	-

# Annexe F

## Décret exécutif n° 92-284 du 6 juillet 1992 relatif à l'enregistrement des produits pharmaceutiques à usage de la médecine humaine.

Le Chef du Gouvernement,

Sur le rapport du ministre de la santé et des affaires sociales,

Vu la Constitution, notamment ses articles 81 et 116 ;

Vu la loi n° 85-05 du 16 février 1985, relative à la promotion et à la protection de la santé, modifiée et complétée ;

Vu la loi n° 89-02 du 7 février 1989 relative aux règles générales de protection du consommateur ;

Vu le décret n° 80-142 du 17 mai 1980 fixant les attributions, la composition et le fonctionnement de la commission centrale de la nomenclature ;

Vu le décret exécutif n° 92-285 du 6 juillet 1992 relatif à l'autorisation d'exploitation d'un établissement de production et/ou distribution des produits pharmaceutiques ;

**Décète :**

### TITRE I

#### OBJET - DEFINITION

Article 1<sup>er</sup>. — Le présent décret a pour objet de définir les conditions de l'enregistrement des produits pharmaceutiques à usage de la médecine humaine.

Art. 2. — Sont soumis à l'enregistrement les produits pharmaceutiques tels que définis aux articles 169, 170 et 171 de la loi n° 85-05 du 16 février 1985 susvisée.

Toutefois, ne sont pas soumises à enregistrement les préparations magistrales officinales ou galéniques à usage humain, préparées par le pharmacien dans son

Toutefois, ne sont pas soumises à enregistrement les préparations magistrales officinales ou galéniques à usage humain, préparées par le pharmacien dans son officine et délivrées dans son officine au détail et sans publicité, sans préjudice des dispositions des articles 174 et 176 de la loi n° 85-05 du 16 février 1985 susvisée.

Toute personne physique ou morale ayant intérêt à agir, peut démontrer qu'un produit donné, non présenté comme médicament, possède des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines. Ce produit est alors soumis aux dispositions de la loi n° 85-05 du 16 février 1985 et des textes subséquents.

Art. 3. — La dénomination spéciale prévue à l'article 172 de la loi n° 85-05 du 16 février 1985 est :

— soit une dénomination commerciale,

— soit la dénomination commune internationale (D.C.I.), telle que retenue par l'organisation mondiale de la santé, suivie du nom du fabricant.

Lorsque la dénomination spéciale est une dénomination commerciale, la D.C.I. doit figurer en caractères apparents immédiatement au-dessous de la dénomination commerciale.

La dénomination commerciale doit être choisie de façon à éviter toute confusion avec d'autres produits pharmaceutiques et ne pas induire en erreur sur les qualités ou les propriétés de la spécialité.

Art. 4. — On désigne par produit pharmaceutique générique, toute spécialité dont la composition est essentiellement similaire à un produit pharmaceutique déjà commercialisé sur le territoire national, dont au moins un dosage de la même forme pharmaceutique a été enregistré conformément aux dispositions du présent décret, et qu'il n'est pas fait état d'amélioration thérapeutique par rapport au médicament de référence.

Un produit pharmaceutique générique est considéré comme essentiellement similaire au produit pharmaceutique original, lorsqu'il a la même composition qualitative et quantitative en principe(s) actif(s) qu'il est présenté sous la même forme pharmaceutique et que, lorsque nécessaire, la bioéquivalence avec le premier produit a été démontrée par des études appropriées de biodisponibilité.

Art. 5. — La nomenclature nationale des produits pharmaceutiques à usage de la médecine humaine est le recueil des produits pharmaceutiques enregistrés conformément aux dispositions du présent décret.

La nomenclature nationale des produits pharmaceutiques est mise à jour continuellement par :

- l'inscription de nouveaux produits,
- le non renouvellement d'enregistrement,
- le retrait de produits,

prononcés conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

La nomenclature fait mention pour tous les produits :

— de la dénomination commune internationale (D.C.I.) telle que retenue par l'organisation mondiale de la santé, lorsqu'elle existe. A défaut, elle fait mention de la dénomination usuelle ou la dénomination scientifique des principes actifs qu'ils contiennent.

