

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.

*Etude de la perméabilité intestinale des
médicaments*

Thèse d'exercice de fin d'études

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

Session : juin2019.

Présentée par :

ABED Imène KHALFI Nour el houda LABRI Siham

Encadrée par :

Dr S. DJELLOULI Maîtres assistant en Pharmacologie.

Devant le jury :

Présidente : Dr O. BENAZIZ Maîtres assistante en Pharmacie Galénique.

Examinatrice : Dr.S. BENHAMIDA Maîtres assistante en Pharmacologie.

Examinatrice : Dr.F. BELAIDI Maîtres assistante en Chimie Analytique.

Remerciements

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et, la volonté d'entamer et de terminer ce travail.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Dr S.Djellouli, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nos remerciement s'adresse à Mr I. Nabi pour son aide pratique et son soutien moral et ses encouragements.

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait DR.Benaziz en étant présidente du jury, Dr. Benhamida et Dr.Blaidi d'avoir acceptées d'examiner ce travail.

Nos remerciement s'adresse également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenue de près ou de loin.



Dedicaces

Je dédie ce travail

A ma mère

A mon père

A mon frère Abeallah et mes sœurs : horia , safia, fadila, zahra et aya

A yakoub et djawad

A mon grand père Abdelazzize

A mes grandes mères Dounya et Barika

A ma chère copine fatima

A ma tante Anissa

A tout e ma famille

A mes trinomes imene et Nour el houda .

*A mes chères amies en particulier : hannane, louiza ,dahbia, nadia , amel
et dallila,*

Siham



Dédicace

A ma chère mère,

A mon cher père,

Zui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard de me soutenir

Et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mon cher mari : MOHAMED,

Zui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.

A mes sœurs : HOUDA, AALEM et HAYETE

A mon frère : FATEH

Pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

A ma chère grande mère,

Zui je souhaite une bonne santé.

A mes chères trinômes : NOUR ELHOUDA ET STHEM.

Pour ses ententes et ses sympathies

A toute ma famille,

A tous mes ami(e)s,

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment

Imène

Dédicace

Je tiens tout d'abord à remercier **Dieu** le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force, la patience, la volonté et le courage durant ces longues années d'étude.

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce travail à ceux qui, quelque soient les termes embrassés, je m'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi **papa**.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, **maman** que j'adore.

A mes adorables sœur **Selma, Khaoula et Sihem** et mon seul frère **Abdenmour**, qui n'ont pas cessé de me encourager et soutenir, que le dieu les protège et leur donne une joyeuse vie.

Mes remerciements s'adressent à **Mon Fiancé Tarek** pour sa présence, son aide et son encouragement.

A ma grande mère maternelle, qui m'accompagne par ses prières, sa douceur, puisse dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur.

A ma deuxième mère ma tante **Hayat**, à toute ma famille et ma belle famille, Mes voisins et mes amis que j'ai connu jusqu'à maintenant, merci pour leur amours et leur encouragements.

Sans oublier mes trinôme **Sihem et Imène**, pour leur soutien moral, et leur compréhension tout au long de ce travail.

A l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

JE VOUS DISMERCI

Nour el houda.

Table de matière

Liste des figures.....	i
Liste des tableaux.....	ii
Abréviations.....	iii
Glossaire	vi
Introduction générale	1

Etude bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les médicaments

I.1.petite histoire du médicament	4
I.2.Définition du médicament	4
I.3.Composition de médicament.....	5
I.4.Dénomination des médicaments	5
I.5.Classification des médicaments.....	5
I.5.1.Classification selon l'origine.....	5
I.5.2.Classification chimique.....	6
I.5.3.Classification pharmacologique.....	6
I.5.4.Classification thérapeutique.....	6
I.6.Devenir du médicament dans l'organisme.....	7
I.6.1.Absorption.....	7
I.6.1.1.Voie d'administration.....	7
I.6.1.2. Biodisponibilité.....	8
I.6.2.Distribution.....	8
I.6.3.Métabolisme.....	9
I.6.4.Excrétion.....	10
I.7.Développement du médicament.....	10
I.7.1.Recherche de la première substance active.....	11
I.7.2.Optimisation de la molécule chef de file.....	12
I.7.3.Etudes précliniques.....	12
I.7.3.1.Tests toxicologie.....	12
I.7.3.2.Etude pharmacocinétique et métabolisme du médicament.....	13
I.7.4.Recherche clinique.....	13
I.7.4.1.Différentes phases de l'expérimentation clinique.....	14
I.7.4.2.Procédure d'enregistrement en Algérie.....	15

Chapitre II : Perméabilité intestinal des médicaments

II.1.Barrière intestinale.....	17
II.1.1.Barrière physique.....	17

II.1.1.1. Anatomie fonctionnel de l'intestin.....	18
--	----

II.1.1.2. Paroi de l'intestin grêle.....	19
II.1.1.3. Epithélium intestinal.....	19
II. Barrière biochimique.....	21
II.2.1. Enzymes intestinales.....	21
II.2.2. Transporteurs.....	22
II.3. Barrière microbiologique.....	24
II.4. Transport à travers la membrane cellulaire.....	25
II.5. Facteurs influençant la perméabilité intestinale.....	27
Chapitre III : Modèles expérimentales d'étude de la perméabilité intestinale des médicaments.	
III.1. Modèles physico-chimiques.....	30
III.1.1. Coefficient de partage n-octanol/eau.....	30
III.1.2. Potentiel d'absorption.....	31
III.1.3. Chromatographie par membrane artificielle immobilisée (IAM).....	31
III.1.4. Test PAMPA.....	32
III.2. Modèles Ex-vivo.....	34
III.2.1. Chambre de diffusion (Chambre d'Ussing).....	35
III.2.2. Anneaux et sacs intestinaux reversés.....	37
III.3. Modèles in vitro à base des cellules.....	37
III.3.1. Cellules Caco2	38
III.3.2. Lignée MDCK (Madin Darby Canine Kidney.....)	39
III.3.3. Cellules de Lewis Lung Carcinoma-Porcine Kidney (LLC-PK1).....	39
III.3.4. Cellules 2/4/A1.....	39
III.3.5. Lignée HT29.....	40
III.4. Modèles in situ.....	40

III.4.1.	Perfusion intestinale.....	40
III.4.2.	Méthode de boucle intestinale.....	41
III.4.3.	Cannulation vasculaire intestinale.....	42
III.5.	Modèle in vivo : perfusion intestinal.....	42
III.6.	Modélisation in silico.....	43
III.6.1.	Historique.....	43
III.6.2.	Principe.....	44
III.6.3.	Différents logiciels	46
III.7.	Système de classification biopharmaceutique.....	48
Étude expérimentale		
I.	Objectif.....	51
II.	Matériels et méthodes.....	51
II.1.	terrain de stage.....	51
II.2.	Choix de la méthode.....	51
II.3.	choix de molécules.....	52
II.4.	Matériels.....	52
II.4.1.	consommables.....	52
II.4.2.	matière première.....	52
II.4.3.	réactifs chimiques.....	53
II.4.4.	appareillage.....	53
II.5.	Méthode expérimentale.....	55
II.5.1.	Coefficient de partage octanol-eau.....	55
II.5.1.1.	Principe.....	55
II.5.1.2.	Protocole	55
II.5.1.3.	préparation des solutions aqueuses contenant les substances étudiées ..	56
II.5.2.	Diffusion à travers une membrane artificielle.....	57

II.5.2.1 Principe.....	57
II.5.2.2.préparation de dispositif.....	57
II.5.2.2.préparation des solutions tampons.....	58
II.5.2.4.Préparation des solutions mères et des standards.....	59
II.5.2.5.Protocol expérimental.....	60
III. Résultat et interprétation	60
III.1.Dosage spectrophotométrique des substances étudiées.....	60
III.1.1.Méthode coefficient de partage.....	60
III.1.1.1.Détermination des absorbances.....	60
III.1.1.2.Détermination des concentrations des substances.....	61
III.1.1.3.Détermination de coefficient de partage (P).....	62
III.2.Méthode de diffusion à travers une membrane artificielle.....	64
III.2.1.Détermination des absorbances.....	64
III.2.2.Détermination des concentration	64
III.2.3.Détermination de la perméabilité.....	65
IV. Discussion	66
Conclusion.....	70

Liste des figures

Figure 1 :Les différentes phases de développement de médicament.

Figure 2 :L'intestin humaine absorbe les nutriments et forme une barrière.

Figure 3 :.Diagramme du tractus gastro-intestinal humain.

Figure 4:Représentation schématique de la paroi intestinale.

Figure 5:Vue détaillée sur la structure des villosités présente dans la muqueuse intestinale Humaine.

Figure 6 : Composition de la barrière intestinal.

Figure 7 : Routes d'absorption à travers l'épithélium intestinal.

Figure 8 : Schéma de principe du test PAMPA.

Figure 9:.Dispositif expérimentale original ainsi qu'il fait conçu par H Ussing en 1951.

Figure 10 :Equipement de la chambre d'Ussing.

Figure 11 : Représentation schématique du modèle expérimental de chambre d' Ussing.

Figure 12:représentation schématique du protocole expérimental utilisant des cellules caco2 en culture.

Figure 13 :Représentation schématique du perfusion intestinal.A : Perfusion circulaire. B :perfusion en un seule passage.

Figure 14 :Segment perfusé chez l'animal crée avec le tube multicanaux et les deux ballons gonflables.

Figure 15:Système de Bioclassification Pharmaceutique.

Figure 16 :les différents matériels utilisés.

Figure 17 : Mélange des deux phases octanol /eau.

Figure 18 : dispositif de la membrane artificiel

Figure 19 : Après agitation des deux phases. phases.

Figure 20 :après l'équilibre et la séparation des deux.

Figure 21 : préparation d'un tampon pH 6.5 .

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les différents modèles expérimentales.

Tableau 02 : Résumé des caractéristiques de différentes substances.

Tableau 03 : La dose maximale et la masse nécessaire pour chaque substance.

Tableau 04 : Les prises d'essais et les concentrations de chaque substances pour la méthode de coefficient de partage octanol/eau.

Tableau 05 : Les prises d'essais pour la méthode de diffusion à travers une membrane artificielle.

Tableau 06 : Les absorbances des solutions mères (M1).

Tableau 07 : Les absorbances des substances dans les solutions aqueuses.

Tableau 08 : Les concentrations des substances dans les deux phases.

Tableau 09 : Les valeurs de Log P.

Tableau 10 : LogP expérimental et LogP de littérature et les différents facteurs d'absorption.

Tableau 11 : Les absorbances de chaque substance et son longueur d'onde.

Tableau 12 : Les absorbances des substances dans les deux compartiments après 24h

Tableau 13 : Les concentrations des substances dans les deux milieux.

Tableau 14 : Les valeurs de la perméabilité apparente pour chaque substance et leurs facteurs d'absorption.

Tableau 15 : P_{app} et P_{eff} de chaque substance.

Tableau 16 : LogP expérimental et LogP de littérature.

Tableau 17 : La perméabilité apparente et la perméabilité effective .

ABRÉVIATION

A

ABC :ATPBinding Cassette.

ADME : Absorption,Distribution ,Métabolisme et Elimination.

ADMET :Absorption,Distribution,Métabolisme ,Elimination et Toxicité.

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché.

ANPP : Agence National des Produits Pharmaceutiques.

ATP: Adénosine triphosphate .

B

BCRP :Breast Cancer ResistanceProtein ,*Proteine de résistance au cancer du sein*.

BCS:Biopharmaceutical Classification System.

BHE:Barrière Hémato Eencéphalique.

BPL: Bonnes Pratiques de Laboratoire.

C

Caco -2 :*Caucasian Colon Adenocarcinoma* ,Cellules cancéreuse de colon humain.

CYP 450: Cytochrome P450.

D

DE : Décision d'enregistrement.

DCI: Denomination Commune Internationale.

DL50: ,dose pour laquelle 50 % des individus meurent.

DO :Densité Optique.

DOPC :Duoléoylphosphatidylcholine.

E

EEN:Excipient à effet notoire.

F

FDA :Food and Drug Administraion.

H

HMG-CoA :inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme.

HPLC :Chromatographie en phase liquide à haute performance.

I

IAM :*Membrane Artificiel Imobilisé.*

IM: Intramusculaire.

IMAO: Inhibiteurs de monoamino-oxygénase A.

IV: Intraveineuse.

L

LC- MS :Chromatographie de liquides/ Spectromètre de masse

LC –MS/ MS :

LLC-PK :Cellule de Lewis Lung Carcinoma-Porcine Kidney

LogP :*Coefficient de partageoctaol/eau.*

M

MCT :MonocarboxylateTansporter.

MDR1 :Multi Drug Résistance 1.

MRP2 : Multidrug Resistance associated Protein 2.

MDCK :Madin Darby Canine Kidney.

O

OATP2B1 :Organic Anion Transporter Polypeptide 2B1.

OCT : Organic Cation Transporter.

OMS: Organization Mondiale de Santé.

P

PAMPA :parallelartificial membrane permeabilityassay.

Papp : Perméabilité apparenté.

PAT :ProtonAminoacid Transporter.

PC : phosphatédile choline

Peff :*Perméabilité effective.*

Pgp :Glycoprotéine P.

PSA :Polar Surface Area.

PVDF :Filtre de Polyfluorure De Vinylidène

K

Km :*Coefficient de partage membranaire.*

S

SC: sous cutanée.

SLC :Solute Carrier.

Saq : Solution aqueuse.

Oct : Octanol.

T

T_{1/2}: Le temps de demi vie.

TER : Résistance Transépithéliale.

Tr : *Temps de rétention.*

U

UV : Ultraviolet

V

Vd : Volume de distribution .

Introduction générale

Pour de multiples raisons, la voie orale est la voie de choix pour l'administration des molécules actives aux patients. 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. Cette situation amène fréquemment à devoir recourir à une voie d'administration alternative, souvent moins confortable et plus contraignante pour le patient.

Après l'administration d'une forme galénique par la voie orale, le passage des molécules actives depuis la lumière intestinale jusqu'à leur apparition dans la circulation sanguine générale est le résultat de multiples phénomènes. Au moment de son administration, la molécule active est associée à une forme galénique dont elle doit être "libérée". Dans le cas général des formes solides, cette libération consiste en la dissolution des particules solides qui les constituent dans les fluides digestifs. Elle est nécessaire pour que les mécanismes de passage (passifs et/ou actifs) vers la circulation systémique puissent se mettre en place. Ainsi, l'intensité et la vitesse avec lesquelles s'opère le passage de la muqueuse intestinale sont deux paramètres clés puisqu'ils déterminent la biodisponibilité de la molécule considérée. Au plan mécanistique, la biodisponibilité dépend donc simultanément des caractéristiques physico-chimiques de la molécule, des propriétés galéniques de la formulation qui la contient et enfin de la perméabilité effective de la membrane intestinale à la molécule considérée.

La détermination expérimentale de la perméabilité intestinale des principes actifs (PA) chez l'animal et/ou chez l'homme et des mécanismes mis en jeu représente donc un objectif majeur dès les premières phases du développement pharmaceutique, puisque ce paramètre orientera profondément le choix de la formulation galénique. La perméabilité intestinale peut être estimée par différentes méthodologies.

Ce travail, outre l'introduction et la conclusion générale, comprend deux parties : une partie bibliographique dans laquelle nous aborderons les bases fondamentales de pharmacologie en 3 chapitres, généralité sur les médicaments, l'absorption intestinale, les modèles expérimentaux d'étude de la perméabilité intestinal et une partie pratique dans laquelle nous étudierons la perméabilité intestinal l'hydrochlorthiazide, kétoprofène

,furosemide,ranitidine et metformine en utilisant deux méthodes : le coefficient de partage n-octanol/eau et la diffusion à travers une membrane artificielle.

Etude bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les médicaments

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. C'est Paracelse au XVI^e siècle qui prônera la nécessité d'un médicament spécifique pour chaque maladie. Il 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.

Avec la découverte du nouveau monde, les explorateurs rapporteront des grandes principes actifs comme le quinquina, l'ipéca, le coca, le café ...etc. Grâce aux progrès de la chimie et de la physiologie, le XIX^e 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^e siècle la novocaïne en 1901, les antisiphilitiques 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. 1943 est l'année de la découverte par Fleming de la pénicilline et 1947 de la streptomycine. (1)

A partir de 1970, il apparaît l'approche génétique des pathologies humaines (obésité, diabète II...) et avec elle la découverte de nouveaux médicaments (Protéines recombinantes, anticorps) et les médicaments de biotechnologie)

Actuellement des perspectives thérapeutiques sont en cours de développement : la thérapie génique par remplacement d'un gène défaillant, la thérapie cellulaire par remplacement de cellules non fonctionnelles, l'ingénierie moléculaire par synthèse de molécules de nature protéique, des organes bio artificiels et des Nano biotechnologies par des outils d'ordre éthique réglementaire et économique (2)

I.2. Définition du médicament

D'après l'article 208 du chapitre 2 du titre V (produit pharmaceutiques et dispositifs médicaux) de la nouvelle loi de santé 2018 :

Le médicament est toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, et tout produits pouvant être administrés à l'homme ou à l'animale en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, de corriger et de modifier ses fonctions physiologiques. (3)

I.3. Différentes compositions du médicament

Dans la formulation médicamenteuse, on distingue deux sorts de composées :

-Principe actif : substance d'origine naturelle ou synthétique, caractérisée par un mécanisme d'action spécifique ou non et un effet curatif ou préventif précis dans l'organisme.

-Excipients : substance d'origine naturelle ou synthétique qui facilitent l'administration, la diffusion, et la conservation du principe actif mais théoriquement dépourvues d'activité pharmacologique. Néanmoins certains excipients peuvent entraîner des allergies ou des intolérances individuelles ; il s'agit des excipient à effet notoire (EENs) ces excipients nécessitent des précautions d'emploi pour certaines catégories de patients.(4 ; 5)

I.4. Différentes Dénominations du médicament

Le médicament est à la fois nommé par un nom chimique qui est rarement utilisé, Un nom « fantaisie » ou nom commercial qui est le nom choisi par le laboratoire qui le commercialise et par une dénomination commune internationale (DCI) qui est décernée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et qui permet d'identifier précisément un principe actif quel que soit le laboratoire qui le commercialise (6)

I.5. Classification des médicaments

Il existe un nombre incalculable de médicaments et pour s'y retrouver, une classification des médicaments existe.

I.5.1.Classification selon l'origine

Les médicaments peuvent être classés selon leurs origine .On peut distinguer :

- les médicaments d'origine minérale par exemple : les argiles.

-Les médicaments d'origine végétale : cette classe a été longtemps très importante, tant que les médicaments d'origine végétale ont dominé la pharmacopée .C'est ainsi que l'on peut considérer les médicaments de l'ergot de seigle, ceux des solanacées...etc.

-Les médicaments d'origine chimique : C'est la plupart des médicaments utilisés actuellement. On en vient alors à la nécessité d'une sous classification. En fait, les médicaments d'origine chimique sont soit issues de la semi synthèse, de la fermentation ...etc.

-Les médicaments d'origine animale : Ils sont peu nombreux. Mais, un certain nombre de produits sont issus directement ou après extraction et transformation du corps humain : l'exemple majeur est celui des médicaments dérivés du sang.

-Les médicaments issus des biotechnologies : Ils prennent une importance croissante. Ils sont caractérisés par leurs procédés d'obtention (génie génétique, fermentation, etc.). Cette approche est importante aux points de vue industriel, réglementaire et sécuritaire. .

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. Son inconvénient est d'être peu pertinent en pratique clinique. Dans la même série chimique, les dérivés présentent à des degrés divers de multiples effets pharmacologiques et des applications thérapeutiques parfois très différentes. Les sulfamides en sont un exemple typique : ils peuvent être anti-infectieux, diurétique, antidiabétique... etc.