— de la dénomination spéciale,

— de la forme pharmaceutique et du dosage en principe (s) actif (s),

— des restrictions d'utilisation, le cas échéant.

**TITRE II**  
**DE LA DECISION D'ENREGISTREMENT**  
**DE PRODUIT**

Art. 6. — La décision d'enregistrement de produit mentionne le nom et l'adresse du responsable demandeur, et, s'il est distinct, le nom et l'adresse du fabricant ainsi que le(s) lieu(x) où sont effectuées les opérations de production.

Elle indique en annexe les principales caractéristiques techniques du produit considéré (résumé des caractéristiques du produit).

Elle est assortie, le cas échéant, de mesures restrictives notamment l'inscription à l'un des tableaux des substances vénéneuses et/ou la limitation d'utilisation dans les seuls établissements hospitaliers.

Art. 7. — La décision d'enregistrement ne peut être accordée que lorsque le fabricant ou l'importateur justifie :

— qu'il a fait procéder à la vérification de la sécurité du produit dans les conditions normales d'emploi, de son intérêt thérapeutique, ainsi qu'à son analyse qualitative et quantitative,

— qu'il dispose effectivement de locaux, installations et procédés de fabrication et contrôle de nature à assurer la qualité du produit au stade de la fabrication industrielle, conformément aux règles de bonnes pratiques de fabrication, conditionnement, stockage et contrôle telles que définies par le décret n° 92-285 du 6 juillet 1992 susvisé relatif à l'autorisation d'exploitation des établissements pharmaceutiques.

Art. 8. — La décision d'enregistrement est délivrée pour une période de cinq ans, renouvelable par période quinquennale.

Elle peut être modifiée, suspendue ou retirée par le ministre chargé de la santé dans les conditions prévues aux articles 24 et suivants ci-dessous.

La délivrance de cette décision n'a pas pour effet d'exonérer son titulaire de la responsabilité qu'il encourt, dans les conditions du droit commun en raison de la fabrication ou de la mise sur le marché d'un produit pharmaceutique.

Art. 9. — Toute demande d'enregistrement doit être adressée au ministre chargé de la santé sur un formulaire établi à cet effet, accompagné d'un dossier de synthèse rapportant les principales données physico-chimiques, pharmacologiques, le cas échéant, microbiologiques, toxicologiques et cliniques du produit, d'une note d'intérêt économique et thérapeutique faisant notamment ressortir l'amélioration du service médical rendu ainsi que de dix échantillons du modèle de vente.

Il est remis un récépissé au demandeur.

La confection du formulaire et la composition du dossier de synthèse sont définies par arrêté du ministre chargé de la santé.

**TITRE III**  
**INSTRUCTION DE LA DEMANDE**

Art. 10. — Dès sa réception, le dossier de demande est examiné en vue d'établir sa recevabilité.

Les produits, dont les demandes sont prises en considération, sont soumis à l'expertise sur la base d'un dossier scientifique et technique, tel que prévu à l'article 11 ci-dessous et fourni par le demandeur.

Art. 11. — Le dossier scientifique et technique comprend :

— les données relatives à la fabrication et au conditionnement ainsi qu'au contrôle physico-chimique, et le cas échéant biologique,

— les données microbiologiques, le cas échéant,

— les données pharmacologiques et toxicologiques,

— les données cliniques.

Un arrêté du ministre chargé de la santé précise les éléments constitutifs du dossier scientifique et technique.

Art. 12. — L'expertise, prévue à l'article 10 ci-dessus, s'entend des études et essais à effectuer en vue de vérifier que ce médicament possède bien la composition et les caractéristiques indiquées dans le dossier technique et scientifique présenté pour enregistrement.

L'expertise d'un produit pharmaceutique comprend quatre phases :

— étude et évaluation du dossier scientifique et technique,

— essais physico-chimiques et, le cas échéant, microbiologiques et biologiques,

— essais pharmacologiques et toxicologiques,

— essais cliniques.

Art. 13. — Les produits pharmaceutiques génériques sont dispensés des essais pharmacologiques, toxicologiques et cliniques prévus ci-dessus.

Pour cette catégorie de produits, les essais physico-chimiques, le cas échéant, microbiologiques ou biologiques ainsi que les tests d'innocuité sont obligatoires dans tous les cas.

Cependant, pour les produits à index thérapeutique étroit, ou posant d'importants problèmes de biodisponibilité ou possédant des caractéristiques pharmacocinétiques particulières, la commission nationale de nomenclature peut demander à ce que soit démontrée la bioéquivalence *in vivo* de la spécialité, objet de la demande d'enregistrement avec celle présente sur le marché.

La commission nationale de nomenclature indiquera pour chaque cas, après examen du dossier de synthèse, les phases d'expertise qui doivent être effectuées lorsque lui sont soumis :

— une forme pharmaceutique ou un dosage différent d'un produit déjà enregistré,

— une association de principes actifs, déjà inscrits, séparément à la nomenclature mais associés pour la première fois dans une même forme pharmaceutique pour des raisons thérapeutiques ou économiques,

— une modification ou extension d'indications thérapeutiques d'un produit déjà enregistré.

Art. 14. — Les expertises ou évaluations prévues à l'article 12 ci-dessus sont confiées à des experts ou organismes agréés par le ministre chargé de la santé.

Art. 15. — La liste des experts et organismes agréés est arrêtée par décision du ministre chargé de la santé.

Art. 16. — Les experts sont agréés après qu'ils aient fait acte de candidature auprès du ministre chargé de la santé.

Art. 17. — Les experts sont agréés pour une durée de trois ans renouvelable sur leur demande.

Art. 18. — Les experts ne doivent avoir aucun intérêt direct ou indirect même par personne interposée, dans la production ou la commercialisation des médicaments faisant l'objet de leurs expertises ou évaluations. Ils signent à cet effet une déclaration sur l'honneur à l'occasion de chacune de leurs expertises ou évaluations.

Art. 19. — Les frais d'expertise sont à la charge du demandeur de l'enregistrement.

Art. 20. — Un arrêté du ministre chargé de la santé fixe la procédure, le but et le déroulement des phases d'expertises prévues à l'article 12 ci-dessus.

#### TITRE IV

#### DECISIONS PRISES

Art. 21. — La commission nationale de nomenclature après contrôle des dossiers soumis, et le cas échéant des protocoles d'expertises ainsi que de leur exécution effective, en évalue les résultats et rapports et formule une proposition qu'elle soumet au ministre chargé de la

santé pour décision d'enregistrement lorsqu'il apparaît que les conditions prévues à l'article 7 ci-dessus sont réunies.

Art. 22. — Le ministre se prononce dans un délai de cent vingt jours (120) à compter de la date de dépôt du dossier scientifique et technique. Dans les cas exceptionnels, ce délai peut être prolongé pour une période de quatre vingt dix jours (90), notification en est faite au demandeur avant l'expiration dudit délai. Ce délai est suspendu lorsqu'une expertise est ordonnée ou qu'il est demandé à l'intéressé de compléter son dossier ou de fournir des explications oralement ou par écrit.

Art. 23. — L'enregistrement est refusé lorsqu'il apparaît :

— que le produit pharmaceutique est nocif dans les conditions normales d'emploi indiquées lors de la demande d'enregistrement,

— que l'effet thérapeutique escompté fait défaut ou est insuffisamment justifié par le demandeur,

— que le produit pharmaceutique n'a pas la composition qualitative et quantitative déclarée,

— que les procédés de production et/ou de contrôle ne permettent pas de garantir la qualité du médicament produit,

— que la documentation et les renseignements fournis à l'appui de la demande ne satisfont pas aux dispositions du présent décret.