I.5.3 Classification pharmacologique

C'est une classification par effet pharmacologique donc par cibles et par mécanismes d'action. Par exemple, les IMAO (inhibiteurs de monoamino-oxygénase A), les parasympholytiques, les inhibiteurs des phosphodiesterases, 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. Ses limites sont en fait celle de la physiopathologie. Ce n'est que dans la mesure où celle-ci est connue et les cibles potentielles des médicaments identifiées que le classement par effet pharmacologique est rationnel. (6)

I.5.4 Classification thérapeutique

La classification thérapeutique 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 évidemment la classification la plus satisfaisante pour le praticien car elle est directement opérationnelle. C'est celle privilégiée par les traités de médecine et de thérapeutique

En fait, aucune classification ne permet de couvrir de manière satisfaisante pour le personnel de santé l'ensemble des médicaments .On a donc recours à un système hétérogène de classification : Classification pharmaco thérapeutique.(6)

I.6. Devenir du médicament dans l'organisme

Entre l'administration d'un médicament et son action sur le récepteur de l'organe cible permettant d'obtenir la réponse pharmacologique recherchée, survient un certain nombre d'événements regroupés sous le terme de pharmacocinétique. Classiquement, la pharmacocinétique est divisée en quatre étapes : l'absorption, la distribution, la biotransformation (ou métabolisme) et l'élimination. (7). Il est essentiel de comprendre que l'action réelle d'un médicament dans l'organisme ne pourra résulter que de la combinaison de ses propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. (8)

I.6.1. Absorption

L'absorption est le processus par lequel une substance déposée à la surface ou à l'intérieur d'un tissu parvient aux vaisseaux. L'absorption est **directe ou immédiate** lorsque le médicament est introduit dans un milieu qui l'accepte passivement (tissu sous-cutané, muscles) est **indirecte ou médiate** lorsque ce passage nécessite le franchissement d'une barrière sélective donc il y a une résorption (peau, muqueuse, séreuse). La vitesse et la durée de l'absorption dépendent de:

- **l'état physique du médicament et de la libération du principe actif** : cette mise à disposition constitue la « phase galénique ». L'ordre décroissant de vitesse de passage est : solutions aqueuses, solutions huileuses, les suspensions puis les formes solides.
- **la concentration** : plus elle est forte et plus le passage est rapide.
- **la circulation** : plus le tissu est vascularisé et plus le passage est rapide (muscle), les tissus peu vascularisés retiennent les médicaments (graisse). La vasodilatation et la vasoconstriction accélèrent ou ralentissent l'absorption.
- **la surface** : plus la surface d'absorption est grande, plus le passage est rapide et important.

(6)

I.6.1.1. Voie d'administration

Les médicaments peuvent être administrés par voie orale ou par voie parentérale.

-**La voie orale** : en raison de ses aspects pratiques, la voie orale constitue la voie la plus fréquemment utilisée pour l'administration de la plupart des médicaments. Cependant, certains médicaments sont sensibles aux enzymes ou à l'acidité de l'estomac et doivent être administrés par voie parentérale.

-**La voie parentérale** : elle peut être effectuée :

-Par injection intraveineuse (IV) : le médicament passe directement dans la circulation sanguine sans devoir traverser les barrières d'absorption.

-Ou par Les injections intramusculaires (IM) et sous cutanées(SC) : la résorption se fait à travers le tissu musculaire ou conjonctif et l'endothélium vasculaire.

Il existe d'autres voies d'administration comme l'inhalation (l'anesthésiques volatiles, certains médicaments utilisés dans l'asthme), l'administration locales, les administrations sublinguales et rectales pour éviter la circulation portale, les préparations administrables par voie sublinguale sont particulièrement indiquées chez les sujets présentant un métabolisme de premier passage important. (9)

I.6.1.2. Biodisponibilité

Après l'administration d'une certaine quantité de médicament. Sauf en cas de pénétration directe, on n'est pas assuré qu'elle atteindra intégralement le torrent circulatoire. En effet, une partie peut être « perdue en route », éliminée sans être absorbée autre partie peut être transformée en produit inactif au niveau d'une barrière ou du foie.

On appelle biodisponibilité le rapport entre la quantité de médicament qui atteint le plasma et la quantité administrée ainsi que la vitesse avec laquelle le médicament atteint le plasma. Elle est exprimée en pourcentage. Elle est donc égale ou inférieure à 100 %.

La biodisponibilité est relative à une présentation, c'est-à-dire à un principe actif, sous une forme pharmaceutique, d'un fabricant donné ; elle dépend de :

- la substance elle-même
- l'anatomie, c'est-à-dire de la voie d'administration (voies orale ou rectale...)
- la forme galénique et du processus de fabrication (très important en pratique)
- facteurs physiologiques (âge, alimentation...)
- facteurs pathologiques (insuffisances hépatiques...).

La biodisponibilité se détermine en comparant la quantité de médicament atteignant le plasma par deux voies différentes, l'une la voie concernée, l'autre à absorption complète (voie intraveineuse). (6)

I.6.2. la distribution

La distribution est fonction de la capacité du médicament à franchir les barrières qui séparent les différents compartiments de l'organisme et à s'y accumuler ou à en être exclu. Ceci implique le passage de barrières membranaires qui peuvent être franchies par diffusion passive ou par l'action de transporteurs.

Le facteur principal qui gouverne la diffusion passive est, par ordre d'importance, la solubilité dans les lipides et la taille moléculaire. Etant donné que de nombreux médicaments sont des acides ou des bases faibles, leur ionisation et donc le pH environnant, jouera un rôle essentiel car la forme non-ionisée diffusera nettement plus vite que la forme ionisée.

Un aspect particulier de la distribution des médicaments est leur capacité à se lier aux protéines plasmatiques (principalement l'albumine, mais des liaisons à des protéines spécifiques sont décrites). Cette liaison va diminuer leur capacité à se distribuer dans d'autres compartiments que le plasma et ralentir leur élimination.

Le volume de distribution V_d s'exprime par la relation entre la quantité totale de médicament présente dans l'organisme et la concentration observée au niveau plasmatique.

(8)

I.6.3.Métabolisme

L'analyse du métabolisme d'un principe actif est avant tout une approche descriptive des diverses voies métaboliques et de leur importance relative, ainsi que des conséquences sur l'élimination du médicament. Le terme de métabolisme fait référence à la transformation, par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs autres composés actifs ou inactifs au plan pharmacologique. De nombreux tissus peuvent réaliser cette transformation (peau, poumon, rein, intestin...). Néanmoins le principal site de biotransformation est situé au niveau hépatique, dans les enzymes des microsomes. Ceci est expliqué par le flux sanguin très important du foie, organe épurateur, par rapport aux autres organes. Schématiquement on distingue 2 phases de métabolisme selon les processus de transformation : les réactions de **phase I** et celles de **phase II**.

I.6.3.1.Réactions de phase I

- **Les réactions d'oxydation** sont majoritairement localisées dans les microsomes hépatiques. Elles consomment du NADPH (nicotinamide phosphate réduit), de l'oxygène moléculaire et passent par les **cytochromes P450**.

- **Les réactions de réduction** sont beaucoup moins fréquentes et moins bien explorées. La réduction n'intervient pas exclusivement au niveau hépatique mais également dans l'intestin via la flore bactérienne.

- **L'hydrolyse** enfin est une voie métabolique banale, qui intervient dans le foie, dans différents tissus et même dans le plasma. Les enzymes de type des estérases sont le plus souvent non spécifiques. La réaction d'hydrolyse par clivage d'un ester ou d'un amide, est chez l'homme, très rapide.

I.6.3.2.Réactions de phase II

Les groupements fonctionnels issus des réactions de phase I peuvent être ensuite conjugués. C'est **la réaction de phase II**.

Les mécanismes de **conjugaison** chez l'homme font généralement appel à l'acide gluconique, au glycolle, au sulfate.

La conjugaison avec l'acide glucuronique est la plus fréquente des conjugaisons. Elle est catalysée par le système enzymatique de la glucuronyltransférase et concerne les molécules possédant un groupement hydroxylé, carboxylé ou aminé. Les glucuronides sont très hydrosolubles ce qui explique la facilité avec laquelle ils sont éliminés dans l'urine et la bile. Dans quelques cas, les esters sont instables et après hydrolyse dans l'urine ou le plasma redonnent la molécule mère. (10)

I.6.4.Excrétion

L'élimination ou excrétion des médicaments et de leurs métabolismes est assurée par diverses voies dont la plus importante est la voie urinaire, les autres voies étant la voie biliaire et la voie pulmonaire.

I.6.4.1.Excrétion rénale

L'excrétion des médicaments par le rein est la résultante de phénomènes complexes au niveau du néphron qui est l'unité fonctionnelle du rein. la filtration glomérulaire, la sécrétion et la réabsorption tubulaire.

-Filtration glomérulaire : le glomérule se comporte comme un filtre laissant passer tous les composés d'un poids moléculaire inférieur à 60000, ce qui est le cas de tous les médicaments l'exception des médicaments liés aux protéines plasmatiques (forme liée).

-Sécrétion tubulaire active : Il s'agit d'un processus situé au niveau du tube contourné proximal, consommant de l'énergie et permettant le passage de médicaments sous forme ionisée (acides et bases organiques faibles) de la corticale vers le tube contourné.

-Réabsorption tubulaire : les médicaments présents dans le tubule peuvent être réabsorbés dans la circulation générale, par diffusion passive pour la fraction non ionique ou liposolubles au niveau du tube distal, ou par transport actif au niveau du tube proximal.

I.6.4.2.Elimination biliaire

Après passage hépatique, la fraction du médicament non métabolisé peut retourner dans la circulation générale ou être excrété par la bile. Il peut exister dans ce dernier cas un **cycle entéro-hépatique** ou le médicament excrété dans la bile arrive dans l'intestin et peut à nouveau être absorbé, repasser dans le sang et revenir au foie. (9)

I.7.Développement du médicament

De la découverte de la molécule à l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) par les autorités publiques et sa mise en vente dans les pharmacies, un médicament passe par un processus complexe. Effectué dans un cadre réglementé, ce dernier comprend diverses phases et s'étale sur dix ans environ.

Les étapes de recherche et de développement s'étendent de l'isolement de la molécule jusqu'à la sortie du médicament, sur deux volets essentiels préclinique et clinique indispensables.

La première étape de développement d'un médicament recouvre une grande variété d'activité scientifique visant à identifier de nouvelles cibles biologiques et à confirmer leur rôle dans le déclenchement ou l'évolution d'une maladie. Classiquement, les nouvelles cibles thérapeutiques sont des récepteurs ou des enzymes sur lesquels se fixent les médicaments afin de modifier les fonctions cellulaires.

Une fois la cible validée, il faut ensuite décrypter son fonctionnement biologique.

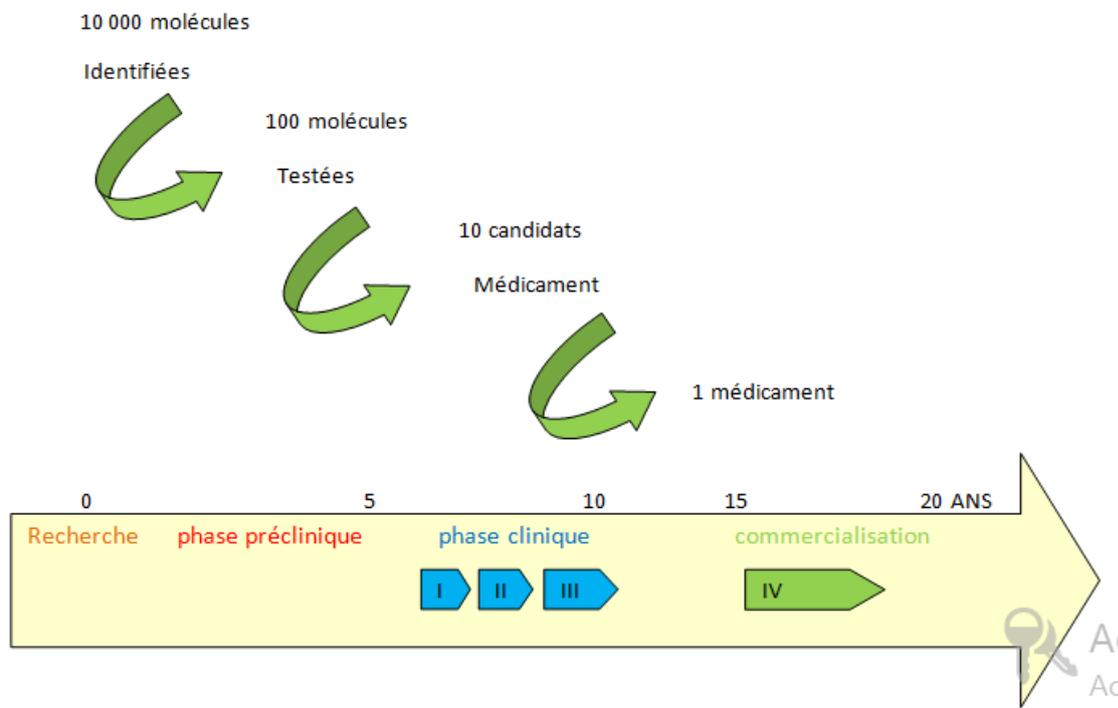


Figure 1 : Les différentes phases de développement de médicament. (original)

I.7.1. Recherche de la première substance active

L'identification d'une tête de série ou chef de file implique la mise au point de méthodes fiables pour tester de petits composés moléculaires par criblage dont le criblage à haut débit.

La recherche de cette première substance active peut également faire appel à toutes les informations biologiques recueillies chez l'homme ou chez les animaux mais peut aussi utiliser les connaissances concernant le déclenchement de la maladie. Il s'agit alors d'une approche rationnelle pour découvrir un chef de file. Enfin la molécule sélectionnée peut provenir d'une modification structurale d'un principe actif préexistant.

Dans les biotechnologies, cette étape consiste à développer des anticorps présentant des affinités avec une cible donnée.

I.7.2. Optimisation de la molécule chef de file

Les têtes de séries ou lead compounds sont optimisées en fonction de leur affinité avec la cible biologique, mais également en termes de spécificité d'accessibilité, de propriétés physico-chimiques, de durée d'action, d'absorption par voie orale, d'absence de toxicité.

Si une molécule est suffisamment active pour être développée, elle est alors présélectionnée et devient candidat médicament. Ensuite il faut étudier ses effets sur l'animal et sur l'homme. C'est le stade de développement qui se divise en deux étapes, le développement préclinique et l'évaluation clinique. (11)

I.7.3. Etudes précliniques

C'est une phase de tests des différentes molécules précédemment sélectionnées obligatoirement avant les essais sur l'homme. Cette phase comporte diverses composantes :

I.7.3.1. Tests de toxicologie

Ils ont pour but d'une part de définir la limite de l'innocuité du produit, d'autre part les organes ou fonctions atteints lorsque la dose utilisée est toxique. Autrement dit, ces tests évaluent les risques d'effets secondaires des médicaments en développement.

Pour ce faire, la réglementation impose des études chez l'animal selon des protocoles précis conformes aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) qui assureront la reproductibilité des essais. Ils se réalisent en différentes étapes suivant des procédures précises internationalement validées :

I.7.3.1.1. Étude de la toxicité aiguë

Elle comprend une étude de la toxicité au moins 7 jours après une administration unique, sur au moins deux espèces de mammifères de souche connue, en utilisant au moins deux voies d'administration différentes dont l'une identique à celle prévue chez l'homme.

Elle doit aussi évaluer la DL50, (dose pour laquelle 50 % des individus meurent) et établir les relations entre les doses utilisées et les effets obtenus.

I.7.3.1.2. Étude des toxicités subaiguë et chronique

Elle a pour but de révéler les altérations fonctionnelles et/ou anatomopathologiques apparaissant après administrations répétées de la substance étudiée, en établissant les conditions d'apparition de ces altérations (doses utilisées, rythmes d'administration). Elle comprend une épreuve à court terme (2 à 4 semaines) et une à long terme (3 à 6 mois ou plus en fonction de la durée envisagée pour le traitement chez l'humain). Elle doit être réalisée sur deux espèces de mammifères dont l'une différente des rongeurs.

I.7.3.1.3. Examen de la fonction reproductrice

Il est effectué si les résultats des autres expérimentations font soupçonner des effets néfastes pour la descendance ou des altérations de la fécondité.

I.7.3.1.4. Étude de la toxicité embryofœtale et périnatale

Son but est d'étudier les phénomènes toxiques éventuels en particulier tératogènes sur l'embryon quand le médicament potentiel est administré à la femelle gestante.

Ces études doivent être effectuées sur 2 espèces animales dont l'une n'est pas un rongeur. Les études péri- et postnatales peuvent être effectuées sur une seule espèce.

I.7.3.1.5 étude du pouvoir mutagène

Cette étude doit révéler les modifications héréditaires du matériel génétique d'individus ou de cellules occasionnés par l'administration du produit.

I.7.3.1.6. étude du pouvoir cancérogène

Celui-ci doit être recherché pour les produits qui présentent une analogie chimique avec des composés reconnus cancérogènes, ou qui ont provoqué des manifestations suspectes au cours de l'étude toxicologique à long terme ou au cours des tests de mutagènes.

I.7.3.1.7. Étude de la tolérance locale

Le but est de montrer la bonne tolérance du médicament par les diverses zones avec lesquelles il peut être en contact.

I.7.3.2 Étude pharmacocinétique et métabolisme du médicament

Les propriétés pharmaceutiques de la molécule sont précisées : absorption, métabolisation, distribution, élimination (ADME). Les propriétés pharmacologiques sont aussi établies. (12)

I.7.4.Recherche clinique

Selon l'article n387 du 31/06/2006 relative au essai clinique : (chapitre I article 2)

On entend par essai clinique toute investigation menée sur des sujet humains en vue de découvrir ou de vérifier des effets clinique et pharmacologique d'un produit pharmaceutique, d'identifier toutes réaction indésirable afin d'en évaluer l'efficacité et la sécurité.

L'essai clinique porte notamment sur les essais thérapeutique, diagnostique et préventifs, les études observationnelles et les études de bioéquivalence.(13)

I.7.4.1.Différentes phases de l'expérimentation clinique

- **Phase I** : Elle privilégie la sécurité d'emploi du produit. C'est l'épreuve de toxicité chez l'homme. Elle se pratique exclusivement chez un nombre limité de volontaires sains (exceptionnellement malades), surveillés en milieu hospitalier avec un maximum de précautions notamment l'accès immédiat à un service de réanimation parfaitement équipé.

Pour les futurs médicaments seront mesurés la toxicité, la dose maximale tolérée (rapport entre la dose efficace et la dose tolérée) et les paramètres pharmacocinétique. Pour les vaccins, on précisera la toxicité, la tolérance, et la dose maximale immunogène (rapport entre la dose immunogène et la dose tolérée) pratique des essais cliniques en Afrique.

- **Phase 2 (étude de l'efficacité)** : La phase 2a a lieu sur des volontaires sains tandis que la phase 2b s'effectue sur des patients modérément atteints par la pathologie cible du médicament candidat. L'administration demeure de courte durée et les critères d'évaluation sont plus physiopathologiques que thérapeutiques. Cette phase 2 permet de préciser les connaissances de pharmacocinétique et le métabolisme du produit, de recenser ses propriétés pharmacologiques, d'établir les courbes de relation entre sa concentration et les effets obtenus, de préciser la dose optimale pour laquelle l'effet thérapeutique est le meilleur pour le moins d'effets secondaires entraînés.

- **Phase 3 (essai comparatif)** : L'efficacité et la sécurité du médicament à l'étude sont étudiées au cours d'un classique essai clinique contrôlé en comparaison avec un traitement de référence reconnu efficace dans la maladie en question ou avec un placebo, sur un grand groupe de malades (plusieurs centaines à plusieurs milliers de patients). Si le médicament traverse avec succès ces différentes phases, il est éligible pour l'accession au marché. Pour ce faire, il faut ensuite suivre toute une procédure administrative.

-**Phase administrative** : Elle résulte de la réglementation complexe entourant la commercialisation du médicament.(14)

AMM ou Autorisation de mise sur le marché

Document officiel émis par l'autorité compétente en matière de réglementation pharmaceutique qui précise la composition et la formulation détail du médicament, les normes de la pharmacopée ou les autres normes reconnus auxquelles doivent satisfaire le produit fini et ses constituants, ainsi que les délais relatifs au conditionnement, à l'étiquetage et à la durée d'utilisation du produit. (Procédure de délivrance d'une autorisation d'exploitation d'un établissement de production de produit pharmaceutique)(15)

-Phase 4 ou poste AMM

Le médicament qui a reçu son AMM, peut être commercialisé par l'industrie pharmaceutique, prescrit par les médecins et délivré par les pharmaciens. La surveillance post-AMM, est nécessaire pour mieux cerner l'efficacité thérapeutique et la tolérance de médicament .certains effet indésirable rares ne sont décelés que pendant cette phase ou seulement après quelques années d'utilisation à large échelle.(64)

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**) (16)

Chapitre II

Perméabilité intestinale des médicaments

Suite à l'administration d'un médicament par une route extravasculaire, la molécule doit être absorbée pour se retrouver dans la circulation systémique et être distribuée dans les tissus et les organes. Pour que la molécule se retrouve dans la circulation sanguine, elle peut traverser la barrière intestinale de façon passive ou interagir avec un récepteur ou un transporteur sur un site d'action afin d'obtenir un effet pharmacologique.