La demande d'enregistrement n'est rejetée qu'après que le demandeur ait été mis en mesure de fournir des explications.

Toute décision de refus est notifiée à l'intéressé avec les motifs qui la justifient.

Art. 24. — Le responsable de la mise sur le marché doit soumettre au ministre chargé de la santé, pour autorisation éventuelle, toute modification qu'il se propose d'apporter à un produit enregistré, notamment les modifications de conditionnement, d'étiquetage, les modifications d'excipients, la modification de la durée de stabilité, les extensions ou restrictions d'indications thérapeutiques et les modifications de contre-indications ou de précautions d'emploi.

Art. 25. — Le responsable de la mise sur le marché doit transmettre immédiatement au ministre chargé de la santé tout élément nouveau qui pourrait entraîner une incidence sur la décision ou un complément d'instruction et notamment pour les produits importés, toute interdiction et/ou restriction imposée par les autorités sanitaires du pays d'origine du produit.

## Résumé

L'administration orale est la voie la plus pratique et la plus utile pour l'administration des médicaments. Plusieurs méthodes sont utilisées pour la prédiction de l'absorption de ces médicaments. Cependant, la technique in situ pourrait fournir l'estimation la plus précise.

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'absorption intestinale du naproxène de sodium par une méthode de perfusion intestinale en un seul passage (SPIP) chez quatre rats anesthésiés, avec l'utilisation du rouge de phénol comme marqueur non absorbable. Un segment jéjunal d'environ 15 cm a été isolé et canulé aux deux extrémités pour perfuser la solution, et les concentrations des échantillons recueillis ont été déterminées avec une méthode HPLC avec détection UV à 270 nm. La technique a montré une bonne linéarité ( $r$  supérieur à 0.99) sur le domaine de concentration pour les deux molécules. Une valeur moyenne de coefficient de perméabilité effective de  $1.1 \times 10^{-4}$  ( $\pm 0.95$ ) cm/s a été obtenue pour le naproxène de sodium après correction de la concentration.

Cette étude a fourni des résultats plus proches de celle in vivo et des avantages uniques du contrôle expérimental (concentration des composés, taux de perfusion intestinale...) et elle a permis d'étudier les différents facteurs influençant l'absorption intestinale du composé.

**Mots-clés :** perméabilité intestinale – In situ SPIP– Naproxène – HPLC – BCS.

## Abstract

Oral administration is the most practical and useful route for administering medications. Several methods are used to predict the absorption of these drugs. However, the in situ technique could provide the most accurate estimate.

The objective of this study is to evaluate the intestinal absorption of sodium naproxen by a single-pass intestinal perfusion (SPIP) method in four anesthetized rats, with the use of phenol red as a non-absorbable marker. A jejunal segment of about 15 cm was isolated and cannulated at both ends to infuse the solution, and the concentrations of the samples collected were determined using an HPLC method with UV detection at 270 nm. The technique showed good linearity ( $r$  greater than 0.99) over the concentration range for both molecules. An average effective permeability coefficient of  $1.1 \times 10^{-4}$  ( $\pm 0.95$ ) cm/s was obtained for sodium naproxen after concentration correction.

This study provided results closer to those in vivo and unique advantages of experimental control (concentration of compounds, rate of intestinal infusion ...) and it allowed to study the various factors influencing the intestinal absorption of the compound.