II.1. Barrière intestinale

Comme pour toute barrière biologique, la barrière intestinale se trouve à l'interface entre l'organisme et le milieu extérieur (contenu luminal). Elle est la première surface exposée à tout élément ingéré par voie orale. Si le terme de « fonction de barrière intestinale » est une notion vaste (incluant motricité, épithélium, immunité, flore commensale et mucus). La barrière intestinale couvre une surface d'environ 400 m² comprenant une monocouche de cellules organisées en cryptes et en villosités (17.18). Elle possède des fonctions métaboliques, digestives et immunologiques (17.19). Elle permet de protéger l'organisme de l'invasion de microorganismes pathogènes tout en permettant l'absorption des fluides et des nutriments. Ce système consiste en une barrière externe « physique » et en une barrière interne « biochimique » qui sépare la muqueuse de la lumière de l'intestin et une barrière microbiologique.

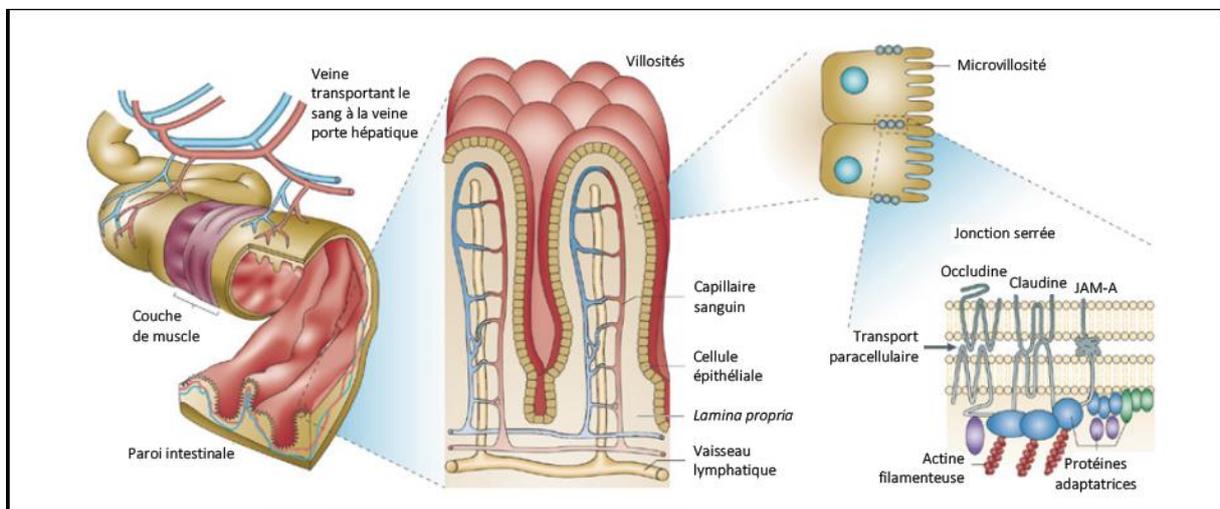


Figure 3 : l'intestin humaine absorbe les nutriments et forme une barrière .20

II.1.1. Barrière physique

La barrière physique inclut la membrane cellulaire de l'endothélium vasculaire et des cellules épithéliales.

II.1.1.1. Anatomie fonctionnel de l'intestin

Le tractus gastro-intestinal communément appelé tube digestif, représente une ensemble d'organes servant d'interface entre l'intérieur de l'organisme et le milieu extérieur environnant. Il comporte la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac, l'intestin ainsi que les glandes annexes (foie et pancréas). L'intestin a pour rôle de digérer, d'absorber et de transporter sélectivement les nutriments, les vitamines, les cofacteurs essentiels, et les déchets, mais il constitue également une barrière efficace contre la pénétration des substances toxiques intra-liminales telles que les bactéries, les antigènes, les additifs alimentaires etc.

Immédiatement après l'estomac commence le premier segment de l'intestin grêle, le **duodénum**, en forme de C, qui mesure environ 25cm de long. Le C enserre la tête du pancréas dont le canal excréteur débouche, avec en général le cholédoque, dans la lumière du duodénum environ à la moitié de la portion descendante, au niveau d'une petite papille verruqueuse. L'extrémité distale du duodénum se poursuit par le **jéjunum** en formant un coude brutal (angle duodénojéjunal). Le jéjunum est nettement plus long que le duodénum et se poursuit sans frontière nette par L'**iléon** (21).

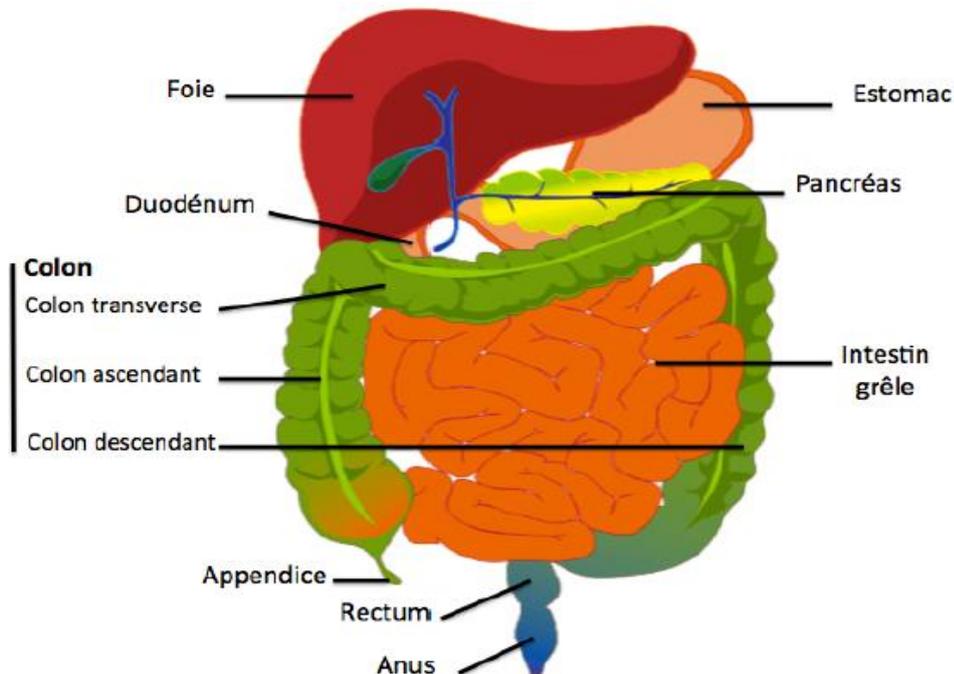


Figure 3 : Diagramme du tractus gastro-intestinal humain. (20)

II. 1.1.2. Paroi de l'intestin grêle

La paroi de l'intestin grêle est constituée de **la séreuse**, **la musculuse externe** (couches musculaires longitudinales et circulaires), **la sous-muqueuse** et **la muqueuse intestinale**. Ce dernier constitue la principale barrière qui contrôle les médicaments et absorption de nutriments après dissolution dans le contenu liminal. La muqueuse est constituée de quatre couches: une monocouche de surface, la membrane basale, la lamina propria et lamina musculuse(22).

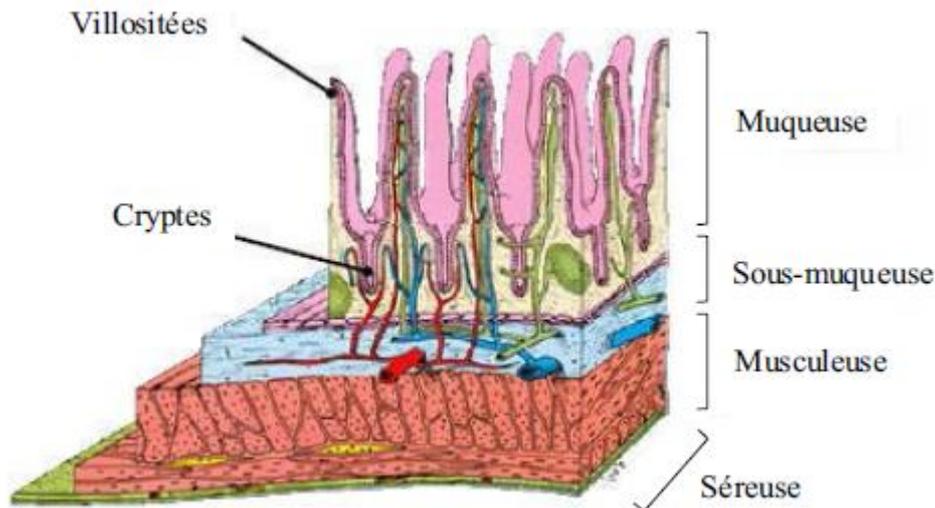


Figure 04 : Représentation schématique de la paroi intestinale (23)

II.1.1.3. Epithélium intestinal

L'épithélium intestinal représente une barrière physique située à l'interface du milieu liminal et de la muqueuse limitant le passage des agents pathogènes. Il s'invagine dans la muqueuse en crypte de Lieberkühn. L'épithélium intestinal est composé principalement de cinq types cellulaires qui vont proliférer, se différencier puis atteindre la mort cellulaire (24). Les cellules souches intestinales situées dans les cryptes sont à l'origine du renouvellement de l'épithélium qui est estimé chez l'homme à 4-5 jours (25). Les cinq types cellulaires majoritaires présentent des caractéristiques qui leur sont propres :

- **Les anthérocytes**. ces cellules absorbantes et sécrétrices possèdent sur leur pôle apical des microvillosités permettant de multiplier la surface d'échange et elles forment un plateau strié encore appelé bordure en brosse. Elles représentent environ 95% de la population cellulaire totale des villosités intestinales (26.27).

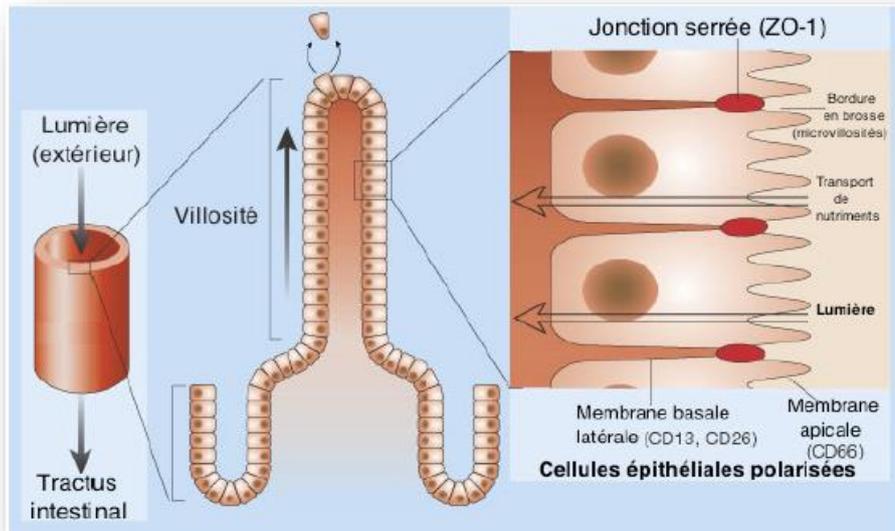


Figure 05: Vue détaillée sur la structure des villosités présente dans la muqueuse intestinale Humaine(28)

- **Les cellules caliciformes.** encore appelées cellules à mucus ou «Goblet cells», se situent davantage dans les deux tiers supérieurs des villosités dans l'intestin grêle, et dans le côlon. Ces cellules dispersées entre les anthérocytes, renferment des globules de mucines libérées sous forme de mucus à la surface de l'épithélium ; lors de cette libération, le mucus s'hydrate fortement, augmente de volume et forme un hydrogel (29)
- **Les cellules entéroendocrines** les cellules endocrines sont localisées à la base des villosités et dans les cryptes. Leur caractéristique commune est de posséder des granules de sécrétion au niveau de leur partie basale (30.31). Les peptides gastro-intestinaux libérés par ces cellules jouent différents rôles, notamment, dans le contrôle des sécrétions gastriques, pancréatiques et intestinales ainsi que dans la motricité et la trophicité du système digestif (32.33).
- **Les cellules "M"** sont des cellules présentatrices d'antigènes situées au niveau de l'épithélium et tout particulièrement dans les plaques de Peyer qui regroupent des agrégats de follicules lymphoïdes primaires et secondaires. Elles captent les antigènes de la lumière intestinale et les transmettent aux cellules immunocompétentes telles que les cellules dendritiques.
- **Les cellules de Paneth :** les cellules de Paneth, cellules sécrétrices exocrines spécialisées situées au tiers inférieur des cryptes de l'intestin grêle ont migré depuis la zone de cellules souches vers la partie inférieure des cryptes où, elles survivent une vingtaine de jours (30.34.35). Elles secrètent dans le mucus des micro granules situés à

leur pôle apical et contenant une série de protéines antimicrobiennes comme le lysozyme (enzyme capable de digérer la paroi en particulier des bactéries Gram-positives) (36), ou d'autres enzymes antibactériennes(37)

Au niveau structural, la muqueuse de l'intestin grêle forme des expansions en « doigts de gant » qui participent au système d'amplification de la surface d'absorption des produits de digestion. Cela est rendu possible par les nombreux replis de la muqueuse, les villosités et les microvillosités qui tapissent la face apicale des anthérocytes. En revanche, le côlon ne présente pas de système d'amplification, il ne présente pas de villosités, les colonocytes sont moins nombreux et les cellules de Paneth sont absentes.

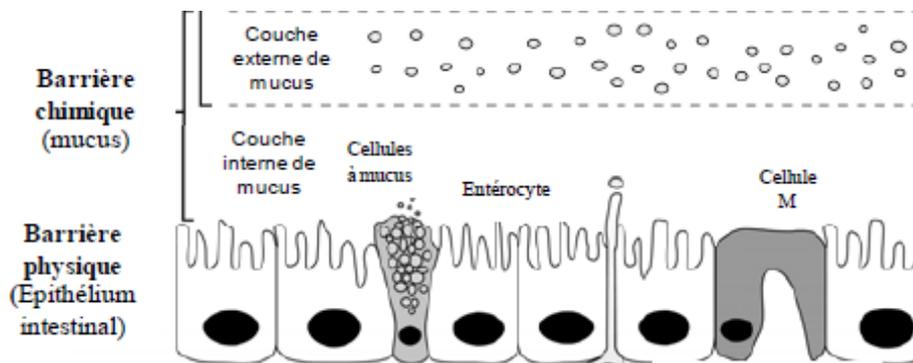


Figure 06 : Composition de la barrière intestinale 38

II.2. Barrières biochimique

II.2.1. Enzymes intestinales

II.2.1.1. Enzymes de phases I

Les cytochromes P450 (CYP) se trouvent au niveau de l'intestin. Cette superfamille des CYP 450, compte les CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4, CYP 2C9 et CYP 2C19. La sous famille la plus représentée est celle des CYP3A. Le CYP 3A4 fait 60 % des enzymes CYP situées au niveau des anthérocytes. Il métabolise un grand nombre de composés et limite ainsi leur absorption Il est inductible et métabolise un grand nombre de substrats par des réactions d'hydroxylation et de N-dé alkylation (37.40)

II.2.1.2. Enzymes de phases II

Celles qui sont exprimées par les anthérocytes sont notamment des aminopeptidases, les dipeptidylpeptidases IV, les endopeptidases proviennent du pancréas: trypsine chymotrypsine, élastases, carboxypeptidases (41). On trouve également des acétyltransférases, des glutathions S-transférases, des méthyltransférases, des sulfotransférases et des UDP-glucuronyltransférases. (39)

Dans le mucus, en provenance des cellules de Paneth, sont secrétés des composants antimicrobiens qui sont des molécules comme les α défensines, cathlécidines, lysozymes, angiogénine 4, phospholipase A2 sécrétrices, collectine, histatine, et des lectines tels REGIII α (connu sous le nom de HIP et PAP) et REGIII γ .

Les anticorps secrétés IgA et IgG par les cellules B et rejetées dans le mucus par les cellules épithéliales rappellent la fonction protectrice. (43)

Notons que dans ce mélange de fluides, interviennent aussi un certain nombre d'enzymes bactériennes (commensales comme pathogènes), dans le côlon en particulier des enzymes de dégradation de la mucine, principale source de carbone et d'énergie des bactéries, et de dégradation des déchets non métabolisés. (44.45)

II.2.2. Transporteurs

Les transporteurs facilitent les échanges des composés endogènes et exogènes à travers la membrane. Sur plus de 400 transporteurs annotés dans le génome humain, environ une trentaine sont impliqués dans l'ADMET des médicaments au niveau des intestins, du foie, des reins, du cerveau et du placenta. Ces transporteurs de médicaments ont une influence considérable sur la pharmacocinétique, l'efficacité et la toxicité des composés. Ils participent aux interactions médicament-médicament, où les médicaments peuvent potentiellement compétitionner pour lier un transporteur. Ceci change la concentration des substrats dans le sérum et dans les tissus ce qui peut mener à des effets secondaires. Les protéines qui influencent le profil pharmacologique des médicaments sont séparées en plusieurs familles : (46.47)

II.2.2.1. Transporteurs ATP dépendantes (ATP binding cassettes)(Proteines ABC)

Les protéines de la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour exporter de nombreuses molécules hors de la cellule, ces transporteurs sont très abondants au point apical de membrane des entérocytes.

Ils sont classés en plusieurs familles :

-Famille des transporteurs de flux Glycoprotéine P (P-gp)

La P-gp est l'un des plus importants transporteurs ABC. Elle appartient à la sous famille B des protéines ABC, d'où son nom ABCB1. Elle est le produit du gène MDR1 (multi drug résistance 1), elle a pour substrats de nombreux anti-cancéreux et est responsable de la

résistance de certaines tumeurs a ces médicaments. Elle joue un rôle protecteur en empêchant le passage dans le sang de molécules potentiellement dangereuses provenant de l'intestin. De très nombreux médicaments s'avèrent être des substrats de ce transporteur, ce qui limite leur biodisponibilité et réduit l'efficacité du traitement.(50)

-Protéine de résistance au cancer du sein (BCRP)

La BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) peut transporter de larges molécules hydrophobes, chargées positivement ou négativement, des cytotoxiques tels que le mitoxantrone, le topotecan, le flavopiridol, et le méthotrexate, des encres fluorescentes ainsi que des composés toxiques présents dans la nourriture. C'est un demi-transporteur, il requiert donc une dimérisation pour être actif(51)

-MRP2

La MRP2 (Multidrug Resistance associated Protein 2) a pour substrats de nombreux anions organiques, surtout des composés conjugués. Elle peut aussi transporter des composés amphiphatiques (un côté polaire et un côté apolaire) neutres et des cations, en présence de glutathion réduit. Ses substrats sont surtout des anticancéreux (vincristine, méthotrexate, cisplatine) et antibiotiques (rifampicine, ceftriaxone) (52)

II.2.2.2. Protéines de solutés SLC

La famille des protéines SLC (soluté carrier) est une autre grande famille de protéines comptant de nombreux transporteurs :

-Transporteurs d'oligo peptides dépendants des protons

La protéine PEPT1, codée par le gène SLC15A1, et principalement exprimée dans les membranes des bordures en brosse des entérocytes, tout au long de l'intestin, assure le transport d'oligopeptides couple à celui de protons (53)

Ce transporteur fonctionne grâce aux protons et dépend du potentiel de membrane. PEPT1 a une forte affinité pour les ω -amino-acides gras et les amino-acides arylamides. C'est un transporteur à faible affinité mais forte capacité (54)

-PAT(proton amino acid transporter)(SLC36A1)

PAT est un autre co-transporteur proton/acide amine, dépendant du gradient de pH. Il transporte des acides amines zwitterioniques, ainsi que des neuromodulateurs comme la D-serine et des antibiotiques comme la D-cycloserine, tous deux utilisés dans le traitement de la schizophrénie. L'acide γ -amino butyrique et ses dérivés comme la vigabatrine et la

gabapentine, utilisées dans le traitement de l'épilepsie, sont aussi des substrats de ce transporteur.(56)

-OATP2B1(Organic Anion Transporter Polypeptide 2B1)(SLC02B1)

OATP2B1 est un polypeptide de transporteur d'anions organiques. Son fonctionnement est lui aussi dépendant du gradient de pH. Il a pour substrat l'atorvastatine et la pravastatine (inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) reductase), la fexofénadine (antihistaminique), le glibénclamide (antidiabétique) et la bromosulfophtaléine. Il est inhibé par le jus de pamplemousse.(58)

-MCT(monocarboxylate transporter)

MCT est aussi un co-transporteur proton/anion, ayant de nombreux substrats, dont certains communs à OATP2B1 comme les benzoates et salicylates ainsi que les inhibiteurs de la (HMG-CoA) reductase pravastatine et atorvastatine. Parmi ces substrats on trouve aussi le valproate (anticonvulsivant) et des acides gras à chaînes courtes- et D-lactate, pyruvate, acetate, propionate et butyrate, ainsi que les corps cétoniques acétoacetate et β -hydroxybutyrate. 55.

-OCT(organic cation transporter)

OCT 1 et 2 interagissent avec des composés endogènes tels que la choline, la dopamine, l'histamine, et la 5-hydroxytryptamine, mais aussi avec des antagonistes (phénoxybenzamine, cimetidine), des agonistes (clonidine, Ométhylisoprenaline), des bloqueurs de canaux ioniques (procainamide, quinidine, mepiperphenidol, verapamil), des substances psychoactives (desipramine), des antiviraux (acyclovir, ganciclovir), et des agents antidiabétiques (metformine, phénoène), un antimalarique (quinine) et des antiparkinsoniens (amantadine et memantine) (59).

II.3.Barrière microbienne

La flore intestinale exerce de nombreuses fonctions essentielles pour le maintien de la santé de l'hôte. Les micro-organismes qui la composent possèdent en particulier un potentiel métabolique considérable. Ils sont ainsi capables de convertir une grande variété de substrats (incluant : glucides, protéines et lipides) générant une diversité de métabolites dont la plupart ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Leur rôle a ainsi été établi dans le développement et la maturation du système immunitaire, le métabolisme des leucocytes, l'angiogenèse, intestinale ou encore le développement du tissu adipeux.

La caractérisation du microbiote intestinal basée sur les approches culturelles ne permet pas de prendre en compte qu'environ 30 pour cent de la diversité des micro-organismes car la plupart

des espèces bactériennes n'est ni cultivable ni identifiable avec les techniques basées sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques ; l'essor de techniques moléculaires basées sur le séquençage des gènes codant les ARN ribosomiques 16S a permis une meilleure caractérisation des communautés microbiennes intestinales et a montré que la grande partie des espèces dominantes observées dans le microbiote fécal d'un individu lui est propre, trois groupes bactériens rassemblent la plupart des populations dominantes : les firmicutes, les bacteroidetes et les acinobacteria. Les protéobactéries représentent un phylum minoritaire. Les genres bactériens dominants retrouvés chez l'adulte sont Bacteroides, Eubacterium, Ruminococcus, Clostridium et bifidobacterium. (60.61.62)

II.4. Transport à travers la membrane cellulaire

Pour qu'un médicament soit absorbé, la molécule doit traverser la muqueuse intestinale. Ceci peut se faire selon différents mécanismes, dépendamment de ses propriétés physicochimiques comme la distribution des charges, la taille et l'hydrophobicité. Le transport de molécules à travers la membrane plasmique est médié par différents processus :

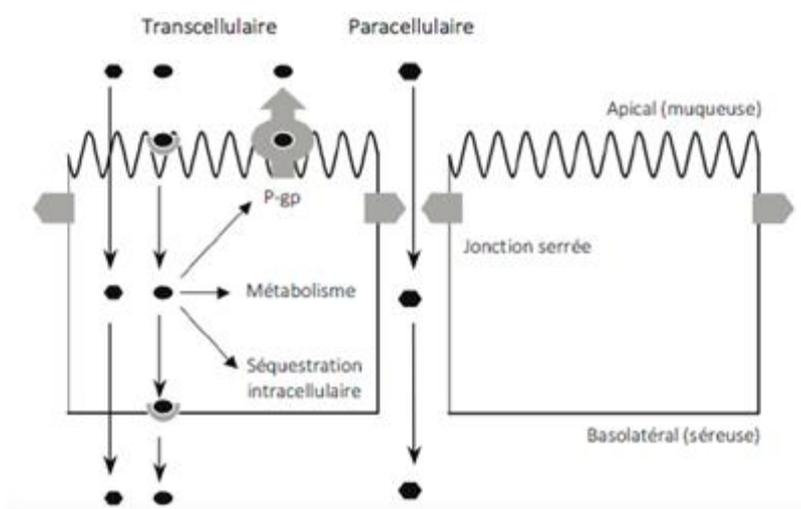


Figure 07 : Routes d'absorption à travers l'épithélium intestinal (63)

II.4.1. Passage paracellulaire

C'est le passage des molécules dans l'espace entre les jonctions serrées des cellules épithéliales. Ce passage dépend essentiellement du poids moléculaire de molécule et de sa flexibilité. (64)

II.4.2. Passage Trans cellulaire

Correspond au passage de molécule à travers les cellules intestinales. Il inclut la diffusion passive, la diffusion facilitée, le transport actif et l'endocytose :

II.4.2.1. Diffusion passif

Les molécules traversent la membrane cellulaire selon un gradient de concentration et sans aucune source d'énergie. Ce transport n'est pas saturable et ne présente aucune spécificité. (65)

II.4.2.2. Diffusion facilité

C'est un processus saturable implique la participation des transporteurs qui sont de natures protéique (canaux ou protéines transmembranaires) ou molécules organique (Ionophores), se fait selon le gradient de concentration et sans aucune source d'énergie (66 .67)

II.4.2.3. Transport actif

C'est un processus énergétique saturable (limité par le nombre des protéines transmembranaire présents), s'effectue contre le gradient de concentration. Le transport actif est sélectif et peut être perturbé par la présence des inhibiteurs.

Il existe deux types de transport actif, Le transport **actif primaire** qui utilise l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) comme source d'énergie, par exemple les pompes Na^+/K^+ -ATPase et H^+/K^+ -ATPase. Le transport **actif secondaire** utilise l'énergie potentielle provenant d'un gradient électrochimique

II.4.2.4. Endocytose

Il est aussi appelé transport par vésicule, il désigne l'incorporation de particules ou de liquide par l'invagination de la membrane cellulaire formant finalement des vésicules intracellulaires. Une dépense énergétique est nécessaire. (68)

II.5. Facteurs influençant la perméabilité intestinale

L'administration des médicaments par voie orale est la méthode la plus utilisée de fait de leur efficacité et la bonne commodité pour le patient. Tous les facteurs susceptibles de modifier les barrières physiques et biochimiques peuvent également entraîner une modification de la biodisponibilité. En relation avec divers paramètres les principaux facteurs sont les suivantes (69 ,70) :

II.5.1.Facteurs liées au médicament

II.5.1.1.Caractéristiques physico-chimiques des molécules

- **Taille des particules**

La vitesse de dissolution dépend de la surface de contact entre le solide et le milieu, d'où l'importance de la taille des particules. Quand la taille diminue, la surface d'échange augmente. La micronisation a permis d'augmenter la vitesse de dissolution et donc la biodisponibilité du médicament. Ce procédé a amélioré la biodisponibilité de certains médicaments comme la spironolactone(71).

- **polymorphisme**

Une substance chimique est dite polymorphe lorsqu'elle existe sous deux ou plusieurs formes cristallines. A chacune de ces formes correspond une solubilité. Un exemple est fourni par le chloramphénicol qui existe sous trois formes cristallines dont les solubilités sont très différentes (72)

- **Etat d'hydratation et de salification**

L'hydratation modifie la solubilité. La forme anhydre est généralement plus soluble comme le cas de l'ampicilline.

La salification modifie la vitesse de dissolution des acides et des bases faibles. Dans le cas de la phénytoïne, l'absorption de la forme sodique est moins complète que celle de l'acide (73)

II.5.1.2.Forme galénique

Les formes pharmaceutiques destinées à la voie orale peuvent être classées en fonction de la rapidité de libération du principe actif en solution, suspension, poudre, gélule, comprimé nu et comprimé enrobé. Plus la forme est complexe, moins le principe actif est résorbé rapidement. Ceci est dû en grande partie à la présence d'excipients (72).

Un excipient en apparence inerte peut modifier de façon importante l'absorption du principe actif. Certains excipients ou procédés de fabrication ont pour finalité de retarder ou modifier l'absorption du principe actif.

Il existe également d'autres caractéristiques physico-chimiques pouvant limiter la biodisponibilité, notamment l'interaction de la molécule avec le mucus. Les propriétés physico-chimiques du mucus ont une influence sur l'absorption des médicaments. Sa principale fonction est de protéger la muqueuse des dommages mécaniques et des corps étrangers, d'éviter les pertes d'eau pour garantir l'intégrité cellulaire et enfin d'agir comme lubrifiant pour faciliter le transit du bol alimentaire. L'absorption pourra donc être modifiée par la création de liaisons hydrogènes ou ioniques. (70)

II.5.1.3.Facteurs liés au sujet

-La présence ou non d'un bol alimentaire qui influence le pH, la vidange gastrique et les sécrétions biliaire et pancréatique.

-L'âge du sujet influence la motilité gastro-intestinale et la durée du transit ainsi que le flux sanguin local.

-La poly médication influence le flux sanguin local, le pH et la vidange gastrique. Elle modifie la durée du transit. (71)

Chapitre III

Modèles expérimentales d'étude de la perméabilité intestinale des médicaments.

Aujourd'hui, la recherche de nouveaux modèles, destinés par exemple à évaluer la perméabilité intestinale, est devenue un véritable enjeu pour l'industrie pharmaceutique. Ces modèles peuvent être automatisables, discriminants, peu coûteux et surtout prédictifs. Des méthodes de complexité expérimentale croissante ont été choisies qui sont les suivantes :

III.1.Modèles physico-chimiques (in vitro non cellulaire)

Il existe plusieurs méthodes physico-chimiques pour évaluer l'absorption d'un composé. Les paramètres les plus fréquemment étudiés sont les liaisons hydrogène, la taille et la forme de la molécule, la structure cristalline (polymorphisme), la polarité, la flexibilité et l'ionisation.

Les estimations de ces paramètres, basées sur des méthodes physicochimiques, sont particulièrement intéressantes par leur rapidité, leur efficacité et leur reproductibilité vis-à-vis des molécules absorbées par transfert passif. D'autre part, elles sont aisées à réaliser et nécessitent peu de main-d'œuvre. Cependant, ces méthodes ne tiennent pas compte des interactions complexes qui interviennent entre la membrane et la molécule transporteur. L'absence des conditions physiologiques réelles peut conduire à de mauvaises prédictions. C'est méthodes sont les suivantes (75) :

III.1.1.Coefficient du partage octanol /eau

Le coefficient de partage octanol/ eau est une propriété importante pour mesurer la lipophilie des molécules organiques .L'octanol est souvent utilisée par ce qu'il possède des propriétés similaire à celle de la membrane biologique; ce coefficient est déterminé par une méthode classique dite du flacon agité (extraction liquide-liquide) .IL est définit par le rapport de la concentration de composé étudié dans l'octanol (C_{oct}) à la concentration dans la phase aqueuse (C_{aq}) :(76 ;77)

$$P = C_{oct}/C_{aq}.$$

Étant le quotient de deux concentrations, le coefficient de partage est sans dimension et il est généralement donné sous la forme de son logarithme en base dix ($\log p$). (78)

Un autre coefficient de partage, plus pertinent, qui prend compte du degré d'ionisation des composés est le coefficient de distribution, exprimé également sous forme logarithmique ($\log D$). (79)

Pour les acides :

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

Pour les bases :

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

III.1.2. Potentiel d'absorption

Ce paramètre est proposé par Dressman et al, il regroupe les différentes bases des paramètres physico-chimiques en une seule équation. (80)

$$AP = \log \left(P * F_{\text{non}} * \left[\frac{S_o * V_L}{X_o} \right] \right)$$

P: coefficient de partage octanol /eau .

F non : fraction de médicament non ionisées à ph de 6,5.

So : solubilité aqueuse des espèces non ionisées à température de 37.

VI: le volume liminal.

Xo: la dose du médicament.

III.1.3.chromatographie par membranes artificielle immobilisée(IAM)

La chromatographie par membrane artificielle immobilisée est une technique de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) utilisant des lipides comme phase stationnaire. Les molécules qui interagissent fortement avec les lipides sont retenues dans la colonne. Le principe repose sur le fait que la couche lipidique est la principale barrière de la perméabilité de la majorité des solutés et qu'un composé qui a un long temps de rétention dans la colonne devrait avoir une bonne perméabilité à travers la membrane cellulaire.(81)

Cette méthode est devenue un outil de prédiction précis, rentable et efficace de la perméabilité intestinal des composés.(75)

III.1.4.Modèle PAMPA (parallelartificial membrane permeabilityassay)

vers les années 2000 , le test PAMPA a fait ses débuts comme test de criblage primaire de perméabilité .Ce test qui a été introduite pour la première fois par kansy et ses collaborateurs est réalisé sur une plaque de 96 puits séparés en deux compartiments par un filtre imbibé dans un mélange de phospholipides. Le compartiment receveur contient du tampon aqueux et le compartiment donneur contient la solution du composé à tester. Le taux d'apparition du médicament dans le compartiment receveur reflète la diffusion à travers la membrane. Les données de perméabilité sont déterminées par des mesures aux UV, par HPLC, LC-MS ou LC-MS/MS. (82 .81.83.84)

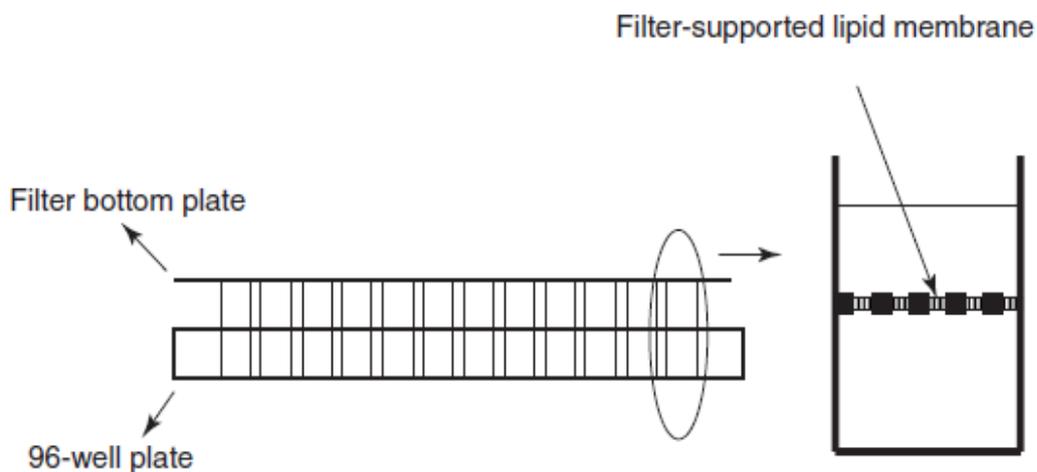


Figure 08 : représentation schématique du modèle PAMPA (84)

Plusieurs versions du test ont été développées, Parmi eux, on peut citer :

III.1.4.1 .PAMPA lécithine d'œuf (Modèle Roche)

Il s'agit de la première version du test. Elle a été inspirée par les travaux de Kansy et coll. et représente la version la plus simple du test. Elle consiste en effet à imbiber le filtre poreux dans une solution de lécithine d'œuf dissout dans du n-dodecane. Le choix de la lécithine d'œuf est inspiré du fait que les phosphatidylcholines sont prédominantes dans les membranes cellulaires des mammifères. Très souvent, du cholestérol est additionnée à la lécithine d'œuf afin de mimer la membrane cellulaire des mammifères. Ce test a permis d'établir une corrélation hyperbolique entre les flux mesurés et les valeurs d'absorption humaine tout comme celle existante pour le test Caco-2 . Ce modèle a été sujet à une modification au niveau du type de filtre. En effet, Zhu et coll. ont remplacé le filtre de

poly fluorure de vinylidène (PVDF) hydrophobe utilisé par Kansy par un filtre de PVDF hydrophile ayant de faibles interactions avec les protéines. Ils ont permis grâce à ce test de réduire la durée de l'expérience de 15 heures à 2 heures .(82,85, 86) .

III.1.4.2. Modèle pION ou le PAMPA-DOPC

C'est une extension du modèle de Roche qui a été rapportée 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 ou d'un gradient de pH. Ce test utilise un phospholipide synthétique, la dioléoylphosphatidylcholine (DOPC) qui est un phospholipide complètement zwitterionique et présentant une faible rétention pour une

Grande gamme de composés à l'exception de certains comme la chlorpromazine, la primaquine et la progestérone. Il a une transition de phase gel-fluide bien caractérisée étant donné qu'il constitue un modèle standard de bicouche de lipides insaturés. Parmi les autres avantages que présente ce phospholipide est que sa température de transition est très basse ($T_m = -16,5^\circ\text{C}$), ce qui permet une manipulation aisée à température ambiante. Ce test utilise les plaques pION avec un mélange de 2% (w/v) DOPC dissoute dans du n-dodécane. Plusieurs tests qui ont été développés par la suite utilisent ce dispositif pION mais avec différents mélanges lipidiques. (87, 86,88)

III.1.4.3. Modèle n-hexadécane : HDM-PAMPA (Modèle Novartis)

Faller et Wohnsland ont développé un test exempt de phospholipides utilisant seulement un filtre en polycarbonate de 10 μm d'épaisseur (20% porosité) imbibé dans l'hexadécane. Ils ont démontré que l'utilisation d'un solvant inerte tel que le n-hexadécane pouvait améliorer les résultats des tests de perméabilité des composés simples. Ce test a également permis la prédiction du coefficient de partage alcane/eau, souvent très difficile à mesurer de façon directe à cause de la faible solubilité des molécules dans l'alcane. (89; 86 ;90)

III.1.4.4. PAMPA biomimétique : BM-PAMPA

Sugano et coll. ont essayé de reproduire les conditions que présente la bordure en brosse, caractéristique des intestins humains, en dissolvant dans du 1,7-octadiène un mélange de phospholipides qui ressemble fortement à celui présent dans les membranes biologiques. Ce mélange est généralement constitué de cholestérol (33% w/w),

27% PC, 27% PE, 7% PS, 7% PI. Une telle composition permet une plus grande rétention au niveau de la membrane lorsque des composés lipophiles sont évalués. Le pH dans le compartiment donneur et dans le compartiment accepteur est ajusté dans l'intervalle 5 et 7,4. Ce test a contribué à une amélioration significative de la prédiction de l'absorption intestinale .(91,86)

III.1.4.5. Double-Sink : DS-PAMPA

Cette méthode a été mise au point par Avdeef dans le but de mimer les conditions présentes dans le tractus gastro-intestinal. Ce modèle utilise, tout comme le PAMPA décrit par Kansy, un mélange lipidique à base de lécithine. Par contre il a substitué les conditions traditionnelles par un système de deux gradients « double-sink». En effet, le PAMPA traditionnel utilisait un même pH dans les deux compartiments, alors que ce dernier utilise deux pH différents. Au niveau du tractus gastro-intestinal, le médicament est exposé à différentes valeurs de pH alors que le sang est maintenu à un pH de 7,4.