**Keywords:** intestinal permeability – In situ SPIP– Naproxen – HPLC – BCS

## ملخص

الإستعمال الفموي هي الطريقة الأكثر عملية و الأكثر فائدة لإستخدام الدواء. تستخدم عدة طرق للتنبؤ بامتصاص هذه الأدوية. ومع ذلك ، يمكن للتقنية في الموقع توفير تقدير أكثر دقة.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الامتصاص المعوي لنابروكسين الصوديوم بطريقة الضخ المعوي في مسار واحد (SPIP) ذات الممر الواحد لأربعة جرذان مخدرة ، مع استخدام أحمر الفينول كعلامة غير قابلة للامتصاص. يعزل حوالي 15 سم من المعي الصائمي ويقنن في كلا الطرفين لضخ المحلول. وتم تحديد تراكيز العينات التي تم جمعها باستخدام طريقة HPLC مع الكشف بالأشعة فوق البنفسجية في 270 نانومتر. أظهرت هذه التقنية خطية جيدة ( $r > 0.99$ ) على مدى التركيز لكلا المركبين. تم الحصول على معامل نفاذية فعال متوسط قدره  $1.1 \times 10^{-4}$  (0.95 ±) سم / ثانية لنابروكسين الصوديوم بعد تصحيح التركيز.

قدمت هذه الدراسة نتائج أقرب للنتائج في الجسم الحي وذلك بتقديم مزايا فريدة من التحكم التجريبي (تراكيز المركبات ، ومعدل تروية المعوية ...) ، كما أنه سمح بدراسة العوامل المختلفة التي يمكن أن تؤثر على امتصاص الأمعاء للمركب.

**الكلمات المفتاحية:** النفاذية المعوية – في الموقع SPIP – نابروكسين – HPLC - BCS.

<p><b>BOUZID Takoua</b>          Adresse e-mail :  <a href="mailto:takwa.bzd.pharma@hotmail.com">takwa.bzd.pharma@hotmail.com</a></p>	<p><b>CHAABANE Iméne</b>          Adresse e-mail :  <a href="mailto:imenechaabane92@gmail.com">imenechaabane92@gmail.com</a></p>
---	--

## Résumé

L'administration orale est la voie la plus pratique et la plus utile pour l'administration des médicaments. Plusieurs méthodes sont utilisées pour la prédiction de l'absorption de ces médicaments. Cependant, la technique in situ pourrait fournir l'estimation la plus précise.

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'absorption intestinale du naproxène de sodium par une méthode de perfusion intestinale en un seul passage (SPIP) chez quatre rats anesthésiés, avec l'utilisation du rouge de phénol comme marqueur non absorbable. Un segment jéjunal d'environ 15 cm a été isolé et canulé aux deux extrémités pour perfuser la solution, et les concentrations des échantillons recueillis ont été déterminées avec une méthode HPLC avec détection UV à 270 nm. La technique a montré une bonne linéarité ( $r$  supérieur à 0.99) sur le domaine de concentration pour les deux molécules. Une valeur moyenne de coefficient de perméabilité effective de  $1.1 \times 10^{-4}$  ( $\pm 0.95$ ) cm/s a été obtenue pour le naproxène de sodium après correction de la concentration.

Cette étude a fourni des résultats plus proches de celle in vivo et des avantages uniques du contrôle expérimental (concentration des composés, taux de perfusion intestinale...) et elle a permis d'étudier les différents facteurs influençant l'absorption intestinale du composé.

**Mots-clés :** perméabilité intestinale – In situ SPIP– Naproxène – BCS – HPLC

## Abstract

Oral administration is the most practical and useful route for administering medications. Several methods are used to predict the absorption of these drugs. However, the in situ technique could provide the most accurate estimate.

The objective of this study is to evaluate the intestinal absorption of sodium naproxen by a single-pass intestinal perfusion (SPIP) method in four anesthetized rats, with the use of phenol red as a non-absorbable marker. A jejunal segment of about 15 cm was isolated and cannulated at both ends to infuse the solution, and the concentrations of the samples collected were determined using an HPLC method with UV detection at 270 nm. The technique showed good linearity ( $r$  greater than 0.99) over the concentration range for both molecules. An average effective permeability coefficient of  $1.1 \times 10^{-4}$  ( $\pm 0.95$ ) cm/s was obtained for sodium naproxen after concentration correction.

This study provided results closer to those in vivo and unique advantages of experimental control (concentration of compounds, rate of intestinal infusion ...) and it allowed to study the various factors influencing the intestinal absorption of the compound.

**Keywords:** intestinal permeability – In situ SPIP– Naproxen – HPLC – BCS