De ce fait, le PAMPA-DS utilise un pH entre 5,0 et 7,4 dans le compartiment donneur, dépendamment du composé à tester, et maintient un pH 7,4 dans le compartiment accepteur. Ce gradient de pH permet la perméabilité des acides faibles en permettant aux molécules à faible pka de passer à travers la membrane grâce au faible pH dans le compartiment donneur, et de rester piégées dans le compartiment accepteur sous leurs formes chargées, créant ainsi des conditions d'extrême dilution virtuelle (sink). Ce gradient de pH constitue la première condition « sink » dans cette méthode « double sink». La deuxième condition « sink » profite de la présence de surfactants présents dans le compartiment accepteur afin de rendre unidirectionnelle la perméabilité des composés lipophiles à travers la membrane.(92.86)

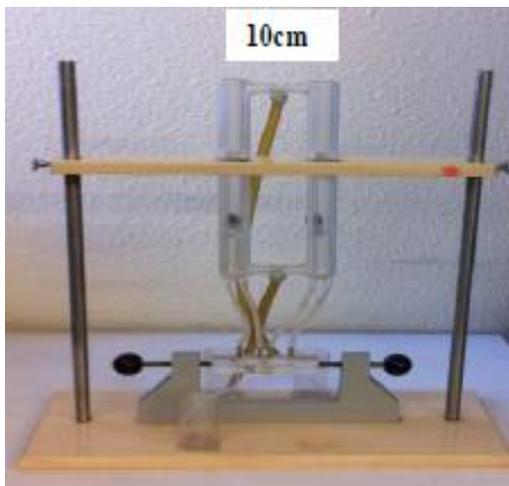
III.2. Modèles Ex vivo

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.2.1. Chambre de diffusion (Chambre d'Ussing)

De nos jours les études de perméabilité des tissus intestinaux Ex vivo sont principalement réalisées dans **les chambres d'Ussing (68)**.

La technique de la chambre d'Ussing a été développée par **Ussing et Zerahn(1951)** (**figure 10**) pour étudier le transport actif du sodium et plus tard adapté par **Grass et Sweetana (1988)** pour évaluer la perméabilité intestinale des médicaments. Au fil des ans, plusieurs modifications de la chambre d'Ussing classique (chambres d'Ussing modifiées) ont été fabriquées pour améliorer les performances de cette modèle. (**97**)



9



10

Figure 9: Dispositif expérimental original ainsi qu'il fait conçu par H Ussing en 1951(**94**)

Figure 10: Équipement de la chambre d'Ussing (**95**).

La chambre d'Ussing est composée de deux demi-chambres initialement construites en verre, mais fréquemment en plexiglas (poly méthacrylate) à l'heure actuelle. Les demi-chambres sont ouvertes sur une de leurs faces. Ainsi, lorsqu'elles sont assemblées, l'ouverture est appliquée contre la surface exposée du tissu étudié. Cette disposition permet de définir un côté muqueux et un côté séreux(**94**). une partie de tissu intestinale est excisée , coupée en petits morceaux des segments de tailles appropriées, et ouverts pour former une feuille épithéliale plate qui est placée entre les deux moitiés de la chambre , qui sont remplies d'un tampon physiologique gaze continuellement avec du carbogène (95% O₂, 5% CO₂) et chauffé à 37 °C

(98) et est maintenu sous agitation pour pouvoir contrôler l'épaisseur de la couche d'eau stationnaire(99). La perméabilité est basée sur l'apparition du médicament dans le coté séreux plutôt que sa disparition dans les muqueuses (**Figure 12**).

La caractéristique unique de cette méthode est la résistance électrique de la membrane qui peut être mesurée au cours de l'opération expérimentale .le courant de court-circuit ainsi que la résistance à travers la membrane sont utilisés en tant que paramètre indicateur de la viabilité du tissu intestinale au cours de la période de l'étude de transport avec la chambre d'Ussing. (68)

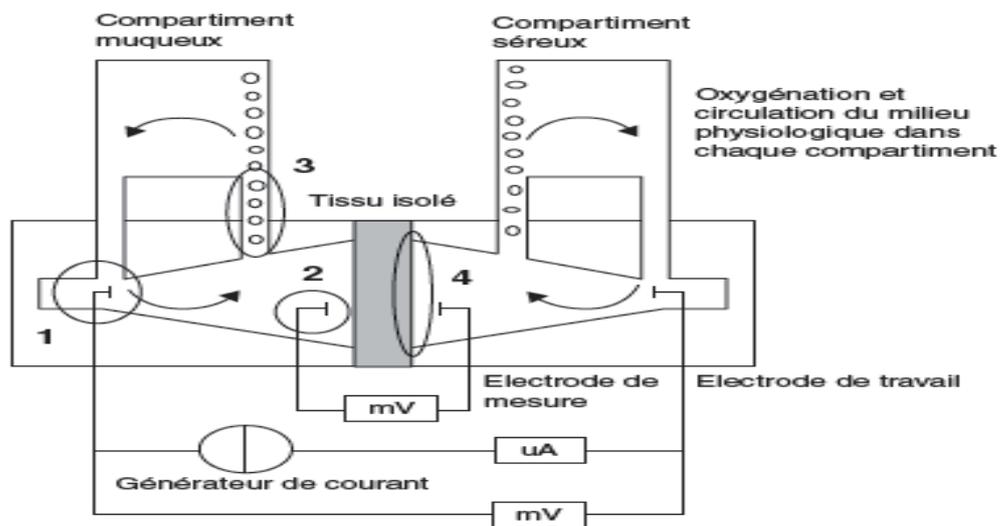


Figure 11 : Représentation schématique du modèle expérimental de chambre d'Ussing
 1. Interface métal-liquide ou liquide-liquide selon les électrodes de travail ; 2. Interface liquide-liquide pour les électrodes de mesure ; 3.interface gaz-liquide pour le bullage de carbogène ; 4. Interface tissu biologique-solution.

La perméabilité apparente **P** est estimée à l'aide de l'équation : (100)

$$P = (V/A \cdot C_0) (dc/dt)$$

V : le volume de la chambre de réception.

A : la valeur de la surface du tissu exposé.

C₀ : la concentration initiale dans la chambre du donneur.

dc/dt:le changement de médicament dans le récepteur avec le temps.

III.2.2. Anneaux et sacs intestinaux reversés

Les anneaux et les sacs intestinaux reversés sont un système relativement simple pour la mesure d'absorption. Dans cette méthode, une section de l'intestin est isolée immédiatement après avoir enlevé d'un animal mort et lavé dans un tampon glacé pour éliminer les débris et produits digestifs. Une extrémité de la section intestinale coupée est attachée avec un morceau de suture et l'extrémité fermée est soigneusement poussée à travers l'intestin à l'aide d'une tige en verre, résultant en un segment intestinal intérieur et extérieur.

Pour obtenir des anneaux intestinaux, le tissu est découpé en anneaux de 2 à 4 mm de large(101). Les anneaux sont incubés dans une solution tampon oxygénée contenant du composé à l'étude et bien agité dans un bain d'eau. Après un intervalle de temps, les anneaux sont sortis de la solution, séchés, pesés et dissous ou traités pour analyse.

L'absorption du composé peut être mesurée par comptage de radio marqueurs ou dosage de fluorescence.

Contrairement aux anneaux intestinaux, seule la muqueuse est en contact avec l'apement dans le modèle de sac intestinal. Le sac est rempli de tampon et mis dans un ballon avec un tampon oxygéné carbogène contenant le composé étudié. À la fin de l'expérience, le sac est ouvert à une extrémité et le liquide séreux est recueilli (102). L'intégrité du tissu pendant l'expérience peut être surveillée en mesurant le transport d'un marqueur tel que le colorant bleu trypan.

Semblable aux anneaux intestinaux éversés, le modèle de sac intestinal éversé est une technique peu coûteuse, relativement simple et permettant plusieurs expériences à réaliser avec un tissu provenant d'un seul intestin. Ce modèle peut être un outil d'étude des aspects mécanistes de l'absorption, en particulier pour évaluer l'absorption par différentes parties de l'intestin grêle et du côlon. Cependant, la liaison non spécifique, les conditions d'agitation sous-optimales et la courte viabilité des segments intestinaux restent des limitations sérieuses de cette méthode.

III.3. Modèles in vitro à base des cellules

III.3.1. Cellule caco-2 (caucasien colon adénocarcinome)

Le modèle cellulaire Caco-2, lignée dérivée d'adénocarcinome colique, est un des modèles les plus utilisés pour étudier l'absorption intestinale des médicaments et des toxiques. Ces cellules forment une monocouche polarisée, morphologiquement semblable à l'épithélium intestinal, et forment des jonctions serrées (103). Les Caco-2 cultivés sur inserts (**Figure 13**) permettent de quantifier le passage des xénobiotiques (perméabilité apparente P_{app}) du pôle

apical vers le pôle basolatéral et inversement, à travers une membrane semi-perméable. Les valeurs de perméabilités mesurées sont ensuite comparées aux valeurs de médicaments très perméables comme le métoprolol (P_{app} : $29 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) pour évaluer le degré d'absorption du composé (104).

Ce modèle d'étude permet de prédire le degré d'absorption intestinale et renseigne également sur le mode de passage du composé (diffusion passive ou prise en charge par des transporteurs). Les valeurs de perméabilité mesurées sur Caco-2 sont relativement bien corrélées à l'absorption intestinale humaine mais doivent être interprétées avec prudence (104).

Les composés ayant des P_{app} supérieur à $5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ présentent une absorption gastro-intestinale de plus de 50% chez l'homme mais les composés présentant des perméabilités plus faibles ne sont pas nécessairement peu absorbés *in vivo*. (105)

Les études effectuées sur la lignée Caco-2 présentent également l'inconvénient d'une grande variabilité entre les laboratoires de recherche, des contraintes d'utilisations, et des temps d'absorption lents comparable à l'intestin humain. La lignée sous-exprime aussi les transporteurs présents dans le tractus gastro-intestinal et ne peut prédire précisément la contribution du transport actif dans le passage de la barrière *in vivo*. (106)

D'autres lignées cellulaires (T48, HT29, MDCK.....) sont également utilisées sur le même principe, de même que des entérocytes primaires, pour étudier l'absorption intestinale des xénobiotiques. (107)

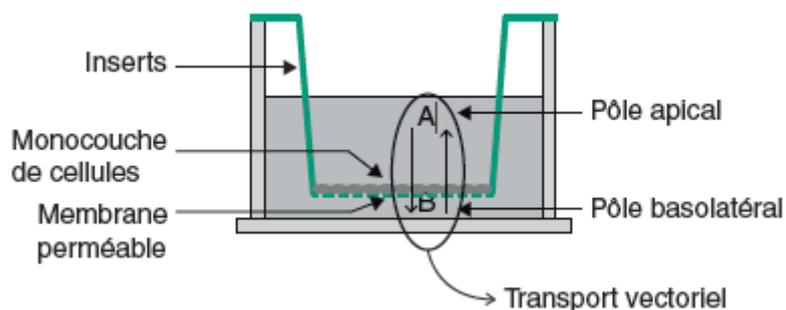


Figure 12 : Représentation schématique du protocole expérimental utilisant des cellules caco2 en culture.(108)

III.3.2.Lignée MDCK

La lignée cellulaire MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*), originaire du rein de chien, a gagné en popularité et est devenue fréquemment utilisée par les compagnies pharmaceutiques pour l'évaluation du transport des médicaments. Son avantage majeur est que la monocouche

cellulaire est différenciée au bout de 3-7 jours contrairement à celle des Caco-2(21 jours). Il existe deux sous-clones avec des valeurs de résistance transépithéliale (TER) distinctes : la première souche avec des hautes résistances ($\approx 4000 \Omega \text{ cm}^2$) et une deuxième caractérisée par une faible résistance ($\approx 200\text{-}300 \Omega \text{ cm}^2$).

Le test MDCK est considéré comme un outil suffisant pour prédire la diffusion passive. Irvine et coll ont pu rapporter des corrélations entre les fractions orales absorbées déterminées avec ce test et le test Caco-2 et ceci en se basant sur 55 composés. Toutefois, cet essai présentées mêmes inconvénients que le test Caco-2 dans la mesure où il génère autant de faux-positifs lorsqu'il s'agit de composés à faible perméabilité(107). L'expression des transporteurs comme le Pgp dans le rein de chien est très différente de celle existante dans les intestins humains, alors ce test ne peut donc pas être utilisé pour le criblage de composés qui sont sujets à des transporteurs. Ce test reste tout de même accepté par l'agence Américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration, FDA*) pour le système de classification biopharmaceutique (110, 111).

III.3.3. 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 (112). Une fois cultivées, ces cellules se développent rapidement en couche unitaire bien formée avec des microvillosités sur leur surface cellulaire apicale (113). 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 (112).

III.3.4. Cellules 2/4/A1

Les cellules 2/4/A1 proviennent de l'intestin fœtal de rat qui imite mieux la perméabilité de l'intestin grêle humain en particulier en ce qui concerne le transport transcellulaire et para cellulaire passif de médicament cette lignée cellulaire immortalisée forme une lignée cellulaire différenciée viable (115)

Les cellules 2/4/A1 ont été proposées comme un meilleur moyen pour étudier les composés transportés passivement par l'intermédiaire d'un modèle para cellulaire. le taux de transport des matériaux peu perméables (ex : mannitol, créatinine) dans les monocouches de 2/4/A1 était comparable à celui de jéjunum humain et était jusqu'à 300 fois plus rapide que celui de cellule caco-2 (75).

III.3.5. Lignée HT29

Cette lignée est constituée en majorité par des cellules indifférenciées, non polarisées sous forme d'une multicouche épithéliale. Moins de 5 % des cellules sont capables de se différencier en cellules polarisées. Les cellules peuvent se différencier selon certaines conditions de culture soit en cellules transporteuses d'ions, soit en cellules à mucus, ou encore en entérocytes. On peut sélectionner les sous-populations entérocytaires en remplaçant le glucose par le galactose, par exemple. L'épithélium formé possède, au bout d'une dizaine de Passages, des caractéristiques morphologiques (bordure en brosse) et biochimiques (enzymes et transporteurs) comparables à celle des entérocytes non cancéreux, à laquelle sont associées les enzymes hydrolases.

L'étude du transport de xénobiotiques est possible avec ces sous-populations de cellules. Néanmoins, la culture de la lignée est difficile à maîtriser. La particularité de la différenciation de ce modèle explique que ces cellules soient moins utilisées pour les études de transport. (116).

III.4.Méthode In situ

Les méthodes in situ font principalement référence à des expériences sur des animaux entiers, où l'apport sanguin complet et la domination nerveuse sont présents, et plus important encore, où le nerf intestinal reste intact. Ces méthodes reflètent directement l'absorption in vivo du médicament et sont donc couramment utilisées pour étudier la cinétique de pénétration et d'absorption du médicament. Les méthodes in situ comprennent **la perfusion intestinale, les boucles intestinales et la canulation vasculaire intestinale.** (117)

II.4.1.Perfusion intestinale

La technique de perfusion intestinale, a été proposée pour la première fois par Curran et al. (118), pour étudier les flux d'ions et d'eau dans l'iléon de rat. Ce modèle a été largement utilisé et appliqué, en raison de sa simplicité, la facilité relative des techniques chirurgicales et son faible coût. La procédure expérimentale générale est la suivante : Premièrement, le tube de perfusion et le tube de drainage sont insérés par laparotomie dans les segments intestinaux proximaux et distaux, respectivement. Deuxièmement, la solution de médicament est versée dans la cavité intestinale avec une pompe péristaltique à un débit spécifique et l'effluent est recueilli. Les concentrations de médicament et de traceur sont déterminées et utilisées pour calculer le taux d'absorption du médicament et le P_{eff} respectivement.

Sur la base des différents modes de perfusion utilisés, la perfusion intestinale est divisée en perfusion circulaire et perfusion en un seul passage ou la différence entre la perfusion en un seul passage et la perfusion circulaire réside dans le fait que, dans le premier cas, le perfusât ne retourne pas dans le conteneur de médicament d'origine mais dans un autre conteneur de collecte, à extrémité final comme monter la figure (120).

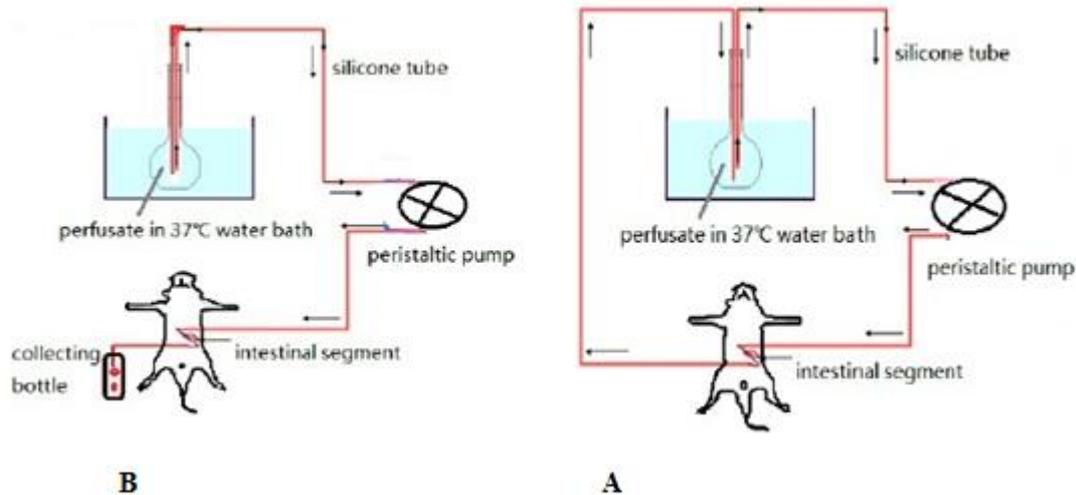


Figure13 : Représentation schématique de la perfusion intestinale. A : perfusion circulaire. B : perfusion en un seul passage. (117)

III.4.2.Méthode de boucle intestinale

Cette méthode a été introduite par Kannikar en 1971 (119). Les rats sont d'abord anesthésiés, l'abdomen est ouvert et le segment souhaité de l'intestin est lavé, ligaturé puis injecté avec une concentration spécifique du médicament dans la boucle intestinale. Tout le tractus gastro-intestinal est soigneusement replacée dans la cavité abdominale et l'incision est fermée à l'aide de clamps et maintenue humide en la recouvrant de tampons de gaze préalablement trempés dans une solution saline normale. Après 24 h au maximum, le rat est euthanasié et les intestins sont prélevés pour analyse. (120)

Cette méthode est plus facile à réaliser que la perfusion intestinale in situ. Cependant, étant donné que l'intestin sécrète de grandes quantités de liquides digestifs au cours de l'expérience et qu'il peut y avoir beaucoup de résidus d'aliments dans la lumière, il peut s'avérer difficile d'analyser les échantillons.

III.4.3.Canulation vasculaire intestinale

La mesure de l'absorption des médicaments avec cette méthode est déterminée en calculant la quantité de médicament absorbée dans le sang, qui n'est pas limitée par la taille des animaux de laboratoire ni par le volume sanguin utilisé. Cette méthode peut donc refléter fidèlement la perméabilité des médicaments dans l'intestin grêle. (121)Cependant, les médicaments sont sensibles aux effets du catabolisme dans le système circulatoire sanguin et des traumatismes se produisent dans l'abdomen du rat au cours de l'expérience. En outre, l'utilisation de cette méthode est difficile à maîtriser. Tous ces défis limitent l'application généralisée de cette méthode.

III.5.Modèle in vivo : Perfusion intestinale

La perfusion intestinale a pour objet de mesurer la perméabilité d'un produit actif par le biais des instruments insérés dans le tube digestif dans la lumière intestinale d'un animal anesthésié (70)

Plusieurs approches de perfusion ont été adoptées dans les intestins grêles: perfusion à système ouvert, perfusion à système semi-ouvert et perfusion à système fermé (44).

A titre d'exemple **lipka et Al** ont développé un instrument de perfusion dit l'instrument oc-I-Gut qui consiste en un tube à canaux multiples avec deux ballons gonflables. Ce dernier à six canaux a pour but de faciliter l'infusion des médicaments et des marqueurs, le drainage gastrique et le gonflement de deux ballonnements comme montré dans la **figure 15**.

La solution introduite traverse une dizaine de centimètres de l'intestin et elle est recueillie par un autre instrument pour l'analyse. Le débit d'absorption est calculé à partir du taux de disparition du composé du segment perfusé. (108)

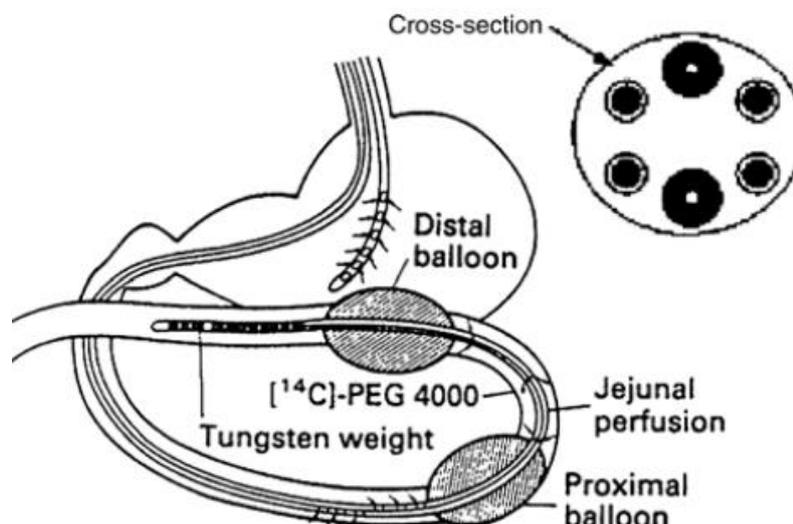


Figure 14: Segment perfusé chez l'animal créé avec le tube multicanaux et les deux ballons gonflables(108)

III.6.Modélisation in silico

III.6.1.Historique

Selon Ekins et al.(2000), l'utilisation de la modélisation par ordinateur dans les domaines de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion (ADME) a connu plusieurs périodes distinctes. Tout d'abord, dans les années 60-70, des études isolées à partir de données ADME in vivo furent menées. Ensuite, des années 80 au milieu des années 90, les données in vivo furent supplantées par l'approche in vitro. C'est ce moment que furent publiés les premiers résultats des modèles ADME in silico. Et enfin, aujourd'hui, un grand nombre de données in vitro sont publiées et disponibles pour la modalisation (absorption, interactions médicamenteuses, transporteurs, pompes d'efflux, clairance intrinsèque et « brainpenetration »). (122)

A la fin des années 90, il est devenu crucial pour l'industrie de s'intéresser d'avantage à la pharmacocinétique et la toxicité des nouvelles molécules, pour diminuer le phénomène d'attrition (c'est -à -dire le pourcentage de molécules dont le développement est arrêts). Des propriétés comme la stabilité métabolique, l'inhibition des cytochromes P-450, l'absorption et la génotoxicité sont désormais des prérequis indispensables au développement d'une nouvelle molécule. L'étape suivante serait de déterminer de nouvelles données faciles d'obtenir pour construire des modèles in silico et les valider. De tels modèles permettraient de trier les molécules in silico à partir de paramètres ADME calculés.

Ainsi, les orientations de la synthèse chimique et la Discovery (ensemble des domaines de recherche précoce de l'industrie pharmaceutique) ont été révolutionnées par les méthodes *in silico* pouvant prédire la perméabilité membranaire des composés, en s'appuyant sur leur lipophile, les liaisons hydrogène, la taille de la molécule, la PSA (Polar Surface Area) et de nombreuses autres propriétés. De tels modèles peuvent réduire considérablement les étapes de synthèse, très coûteuses en temps, ainsi que les études expérimentales de nombreux composés.

Lipinski a proposé une méthode empirique pour estimer qualitativement le potentiel des nouveaux composés. Il s'agit de la « Rule of five » : les composés ayant plus de 5 sites donateurs d'hydrogène, plus de 10 sites accepteurs d'hydrogènes, dont le poids moléculaire est supérieur 500 et le *clogP* (computed logP, ou indice de partition octanol-eau calculé) supérieur à 5, sont susceptibles de montrer une faible perméabilité (112).

III.2.Principe

L'absorption intestinale humaine peut également être prédite grâce au QSPR (Quantitative Structure-Property Relationship). Un petit nombre de propriétés moléculaires et structurales (comme les éléments décrivant la lipophilie, la taille de la molécule et les liaisons hydrogènes) permettent d'établir une estimation de la perméabilité des composés étudiés (109). Mais la plupart de ces études ont été établies à partir de composés assez proches au niveau de leur structure. Cette modélisation n'est plus performante dès lors que les composés sont très différents structurellement.

Stenberg et al. (96) ont étudié l'utilité de trois modèles différents pour la prédiction de l'absorption intestinale. Il a ainsi été montré que des éléments décrivant la surface moléculaire, associés des propriétés issues de la mécanique quantique, étaient bien plus prédictifs que la simple « rule of five ». L'utilité de la PSA (polar surface area) moléculaire a été démontrée par Clark (93). En additionnant la contribution des atomes d'oxygène et d'azote, on obtient une surface qui, si elle est supérieure à 140 Å, suggère que la molécule sera faiblement absorbée. Clark a également démontré que la PSA calculée pour une seule conformation de basse énergie (la plus faible) est suffisante pour établir une relation sigmoïdale satisfaisante avec l'absorption intestinale.

La PSA a été très étudiée et a donc permis de prédire l'absorption intestinale chez l'Homme, le passage de molécules à travers la barrière hémato-encéphalique mais aussi

travers les monocouches de Caco-2. Cependant, cette théorie est limitée par le fait que les composés ne montrent parfois pas qu'un transfert passif, mais passent les membranes aussi par des transporteurs. La P-glycoprotéine, ainsi que le métabolisme de la barrière intestinale, faussent également ces estimations. Selon Van de Waterbeemd et al. (74) et Kelder et al. (57), pour une absorption optimale, les composés absorbés de manière active et transportés par voie transcellulaire ne devraient pas excéder une PSA de 120 Å et, pour une pénétration satisfaisante dans l'encéphale, la PSA devrait être inférieure à 100 Å, voire 60-70 Å.

Plus perfectionnée, la PSA_d (PSA moléculaire dynamique) est calculée à partir de toutes les conformations de basse énergie identifiées par les calculs mécaniques moléculaires dans le vide et simulés dans un milieu contenant de l'eau et du chloroforme. La PSA_d semble être plus prédictive que le coefficient de partition octanol-eau ou les temps de rétention expérimentaux obtenus par chromatographie sur liposomes immobilisés.

Wessel et al. (48) ont proposé une méthode *in silico* utilisant les propriétés structurales pour décrire l'absorption intestinale humaine des médicaments. Des paramètres descriptifs topologiques (c'est-à-dire basés sur les informations 2D du composé), électroniques (charge atomique partielle et moment dipolaire), géométriques (surface, volume, etc.) et hybrides (combinaison de la surface de la molécule et de la charge atomique partielle) ont été utilisés pour l'analyse. Il a été démontré qu'il existait une relation entre structure et absorption intestinale. L'étude s'appuie sur l'analyse de 86 composés de structures différentes et les résultats confirment l'intérêt de cette méthode pour estimer l'absorption.

Grâce à l'amélioration des choix des paramètres descriptifs, la modélisation *in silico* pourra bientôt servir de « filtre » dans le processus de la recherche précoce de candidats. Le plus grand obstacle à la réalisation de cet objectif est l'absence de banque de données assez importante dont l'information est suffisamment sûre. D'autre part, certains paramètres comme le logD ou les liaisons hydrogène dépendent de la conformation des molécules étudiées, ce qui rend caduques certaines relations déjà publiées (qui ne se sont appuyées que sur une conformation particulière). Les logiciels actuels ne sont performants que pour les molécules absorbées par voie passive. Les modèles seront vraiment puissants dès lors que les relations entre la molécule et son transporteur, ainsi que les enzymes du métabolisme seront pris en compte. Ainsi, les méthodes *in silico* ne peuvent pas être aussi fiables que les données expérimentales pour la prédiction de la perméabilité et des caractéristiques de l'absorption.

Cependant, à l'heure actuelle, plusieurs sociétés proposent des logiciels de modélisation de l'absorption.

III.6.3. Différents logiciels

- **ArQuleInc** : Camitro Corporation : logiciels de modélisation pour le métabolisme, l'absorption intestinale et la pénétration de la barrière hémato-encéphalique. Ce logiciel s'appuie sur des données d'absorption intestinale chez l'Homme concernant plus de 200 molécules absorbées par transport passif et/ou interagissant avec des transporteurs.
- **Simulation Plus Inc** : logiciel Gastro Plus permettant de calculer une fraction absorbée et de mimer une absorption per os.
- **PharmacopeiaInc a développée logiciel C2ADME**, qui modélise l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des nouvelles molécules à partir de leurs structures chimiques. Il a été développé à partir de 199 composés bien absorbés.
- **NavicyteInc** : IdeaSimulation System (in vitro Determination for the Estimation of ADME). iDEA est un modèle qui permet de prédire l'absorption orale chez l'Homme d'une nouvelle molécule à partir de sa solubilité et de sa perméabilité.
- **CHEM CAD Inc** : QikPrope est un logiciel de prédiction de propriétés physico-chimiques utilisées dans les prédictions des caractéristiques ADME. QikPrope permet de calculer rapidement 17 descripteurs physiques et en déduit 7 propriétés pharmaceutiques utilisées dans les prédictions des caractéristiques ADME (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) des molécules candidates : logP, solubilité aqueuse, perméabilité Caco-2, perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), énergies libres de solvatation dans l'eau, l'octanol et l'hexane.

Tableau 1 : tableau récapitulatif :Différentes modèles expérimentales.

Types de modèle	Modèle	Description
Physicochimique	-Coefficient de partage n-octanol/eau	Mesure la lipophilicité des médicaments, généralement entre octanol/ eau, calculée avec la méthode par agitation de flacon.
	-Membrane artificielle immobilisée (IAM).	Mesure le coefficient de partition dans une phase lipidique en utilisant une colonne HPLC.
In vitro PAMPA	-PAMPA lécithined'oeuf	PAMPA qui utilise un filtre imbibé dans une solution de lécithine d'œuf dissous dans du n-dodecane.
	-PAMPA-DOPC	PAMPA qui utilise de la DOPC dissoute dans du, n-dodecane.
	-HDM-PAMPA	PAMPA qui utilise des filtres imbibés de n-hexa décane seulement.
	-BM-PAMPA	PAMPA qui utilise un mélange de phospholipides dissous dans du 1,7-octadiène
	DS-PAMPA	PAMPA qui utilise un gradient de pH (condition double sink).
Ex vivo	-Chambre d'Ussing	Mesure le transport à travers des tissus d'intestin.
	Anneau intestinaleversé	Étudie la cinétique d'absorption dans la muqueuse intestinale
In vitro cellulaire	- Caco-2	Mesure le transport à travers une monocouche de cellules cancéreuses de colon humain.
	-HT-29	Mesure le transport à travers une monocouche de cellules polarisées productrice de mucine.
	-MDCK	Mesure le transport à travers une monocouche de cellules de rein de chien.
In silico	Gastro plus	permettant de calculer une fraction absorbée et de mimer une absorption per os.

III.7. Système de classification biopharmaceutique (BCS)

Le système de classification biopharmaceutique est adapté par la FDA en 2001, il permet de classer les composés pharmaceutiques selon leur solubilité aqueuse et leur perméabilité intestinale. C'est l'un des outils de pronostic les plus efficaces facilitant le développement. Le BCS a été proposé par G. Amidon en 1995. En combinant le BCS avec la dissolution du composé on prend en compte les deux facteurs majeurs gouvernant le taux et l'ampleur de l'absorption d'une molécule candidate : la dissolution et la perméabilité intestinale. En 2005, Wu et Benet ont ajouté le troisième facteur clé (l'effet de premier passage hépatogastro-intestinal), le système de classification est alors appelé Biopharmaceutique Drug Disposition Classification System (BDDCS). En effet, connaissant ceux-ci, on augmente les capacités de prédictions des effets de certaines variables, telles que la formulation, la nourriture et les maladies, qui altèrent l'absorption par voie orale des molécules (49)

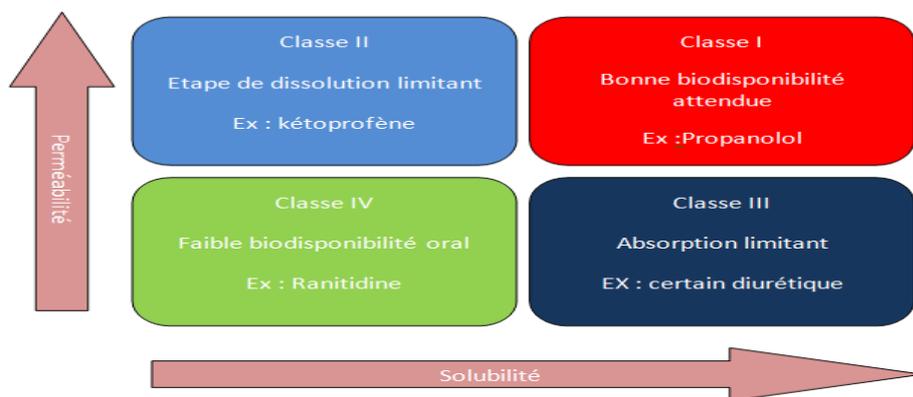


Figure 15: Système de bio classification pharmaceutique (original)

Actuellement, les composés pharmaceutiques sont regroupés selon les quatre catégories suivantes :

- **BCS classe I** : solubilité élevée, perméabilité élevée : ces composés sont très bien absorbés.
- **BCS classe II** : faible solubilité, perméabilité élevée : ces composés présentent en général une absorption dépendant du taux de dissolution.
- **BCS classe III** : solubilité élevée, faible perméabilité : ces composés présentent en général une absorption dépendant du taux de perméabilité. Pour ces composés on essaie de modifier légèrement la structure chimique.
- **BCS classe IV** : faible solubilité et faible perméabilité (**43**).

*Etude
expérimental*

I. Objectif

L'étude de la perméabilité intestinale est primordiale dans le domaine de la découverte du médicament. En effet, la solubilité et la perméabilité font partie des propriétés biopharmaceutiques qui aident à prédire la biodisponibilité d'une molécule et donc de générer un profil pharmacocinétique satisfaisant par voie orale.

Il existe plusieurs méthodes expérimentales pour l'évaluation de la perméabilité intestinale tel que les tests in vitro, in vivo, les modèles in situ et les tests physico-chimiques. 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.

L'objectif principale du présent travail est la possibilité de la détermination de la perméabilité intestinale en utilisant deux méthodes physico-chimiques : le coefficient de partage octanol/eau et la diffusion à travers une membrane artificielle. L'étude va porter sur cinq molécules de référence (facteurs d'absorption connus) : l'hydrochlorothiazide (fa : 67%), kétoprofène (100%), ranitidine, (50%) furosémide(62%) et la metformine(86%) pour vérifier la possibilité de réalisation de chaque techniques en comparant les résultats obtenus avec les facteurs d'absorption et les résultats de la littérature .

II. Matériels et méthode

II.1.Terrain de stage

Ce travail expérimental a été effectué au niveau de Laboratoire de Pharmacologie du Département de Pharmacie de l'Université Blida – 1- dans la période du 12/05 jusqu'à 01/07/2019.

II.2. Choix de méthode

Parmi les tests physico-chimiques utilisés pour l'étude de la perméabilité intestinale, il y a la mesure du logP et la diffusion à travers une membrane artificielle. Le logP est le coefficient de partage d'une molécule entre l'octanol et l'eau. Il permet donc de mesurer l'affinité d'une molécule pour un environnement lipidique. Toutefois, aucun phénomène de diffusion au travers d'une membrane n'est observé avec ce test. En revanche, la diffusion à travers une membrane artificielle est un modèle qui permet de quantifier la proportion de

médicaments ayant diffusé de manière passive au travers d'une membrane lipidique. Ces deux tests sont simples, facile à réaliser et efficace vis-avis une large gamme de soluté.

Le choix a été conditionné par la faisabilité des techniques et la disponibilité du réactif et le matériel nécessaire.

II.3.Choix des molécules

Notre étude se fait sur des substances de facteurs d'absorption différents (kétoprofène, furosémide, ranitidine, hydrochlorothiazide et la metformine) enregistrées dans la liste des molécules de références de FDA pour la validation de la perméabilité intestinale.

II.4. Matériels

II.4.1.Consommables

-Ampoule à décantation.

-Filtre cellulosique.

-Pistolet et silicone.

-Pipette pasteur.

-Tube conique.

-Fiole à jaugée.

-Micropipette.

-Eprouvette.

-Erlenmeyer.

-Seringue.

-Spatule.

-Bicher.

II.4.2.Matière première

Tableau 02 : Résumé des caractéristiques de différentes substances :

Substance	Classe	N° lot	FAB	EXP	Fa %
Hydrochlorothiazide.	Diurétique thiazidique	16HZ000380	06/2016	04/2020	67
Metformine	Antidiabétique oraux	26081208	29/05/2012	04/2017	86
Furosémide	Diurétique de l'anse	1700KBMI	02/2017	01/2022	62
Ranitidine	Antagoniste de récepteurs H2	R-016PD0514	05/2014	04/2019	50
Kétoprofène	AINS	180513	09/2017	08/2022	100

II.4.3.Réactif chimique

- n-octanol C₈H₁₈OH. (Biochem)
- Phosphate mono potassique KH₂PO₄.
- Phosphate mono sodique NaH₂PO₄
- Phosphate di sodique Na₂HPO₄.
- Hydroxyde de sodium NaOH.
- Emulsion de jaunes d'œufs.
- Chlorure de sodum NaCl.
- Ether de pétrole.
- Ethanol 95.
- Eau distillé.

II.4.4.Appareillages

Balance (KERN)

Spectrophotomètre (JENWAY)

pH mètre (AOWA)

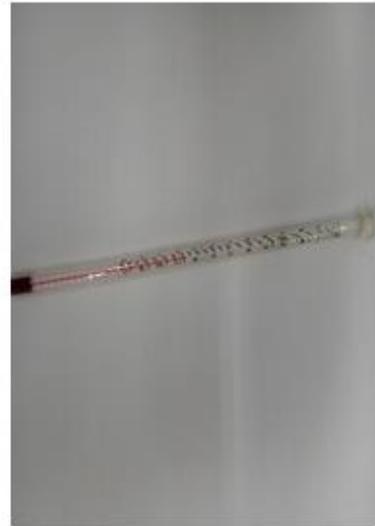
Bain marré (Rapa)



-Balance



-Ph mètre



-Thermomètre



-Ultrason



- Bain marée

Figure 16 : Les différents appareils utilisés

II.5. Méthode expérimentale

II.5.1. Coefficient de partage octanol/eau

II.5.1.1. Principe

Cette méthode est basée sur le calcul des concentrations des substances d'intérêt dans la solution aqueuse et le solvant organique n-octanol à l'équilibre. Ce qui va aboutir à la détermination de coefficient de partage.

II.5.1.2. Protocole

On dissout dans 50ml d'eau distillé une quantité exactement connue de soluté, après la solubilisation totale, on prend 25 ml de la solution mère et on la met dans une ampoule à décantation. On ajoute 25 ml d'octanol. On agite pendant 20min et on la laisse à décanter d'où moins 24h à température de 25C° pour que les phases se séparent. Une fois que le système biphasique est à l'équilibre (**Figure 20**). A l'aide d'une pipette pasteur on prélève une petite quantité de chaque phase, la concentration des substances étudiées dans la phase aqueuse est alors déterminée par un dosage spectrophotométrie UV-Visible.



Figure 17 : Mélange des deux phases octanol/eau.



Figure 19: Après agitation des deux phases



Figure 20 : Après l'équilibre et la séparation des deux phases

II.5.1.3. Préparation des solutions aqueuses contenant les substances étudiées

La concentration étudiée correspond au dosage le plus élevé présent sur le marché dans un volume standard d'un verre d'eau de 250ml.

Dose max \longrightarrow 250ml

m \longrightarrow 100ml

$$m = \text{dose max} * 100 / 250.$$

Tableau 3 : La dose maximale et la masse nécessaire pour chaque substance.

Substance	Dose maximale (mg)	m(100ml)
Hydrochlorothiazide	25	10
Métformine	1000	800
Kétoprofène	200	80
Furosémide	80	32
Ranitidine	150	60

On prépare celle de l'hydrochlorthiazide et on complète les autres de la même manière comme montrer le tableau 04.

On pèse environ 13,3 mg de l'hydrochlorthiazide puis on la dissoudre dans une fiole de 100 ml d'eau distillé pour obtenir une solution mère de 0,134mg/ml.

On prépare une deuxième solution avec la même quantité de l'hydrochlorothiazide qui va servir pour la préparation de standard.

Tableau 4 : les prises d'essais et les concentrations de chaque substances pour la méthode de coefficient de partage octanol/eau.

Substances	Prise d'essai(mg)	C(mg /ml)
Hydrochlorothiazide	13 ,4	0.134
Metformine	400	4
Ketoprofene	40.2	0.402
Furosémide	32	0.32
Ranitidine	60.9	0.609

II.5.2.Diffusion à travers une membrane artificielle

II.5.2.1.Principe

Le principe de cette méthode est le passage d'une substance de compartiment donneur vers un compartiment receveur à travers un filtre hydrophile imbibé dans une émulsion de jaune d'œuf (hydrophobe).

II.5.2.2.Préparation de dispositif

On a préparé notre dispositif à partir d'un matériel de base en utilisant deux tubes coniques (dans ce cas ils sont les compartiments donneur et accepteur pour le travail) coulés entre eux par un filtre hydrophile imbibé dans l'émulsion de jaune d'œuf de manière à simuler à celle de la membrane lipidique .**figure 18**



Figure 18 : Dispositif de la membrane artificielle.

✓ **Préparation d'émulsion de jaune d'œuf pour l'imbibition du filtre**

On a utilisé des œufs frais de poule, à coquille intacte, bien nettoyés à l'aide d'un détergent liquide puis rincer à l'eau courante et on les plongés dans l'alcool 95° pendant 30s. Laisser à sécher, ensuite on sépare les jaunes d'œufs et les placer dans une éprouvette et on ajoute quatre volume d'eau, on met le mélange dans un flacon et mélanger rigoureusement.

Porter le mélange au bain d'eau réglé entre 44 C° et 47 C °pendant 2heures et entreposer à 5° pendant 18 à 24 heures pour permettre au précipité de se former.

On imbibe le filtre dans le surnageant pendant 15h et on le laisse à sécher.

II.5.2.3. Préparation des solutions tampons

➤ **Tampon pH 6,5 :**

Dans une fiole de 1000 ml, la solution tampon consiste en 13,8g de NaH_2PO_4 , 900 ml d'eau distillé. A l'aide d'un pH mètre, le pH de la solution est vérifié et ajusté au pH 6.5 avec le NaOH 400g /l. Le Ph final est vérifié à l'aide d'un ph mètre à 6.5 +/-0.05 ajusté si nécessaire.



Figure 21 : Préparation d'un tampon ph6.5

➤ **Tampon pH 7,4**

Dans une fiole de 1000ml, la solution consiste en 6,4g de Na_2HPO_4 ; 0,6g KH_2PO_4 ; 5, 85 NaCL .On mélange le tout et on complète avec de l'eau distillé

II.5.2.4.Préparation des solutions mères et des standards

On pèse 20,4 mg de l'hydrochlorothiazide puis on la dissoudre dans une fiole de 200ml de solution tampon de ph 6.5 pour obtenir une solution mère de 0.102.

Le standard est préparé de la même manière et même concentration de la solution mère.

Tableau 5 : Les prises d'essais pour la méthode de diffusion à travers une membrane artificielle.

Substance	Prise d'essai (mg)	C (g /L)
Hydrochlorothéazide	26.6	0.133
Metformine	800	4
Kétoprofène	80	0 ,4
Furosémide	62	0,32

II.5.2.5. Protocol expérimental

On remplit les deux compartiments de dispositif par les solutions tampons dont le premier compartiment contient un tampon de pH 7,4 qui correspond au milieu séreux et le deuxième compartiment contient un tampon de pH 6,5 qui correspond au milieu muqueux et la substance à étudier. Après 24h on prend des prélèvements de chaque compartiment pour faire le dosage spectrophotométrique.

III. Résultat et interprétation

III.1. Dosage spectrophotométrique des substances étudiées

III.1.1. coefficient de partage octanol/eau

III.1.1.1. Détermination des absorbances

La détermination des absorbances se fait par spectrophotométrie UV-Visible (méthode pharmacopée)

➤ **Détermination des absorbances des solutions mères**

Tableau 6 : Les absorbances des solutions mères (M1)

Substance	Absorbance	Longueur d'onde (nm)
Hydrochlorothiazide	0.148	273
Kétoprofène	1.081	255
Furosémide	0.533	270
Ranitidine	0.670	230
Metformine	0.005	380

Les absorbances obtenues de : hydrochlorothiazide(0.148), kétoprofène(0,18), furosémide (0.533)Ranitidine(**0.670**) sont interprétables sauf celle de la metformine qui n'est pas détectable par spectrophotométrie UV.

➤ **Détermination des absorbances des substances dans les solutions aqueuses après l'incubation.**

On a préparé deux échantillons pour chaque substance, les lectures spectrophotométriques sont vérifiées trois fois et on a enregistré la moyenne, comme montre le **tableau 7**.

Tableau 7 : Les absorbances des substances dans les solutions aqueuses.

Substance	Absorbance /100ml			Absorbances des standards
	Saq1	Saq2	Moyenne	
Hydrochlorothiazide	0,091	0.098	0.0945	0.134
Kétoprofène	0.575	0.575	0.575	1.074
Furosémide	0.428	0.457	0.442	0.53
Ranitidine	0.540	0.512	0.526	0.61

III.1.1.2. Détermination des concentrations des substances

- Les concentrations des substances dans les solutions aqueuses après le partage sont calculées par la règle de trois

$$0.133\text{g/l} \longrightarrow 0.148$$

$$X \longrightarrow 0.0945$$

$$X = 0.133 * 0.0945 / 0.148$$

$$X = 0.084\text{g/l}$$

- Les concentrations dans l'octanol sont calculées par soustraction : $C_{\text{oct}} = C_0 - C(\text{Saq})$

C_{oct} : Concentration de la substance dans l'octanol.

C₀ : Concentration initial de la substance.

C(Saq) : concentration de la substance dans la solution aqueuse après le partage.

Les résultats des concentrations de chaque molécule dans les deux phases (Octanol / Eau) sont présentés dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Concentrations des substances dans Les deux phases

Substance	C (Saq) mg/ml	C (oct) mg/ml
Hydrochlorothiazide	0.844	0.485
Kétoprofène	0.425	0.375
Furosémide	0.265	0.055
Ranitidine	0.478	0.13

On observe que La concentration des substances dans la solution aqueuse est supérieure à celle de l'octanol.

III.1.1.3.Détermination de coefficient de partage (P)

Le calcul de coefficient de partage se fait par l'équation suivante : $P = C_{oct}/C_{aq}$

Tableau 9: Les valeurs de Log P.

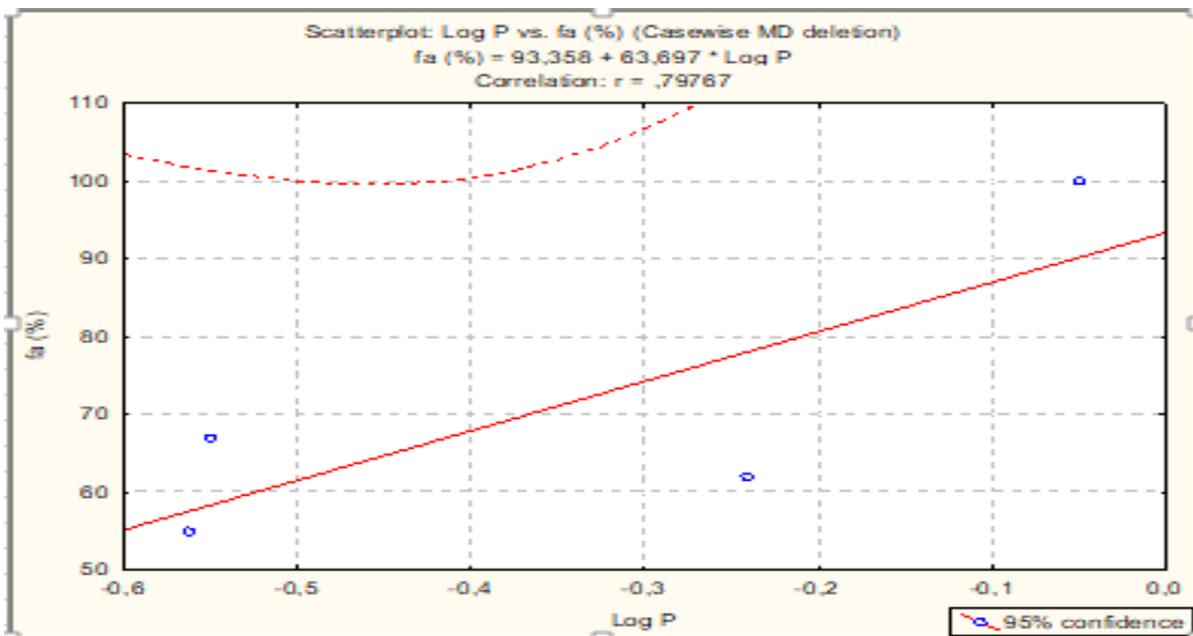
Substance	P (coefficient de partage)	LogP
Hydrochlorthiazide	0.574	-0.241
Kétoprofène	0.88	-0.05
Ranitidine	0.27	-0.563
Furosémide	0.28	-0.55

Selon les coefficients de partages calculés, la lipophile augmente dans l'ordre suivant : ranitidine, furosémide, Htdrochlorthiazideet ketoprefène.

Tableau 10 : LogP expérimental et les facteurs d'absorption des substances étudiées :

Substance	F%	Log expérimental
Hydrochlorthiazide	62	-0.241
Furosémide	67	-0.55
Ranitidine	55	-0.563
Ketoprofène	100	-0.05

On observe une relation proportionnelle entre les LogP expérimentaux et les facteurs d'absorptions.



Courbe 1 : Les Log p en fonction des facteurs d'absorption.

III.2.Méthode de diffusion à travers une membrane artificielle(M2)

III.2.1.Détermination des absorbances

➤ **Les absorbances des solutions standards**

On a préparé deux échantillons pour chaque substances et calculer la moyenne des DO déterminés par spectrophotométrie UV-Visible comme montré le **tableau 11**.

Tableau 11 : Les absorbances de chaque substance et ses longueurs d'ondes.

Substance	Absorbance Ph 6.5	Longueur d'onde (nm)
Hydrochlorothiazide	0.152	273
Kétoprofène	1,081	255
Furosémide	0.397	270
Metformine	0.005	380

➤ **Les absorbances des solutions après i dans les deux compartiments :**

Tableau 12 : Les absorbances des substances dans les deux compartiments après 24 h

substances	Milieu pH6.5			Milieu PH7.4		
	Echantillon1	Echantillon2	moyenne	Echantillon1	Echantillon2	moyenne
Hydrochlorothiazide	0.080	0.086	0.083	0.065	0.066	0.065
kétoprofène	0.062	0.063	0.062	0.35	0.37	0.36
furosémide	0.27	0.026	0.026	0.16	0.159	0.15

III.2.2.Détermination des concentrations

Le calcul des concentrations des substances après le passage dans les deux compartiments se fait par la règle de trois et regroupé dans le tableau

$$\begin{array}{ccc}
 0.133 & \longrightarrow & 0.152 \\
 x & \longrightarrow & 0.073 \\
 & & X=0.133*0.073/0.152 \\
 & & =0.073
 \end{array}$$

Tableau 13 : Les concentrations des substances dans les deux milieux.

Substance	C standard (g/l)	C Ph6.5	C Ph7.4
Hydrochlorothiazide	0.133	0.073	0.059
Kétoprofene	0.4	0.23	0.13
Furosémide	0.32	0.21	0.12

Selon les résultats obtenus on observe qu'il y a un passage des substances de compartiment Ph 6.5 vers le compartiment Ph7.4 à travers le filtre.

III.2.3.Détermination de la perméabilité

La perméabilité apparente est calculée par l'équation de Zhu's(2002) (108)

$$P_{app} = \frac{V_D \times V_A}{(V_D + V_A) \times A \times t} \times \ln \left[\frac{100 \times V_A}{100 \times V_D - \%T(V_D + V_A)} \right]$$

V(D) : volume de compartiment donneur

V(A) : volume de compartiment accepteur

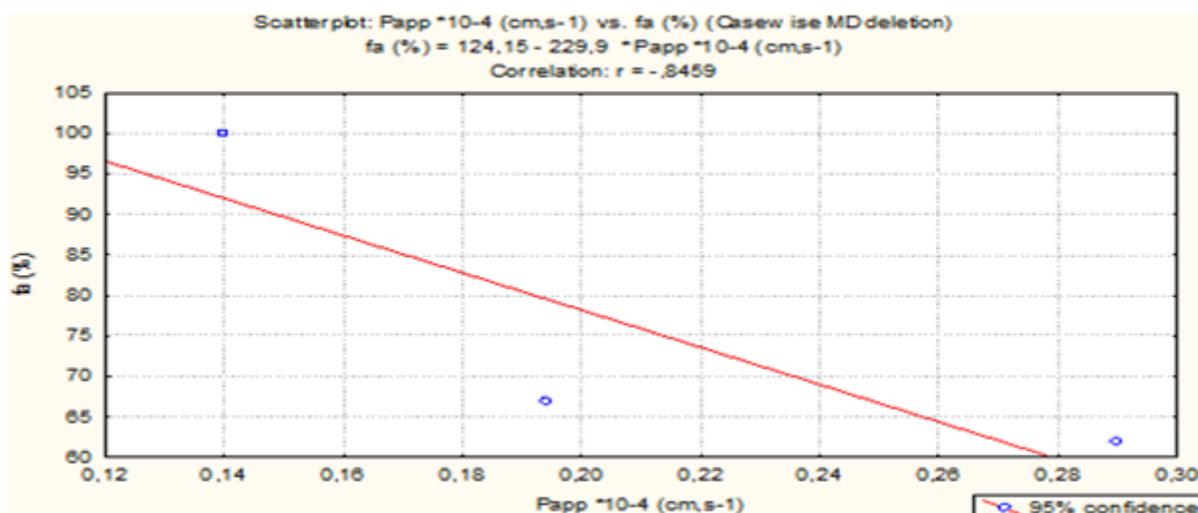
T : temps d'incubation

T% : pourcentage de partage $T\% = 100 * C(A)/C(D)$

Tableau 14 : Les valeurs de la perméabilité apparente pour chaque substance et leurs facteurs d'absorption.

Substance	Papp 10 ⁻⁴ (cm/s)	fa%
Hydrochlorothiazide	0.29	62
Furosémide	0.194	67
Kétoprofene	0.14	100

Les valeurs de Papp de hydrochlorothiazide, furosémide et kétoprofène sont inversement proportionnelles avec leurs facteurs d'absorption.



Courbe 02 : courbe de la perméabilité apparente en fonction de facteur d'absorption.

IV. Discussion :

Les méthodes utilisées pour l'évaluation de la perméabilité intestinale de **l'hydrochlorothiazid, furosémide, ranitidine, metformine et kétoprofène** sont le coefficient de partage n-octanol/eau et la diffusion à travers une membrane artificielle. Les concentrations à l'équilibre sont déterminées à l'aide d'une méthode spectrophotométrique.

Dans la présente étude les valeurs de coefficient de partage octanol/eau et la perméabilité apparente des substances étudiées sont citées ci-dessous en les comparant avec les valeurs de la littérature

➤ **Coefficient de partage octanol/eau**

Tableau 15 : logP expérimental et logP de littérature

Substance	LogP expérimental	LogP de la littérature (C. <i>Zhu et al</i>)	Références
Hydrochlorthiazide	-0.241	-0.07	123
Furosémide	-0.55	2.29	123
Ranitidine	-0.563	0.27	123
Ketoprofène	-0.05	3.12	123

➤ Diffusion à travers une membrane artificielle

Tableau 16 : La Papp et P eff.

Substances	P pppcm. s ⁻¹ , x10 ^{*4} -	P effcm s ⁻¹ , x10 ^{*-4}	Référence
Hydrochlorthiazide	0.29	0.07	123
Furosémide	0.194	0.08	123
Ketoprofene	0.14	3.02	123

Les résultats obtenus par notre travail ne concordent pas avec les résultats de la littérature. Cette différence peut également être due aux facteurs suivants :

- **La stabilité**

La quantification des échantillons étant effectuée par une méthode de spectrophotométrie UV cette dernière ne permet pas de détecter une éventuelle dégradation des molécules étudiées dans les différents milieux. sachant que la durée d'incubation est de 24 heures sur laquelle s'est rajouté une contrainte liée à la non disponibilité d'une cuve en quartz au niveau de laboratoire lieu de l'étude (cette dernière a été acquise avec un délai de quelques jours).

L'idéal dans ces conditions c'est de réaliser un dosage par chromatographie liquide à haute performance HPLC.

- **Solubilité :**

Les substances étudiées appartient à la classe IV (furosémide et hydrochlorothiazide) et la classe II (kétoprofène) du ce fait l'utilisation des catalyseurs est essentiel dans le milieu 6.5 à une concentration qui ne dépasse pas 5% pour qu'il ne solubilise pas les phospholipides de filtre utilisé.

- **Nombre de molécules étudiées**

Idéalement, le nombre minimal de molécules nécessaires pour établir une corrélation est de 6 molécules. Ce nombre n'a pas être atteint dans notre étude en raison de la non disponibilité de molécules de référence à notre niveau et la quantité restreinte de réactif (octanol) en notre disposition.

- **Dosage dans l'octanol**

Le calcul de coefficient de partage est basé sur des concentrations de molécules dans l'octanol calculés par soustraction en raison de quantité limitée d'octanol à notre disposition et que ne permettait pas de préparer un standard et de faire des dilutions.

En effet, l'idéal est de doser la molécule directement dans les deux phases.

- **Pertinence des molécules**

Selon **Kiyohiko Sugano et al (2002)** l'hydrochlorothiazide et le furosémide sont des molécules qui ne répondent pas à un modèle prédictible par les méthodes de membrane artificielles. Ce qui pourra justifier les résultats obtenus dans notre étude.

- **Choix des concentrations**

Lors de la réalisation de l'étude il a été observé avec certaines molécules que la concentration initiale choisie pourrait saturer le milieu et atteindre les conditions de sink. Il aurait été plus judicieux de choisir des concentrations plus faibles.

- Selon **Stefanie D. Krämer 1999** les valeur de LogP peuvent être différent et de ce fait ils ne peuvent pas servir de base de comparaison.

Le plus juste c'est de prendre en considération les résultats d'étude de corrélation globale qui prennent en considération un certain nombre de molécules de référence.

- Notre étude a été réalisée en utilisant un matériel et moyens basiques qu'on a essayé d'adapter pour simuler des conditions d'expériences d'études utilisant des moyens plus appropriés. Afin d'obtenir des résultats plus fiables, il est nécessaire de travailler avec des moyens et conditions similaires :

-Utiliser un dispositif plus adapté

-Utilisé des filtres de meilleur qualité ou de nature plus adéquat (PVDF, hydrophobe)

Conclusion

L'étude de la perméabilité intestinale permettent de connaître le comportement d'un candidat médicament avant les essais chez l'homme .les expérimentations sont essentiellement menées sur l'animal.

Notre travail a porté sur la détermination de la corrélation entre le coefficient de partage octanol/eau et la perméabilité apparente et le facteur d'absorption chez l'homme en utilisant des moyens basiques à notre disposition. En testant certaines molécules de référence qui sont : l'hydrochlorothiazide, furosémide, kétoprofène, ranitidine et metformine

Pour la première méthode on remarque que il y a une corrélation entre Log P le facteur d'absorption, par contre il n'est pas de corrélation pour la deuxième méthode.

Il est possible de réaliser ces techniques et dans une perspective d'améliorer les résultats obtenus dans les prochaines études, il serait intéressant de :

- ✓ Augmenter le nombre des échantillons
- ✓ Evaluer d'autres molécules de référence ayant des profils d'absorption différents (faible, moyenne et forte perméabilité).
- ✓ Changer la méthode de dosage .
- ✓ Améliorer les conditions de laboratoire.

Les résultats obtenus permettront de faciliter la progression du travail pour l'élaboration des nouveaux modèles de perméabilité in vitro par l'optimisation de filtre et l'amélioration des conditions de travaille.

Nous espérons que nos efforts servent de début pour d'autres travaux futur qui viseront à compléter et continuer ce qu'on a entrepris et qu'on aimerait bien voir aboutir.

Annexe



n-octanol



Na₂HPO₄



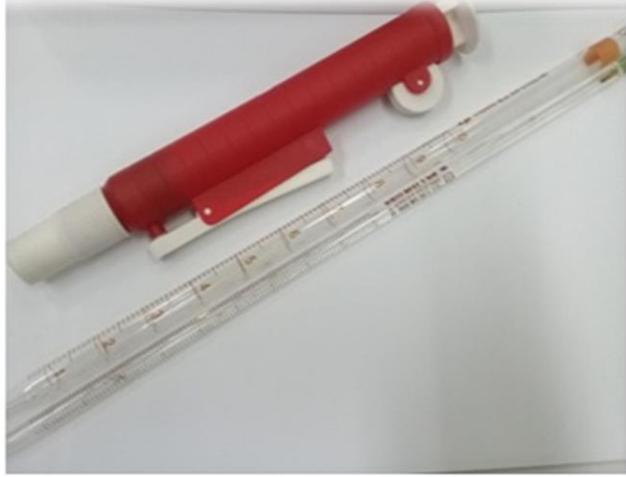
NaH₂PO₄



Eau distillé



Micropipette



Pipete pasteur.

Partie bibliographique

1. Joël Ankri Julie Pelicand , Petite histoire du médicament adsp n° 27 juin 1999.
2. A. Gouraud ,. Généralités sur la pharmacologie et les médicament . (partie 1), le 21 septembre 2012.
3. Article 208 du chapitre 2 du titre V(produit pharmaceutiques et dispositifs médicamenteux) de la nouvelle loi de santé 2018.
4. Pifferi Giorgio, Restani Patrizia. The safety of pharmaceutical excipients, 2003.
5. Le Hir A, Pharmacie galénique, bonne pratique de fabrication des médicaments 8ème Edition Masson, Paris. 2001.
6. Danguonmau ; Nicholas Moore ; Mathieu Molimard, Annie Fourier-Reglat ; Karin Latry ; Françoise Haramburu ; Ghada Miremont-Salame ; Karine Titier .Pharmacologie Générale. Edition 2006.
7. Marc Talbert et Gérard Willoquet, , Guide pharmaco ,2001.
8. Paul M. Tulkens, Dr Méd., Lic pharmacologie générale. Sc. Méd., Agr. Ens. Sup. 2012.
9. Michael J .Neal : pharmacologie médicale. 6ème édition, 2017.
10. Philippe Lechat, pharmacologie ,2006.
11. thierry F. vandamme Yveline rival, Jean Yves Pabst, Christiene Heitz. initiation à la connaissance du médicament. 2014.
12. Michel Bourine , Bascale Jollet pharmacologie générale et pratique 3ème édition ,1999.
13. Article n 387 du 31/06/2006 relative au essai clinique .
14. jean-philippe chippaux. pratique des essais clinique en afrique .2004.
15. procédure de délivrance d'une autorisation d'exploitation d'un établissement de production de produit pharmaceutique. WWW.santé .gov.dz.
16. Décret exécutif n°92-284 du 6 juillet 1992 relatif à l'enregistrement des produits pharmaceutiques à usage de la médecine humaine. algérie 1992.
17. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. Nat Rev Immunol. 2014.

18. Viswanathan VK, Hodges K, Hecht G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nat Rev Micro*. 2009.
19. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014.
20. .Science Kids .Human body images .2013 ,available from [http/www.ScienceKids.co.nz/pictures/humanbody/gastrointestinaltract.html](http://www.ScienceKids.co.nz/pictures/humanbody/gastrointestinaltract.html).
21. Nicole Menche, *Anatomie physiologie biologie*, 2006.
22. Stipanuk MH, Digestion and absorption of macronutrients. In: Stipanuk MH (Ed) *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. WBSaunders Company, Philadelphia, 2000.
23. Andreu et al, *Intestinal stem cells :dangerous connections* ,2006
24. Barker et al, (barker N, van de Wetering M ,Clevers H(2008). *The intestinal stem cell*. *genes Dev*, 2008.
25. Van der Flier LG ,Clevers H(2009) *Stem cell, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium*. *Annu Rev Physiol*, 2009.
26. Altmann, G.G. and M. Enesco, *Cell number as a measure of distribution and renewal of epithelial cells in the small intestine of growing and adult rats*. *Am J Anat*, 1967.
27. Cheng, K.J., R.P. McCowan, and J.W. Costerton, *Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function*. *Am J Clin Nutr*, 1979.
28. Nelson, W.J., *Cell biology: A cellular choreographer*. *Nature*, 2004.
29. Kraehenbuhl, J.P., et al., *Antigen sampling by epithelial tissues: implication for vaccine design*. *Behring Inst Mitt*, 1997.
30. Cheng, H. and C.P. Leblond, *Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types*. *Am J Anat*, 1974.
31. Cummings, D.E. and J. Overduin, *Gastrointestinal regulation of food intake*. *J Clin Invest*, 2007.
32. Engelstoft, M.S., et al., *A gut feeling for obesity : 7TM sensors on enteroendocrine cells*. *Cell Metab*, 2008.

33. Akiba, Y. and J.D. Kaunitz, *Duodenal chemosensing and mucosal defenses*. Digestion, 2011.
34. Bry, L., et al., *Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 9.
35. Clevers, H., *The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment*. Cell, 2013.
36. Erlandsen, S.L., J.A. Parsons, and T.D. Taylor, *Ultrastructural immunocytochemical localization of lysozyme in the Paneth cells of man*. J Histochem Cytochem, 1974.
37. Stappenbeck, T.S., *Paneth cell development, differentiation, and function: new molecular cues*. Gastroenterology, 2009.
38. Anderson RC, Dalziel JE, Gopal PK, Bassett S, Ellis A et al, *the role of intestinal barrier function in early life in the development of colitis*. 2012.
39. Kaminsky, L.S. and Q.Y. Zhang, *The small intestine as a xenobiotic metabolizing organ*. Drug Metab Dispos, 2003.
40. Wachter, V.J., L. Salphati, and L.Z. Benet, *Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption*. Adv Drug Deliv Rev, 2001.
41. Kolars, J.C., et al., *CYP3A gene expression in human gut epithelium*. Pharmacogenetics, 1994.
42. Ouellette, A.J. and C.L. Bevins, *Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel*. Inflamm Bowel Dis, 2001].
43. *US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Guidance for industry : waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system*. (2000).
44. Barthe, L., J. Woodley, and G. Houin, *Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies*. Fundam Clin Pharmacol, 1999.
45. Derrien, M., et al., *Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract*. Gut Microbes, 2010.
46. Volpe, D. *Transporter assays as useful in vitro tools in drug discovery and development expert opinion on drug discovery*, 2016
47. Nigam SK. *What do drug transporters really do ?*, 2015.

- 48** .Wessel M., Jurs P., Tolan J., Muskal S. Prediction of human intestinal absorption of drug compounds from molecular structure. (1998)
- 49**.Chen X, Antman MD, Gesenberg C & Gudmundsson OS. Discovery pharmaceuticals challenges and opportunities. (2006).
- 50**.Sharom FJ. Shedding light on drug transport: structure and function of the pglycoprotein multidrug transporter (abcb1). (2006)
- 51**.Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K & Varadi A. Abcg2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett*(2004)
- 52** .Dietrich CG, Geier A & Oude Elferink RPJ. Abc of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* (2003).
- 53**.Sala-Rabanal M, Loo DDF, Hirayama BA, Turk E & Wright EM. Molecular interactions between dipeptides, drugs and the human intestinal h⁺ -oligopeptide cotransporter hpept1. *J Physiol*(2006) .
- 54** .Foltz M, Meyer A, Theis S, Demuth H & Daniel H. A rapid in vitro screening for delivery of peptide-derived peptidase inhibitors as potential drug candidates via epithelial peptide transporters. (2004).
- 55**.Thwaites et Anderson, micro nutrient and drug transporter in the mammalian small intestine , 2007.
- 56**. Abbot EL, Grenade DS, Kennedy DJ, Gatfield KM & Thwaites DT. Vigabatrin transport across the human intestinal epithelial (caco-2) brush-border membrane is via the h⁺ -coupled amino-acid transporter hpat1. (2006) .
- 57** .Kelder J., Grootenhuys P.D., Bayada D.M., Delbressine L.P., Ploemen J.P. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. (1999)
- 58**..Katsura T & Inui K. Intestinal absorption of drugs mediated by drug transporters: mechanisms and regulation. *Drug Metab Pharmacokinet*(2003) vol**18**: p.1-15.
- 59**.Jonker JW & Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: oct1, 2, and 3 (slc22a1-3). (2004) .
- 60** .evolution of mammals and their gut microbes ley et al 2008
- 61**.Fraher et al, technique used to characterize the gut microbiota, 2012
- 62**.Arumugame et al, enterotypes of the human gut microbiote 2011 ,

- 63.**Thakker DR. Strategic Use of Preclinical Pharmacokinetic Studies and In Vitro Models in Optimizing ADME Properties of Lead Compounds In: Optimizing the “Drug-Like” Properties of Leads in Drug Discovery [Internet]. New York, NY: SpringerBiotechnology, 2006.
- 64 .**Pierre Allain. pharmacologie, les médicaments. Troisième édition.
- 65.**Shargel, L., & Yu, A. (1999). Applied biopharmaceutics&pharmacokinetics(4th ed.).Stamford, CT: Appleton & Lange
- 66 .**Dobson, P. D., &Kell, D. B. (2008). Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule?Nature Reviews Drug Discovery, 7(3), 205e220
- 67.**Sugano, K., Kansy, M., Artursson, P., Avdeef, A., Bendels, S., Di, L., et al. (2010). Coexistenceof passive and carrier-mediated processes in drug transport. Nature Reviews Drug Discovery,
- 68.**BrunoSarmiento. Concepts and Models for Drug Permeability Studies.
- 69.**JohannaKanzera et Al , In-vitro permeability screening of melt extrudate formulations containing poorly water-soluble drug compounds using the phospholipid vesicle-based barrier . Journal of Pharmacy and Pharmacology 2010; 62: 1591–1598.
- 70 .**Dossou-Yovo. Thèse sur la Modification de la biodisponibilité orale des médicaments : interactions “ Herb-Drugs ” “ DrugsDrugs”. Médecine humaine et pathologie. 2014.Kaus LC,
- 71.**Kaus LC, Gillespie WR, Hussain AS, Amidon GL. The effect of in vivo dissolution, gastric emptying rate, and intestinal transit time on the peak concentration and area under the curve of drugs with different gastrointestinal permeabilities. Pharm. Res 1999; 16 (2): 272-280.
- 72.**Schall R, Luus HG. Comparison of absorption rates in bioequivalence studies of immediate release drug formulations. Int J ClinPharmacolTherToxicol 1992; 30(5): 153-159
- 73.**Borst SI, Lockwood CH. Plasma level studies on different brands of sodium diphenylhydantoin (DPH) and primidone. Int J ClinPharmacolBiopharm 1975.

- 74.** Van de Waterbeemd H., Camenisch G., Folkers G., Chretien J.R., Raevsky O.A. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors(1998)
- 75 :**Praveen V; Balimane and Saeho Chong ,Richard A . Morisson,Current methodologies used for evaluation of intestinal perméability and absorption ,2000.
- 76 .**thomasL . Lemke /David A. Williams victoria F. Roche /s; William zito , foyer's principales of medicinal chemistry , 7 èmeédition .
- 77.** A. Noubigha,* , M. Abderrabbaa and E. Provostb, Salt Addition Effect on Partition Coefficient of Some Phenolic Compounds Constituents of Olive Mill Wastewater in 1-Octanol-Water System at 298.15 K , *Received 24 January 2008, Accepted 2 May 2008*)
- 78 .** Journal officiel de l'Union europeenne, COEFFICIENT DE PARTAGE (N-OCTANOL/EAU), MÉTHODE HPLC (CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE , 1.3.2016.
- 79.**Ashford M. Assessment of biopharmaceutical properties, in Aulton's Pharmaceutics: The design and manufacture of medicines, M.E. Aulton, Editor 2007.
- 80.**Dressman, J., Amidon, G., & Fleisher, D. (1985). Absorption potential:estimating the fraction absorbed for orally administered compounds.Journal of Pharmaceutical Science, 1985.
- 81 .**Kwatra D, Mitra AK, Khurana V.In vitro models in drug discovery and delivery. In: Mitra AK, Kwatra D, Vadlapudi AD, editors. Drug Delivery. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning; 2014.
- 82 .**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.
- 83.**Deferme S, Annaert P, Augustijns P. In Vitro Screening Models to Assess Intestinal Drug Absorption and Metabolism. 2008. In: Drug Absorption Studies Biotechnology: Pharmaceutical Aspects [Internet]. Boston, MA: SpringerBiotechnology: Pharmaceutical Aspects.2008.

- 84.** Sugano K. 5.19 - Artificial Membrane Technologies to Assess Transfer and Permeation of Drugs in Drug Discovery A2 - Taylor, John B. In: Triggler DJ, editor. Comprehensive Medicinal Chemistry II. Oxford: Elsevier; 2007.
- 85 :** Faller, B., Artificial Membrane Assays to Assess Permeability. *Current Drug Metabolism*, 2008.
- 86.** Avdeef, A., Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state. 2003.
- 87 .**Ruell, J.A., K.L. Tsinman, and A. Avdeef, PAMPA—a drug absorption in vitro model: 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and pKaflux—optimized design (pOD-PAMPA). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003.
- 88.**Lenhert, S., et al., Massively parallel dip-pen nanolithography of heterogeneous supported phospholipid multilayer patterns. 2007.
- 89.** Wohnsland, F. and B. Faller, High-throughput permeability pH profile and highthroughput alkane/water log P with artificial membranes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2001. 44(6): p. 923-930.
- 90.** Faller, B. and F. Wohnsland, Physicochemical parameters as tools in drug discovery and lead optimization, in *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*, H.v.d.W. Bernard Testa, Gerd Folkers, Richard Guy, Editor 2001, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich and Wiley. p. 257-274
- 91.**Sugano, K., et al., Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001. 228(1–2): p. 181-188.
- 92.**Avdeef, A. and O. Tsinman, PAMPA—A drug absorption in vitro model: 13. Chemical selectivity due to membrane hydrogen bonding: In combo comparisons of HDM-, DOPC-, and DS-PAMPA models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006.

28(1–2): p. 43-50.

- 93.** Clark D. Rapid calculation of the polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. (1999)
- 94.** Brown, DR, O'Grady, SM The Ussing chamber and measurement of drug actions on mucosal ion transport. *CurrProtocPharmacol*(2008)
- 95.** He, LQ, Yin, YL, Li, TJ, Huang, R, Xie, M, Wu, Z, & Wu, G (2013) Use of the Ussing chamber technique to study nutrient transport by epithelial *Front Biosci***18**: 1266-1274.(ne pas telecharger)
- 96.** Stenberg P., Luthman K., Ellens H., Lee C.P., Smitn P.L., Lago A. et al. Prediction of the intestinal absorption of endothelin receptors antagonists using three theoretical methods of increasing complexity. (1999)
- 97.** Clarke, L. L. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, (2009).
- 98.** Antunes, F., Andrade, F., Ferreira, D., Nielsen, H. M., & Sarmiento, B. Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. *Current Drug Metabolism*(2013).
- 99.** Buckley, S. T., Fischer, S. M., Fricker, G., & Brandl, M. In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: challenges and perspectives. (2012).
- 100.** Grass, G., & Sweetana, S. A correlation for permeabilities of passively transported compounds in monkey and rabbit jejunum. (1989)
- 101.** Wilson T, Wiseman G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol* 1954;
- 102.** Yamamoto A, Kawaratani T, Kawashima K, et al. Intestinal transport of sulfanilic acid in rats immunized with protein-sulfanilic acid conjugate. *Pharm Res* 1990.
- 103.** Hashimoto K, Shimizu M. Epithelial properties of human intestinal Caco-2 cells cultured in a serum-free medium. *Cytotechnology*. 1993.
- 104.** Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.. 1991
- 105.** Ren S, Lien EJ. Caco-2 cell permeability vs human gastro-intestinal absorption: QSPR analysis.. 2000.

- 106.** Lennernäs H. Human intestinal permeability. 1998 .
- 107.** Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, et al. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening.. 1999
- 108.** Franz J. Hock, jochen Maas ,Dieter Mayer ,Co-Editors; Drug discovery and evaluation :Safety and pharmacokinetic Assays
- 109.** Stewart B.H., Chan O.H., Lu R.H., Reyner E.L., Schmid H.L., Hamilton H.W. et al. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models : relationship to absorption in humans. (1995)
- 110.** Ku, M.S., *Use of the biopharmaceutical classification system in early drug development.* The AAPS Journal, 2008.
- 111.** Anna-Lena Ungell, J.K., *Cell cultures in drug discovery: An industrial perspective*, in *Drug bioavailability: Estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability*, H.L. Han van de Waterbeemd, Per Artursson, Editor 2003. p. 90-131.
- 112.** Lipinsky T., Lombardo F., Dominy B., Feeney P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. (1997)
- 113.** Cox Gad Shayne; PH.D; D.A.B.T. *Preclinical Development Handbook: ADME and Biopharmaceutical Properties.* 2008.
- 114.** Kwangjinkim drug absorption studies in situ in vitro and in silico model 2001
- 115.** Tavelin, milovic ,ocklindolsson&artursson . A conditionally immortalized epithelial cell line for studies of intestinal drug transporter .(1999)
- 116.** Thorens, B., *Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes.*, 1996.
- 117.** Wei Liu , Hao Pan ..., *Developments in Methods for Measuring the Intestinal Absorption of Nanoparticle-Bound Drugs*, 2016.
- 118.** Curran, P.F.; Solomon, A.K. Ion and water fluxes in the ileum of rats. *J. Gen. Physiol.* 1957 .
- 119.** Zakeri-Milani, P.; Valizadeh, H.; Tajerzadeh, H.; Islambulchilar, Z. The utility of rat jejunal permeability for biopharmaceutics classification system. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**.

120. Gamboa, J.M.; Leong, K.W. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, .

121. Godefroy, Bruno Mamadou. Evaluation de l'impact des formulations pharmaceutiques sur l'absorption intestinale des molécules actives au moyen des Chambres d'Ussing. 2016

122 .Ekins S., Waller C.L., Swaan P.W., Cruciani G., Wrighton S.A., Wikel J.H. Progress in predicting human ADME parameters in silico. (2000)

123. C. Zhu *et al.* / *European Journal of Medicinal Chemistry* 37 (2002) 399–407

Abstract :

The main objective of the experimental part of this work was to try to evaluate the intestinal permeability of the drugs by using two methods: the partition coefficient method and diffusion through an arterial membrane of hydrochlorthiazide, ketoprofen, metformin, ranitidine and furosemide and to relate the results obtained to absorption factors on the one hand and the literature data on the other hand.

The first method denies that there is a proportional relationship between the partition coefficient and the absorption factors, but the second method does not allow a good correlation.

In conclusion, all our work shows the interest of the partition coefficient method and diffusion through an artificial membrane in the study of the intestinal permeability of drugs but they are still very simplified and require optimization.

Keywords: intestinal permeability ,partition coefficient, diffusion through arterial membrane

Résumé :

La partie expérimentale de ce travail a eu pour objectif principal d'essayer d'évaluer la perméabilité intestinale des médicaments en utilisant deux méthodes : la méthode de flacon agité et la diffusion à travers une membrane artificielle de l'hydrochlorthiazide, kétoprofène, métformine, ranitidine et furosemide et de faire une relation entre les résultats obtenus avec les facteurs d'absorption d'une part et les données de littérature d'autre part .

la première méthode démontre qu'il y a une relation proportionnelle entre le coefficient de partage et les facteurs d'absorption ; par contre la deuxième méthode ne permet pas de faire une bonne corrélation .

En conclusion, l'ensemble de nos travaux montre l'intérêt de la méthode de flacon agité et la diffusion à travers une membrane artificielle dans l'étude de la perméabilité intestinale des médicaments mais elles restent toujours très simplifiées et nécessitent une optimisation .

Mots clés : perméabilité intestinale, coefficient de partage , diffusion à travers membrane artificielle.

يهدف هذا العمل التطبيقي إلى إمكانية دراسة الامتصاص المعوي للأدوية باستعمال طريقتين معامل التوزيع اكتانول-ماء و المرور عبر غشاء اصطناعي ل هيدروكلوروتيازي دكيتوبروفان متفورمين رانينيدين و فيروزيميد و إيجاد علاقة بين عامل الامتصاص و النتائج المتحصل عليها من جهة و المعطيات المتحصل عليها في الدراسات السابقة.

تبين لنا من الدراسة الأولى وجود علاقة طردية بين النتائج المتحصل عليها و عامل الامتصاص في حين أن الطريقة الثانية لم تسمح لنا بإيجاد ترابط.

نستخلص أن للطريقتين أهمية كبيرة في تقييم الامتصاص المعوي لأنهما تحتاجان مزيدا من التطوير.

الكلمات المفتاحية الامتصاص المعوي. معامل التوزيع. المرور عبر غشاء اصطناعي

