

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'EFFET DE LA FORMULATION PHARMACEUTIQUE SUR
L'INTERACTION FLUVASTATINE-MEMBRANE ET DÉVELOPPEMENT DE
MEMBRANES ARTIFICIELLES MODÈLES POUR L'ÉTUDE DE LA
PÉNÉTRATION MEMBRANAIRE DE MÉDICAMENTS

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
GERMAIN LAROCQUE

AVRIL 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement n°8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Good judgment comes from experience.

Experience comes from bad judgment.

Remerciements

Mes remerciements vont d'abord à la Professeure Isabelle Marcotte de l'Université du Québec à Montréal (UQÀM) et au Dr. Yves Mouget (Corealis Pharma Inc.) pour l'encadrement de ce projet. De plus, j'aimerais souligner la contribution exceptionnelle du Dr. Alexandre Arnold (NanoQÀM) qui a aussi grandement participé au bon déroulement du projet. Les efforts combinés de ces trois scientifiques m'ont permis d'accroître considérablement mes connaissances et je crois sincèrement être devenu une meilleure personne en les côtoyant.

Je me dois aussi de remercier les dirigeants de Corealis Pharma Inc. pour le soutien financier, instrumental et pour m'avoir permis de me concentrer pleinement sur l'accomplissement de mon projet de recherche. Les conseils et le soutien technique des Dr. Yves Roy, Patrick Gosselin et Yves Mouget furent grandement appréciés. Je me dois aussi de souligner les efforts déployés par mon collègue Bastien Landry grâce à qui j'ai eu la chance de consacrer mon temps à mes études graduées.

Je ne peux passer sous silence la contribution des employés de soutien de l'UQÀM et de mes collègues du Laboratoire Marcotte. Je tiens donc à remercier tout particulièrement Jean-Philippe Gaudet, Étienne Chartrand et Dror E. Warschawski.

Enfin, j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de mon projet. Finalement, je m'en voudrais de passer sous silence le soutien indéfectible de ma famille et mes amis qui ont bien voulu tolérer mes absences répétées dues à mes études.

Table des matières

Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations, symboles et acronymes	x
Liste des unités	xi
Résumé.....	xii
1 Introduction	13
1.1 La biodisponibilité d'un médicament	14
1.2. La formulation pharmaceutique	18
1.3. Les statines	19
1.4. Évaluation <i>in vitro</i> de l'absorption d'un médicament	20
1.5. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA)	21
1.6. Problématique	23
1.7. Membranes modèles pour l'étude de la pénétration membranaire d'un médicament	24
2. Aspect théorique	27
2.1. Étude des systèmes biologiques par résonance magnétique nucléaire (RMN)	27
2.1.1. Théorie générale	28
2.1.2. RMN du phosphore-31 dans l'étude des membranes	37
2.1.3. RMN du deutérium dans l'étude des membranes	39
2.2. Étude des systèmes biologiques par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	42

2.2.1.	Théorie générale	42
2.2.2.	Fréquence d'élongation des chaînes acyle	44
3. The effect of pharmaceutical formulations on drug-membrane interactions – the case of fluvastatin by solid-state NMR and infrared spectroscopy		
3.1.	Abstract	47
3.2.	Introduction	47
3.3.	Materials and Methods	51
3.3.1.	Materials	51
3.3.2.	Sample preparation	51
3.3.3.	NMR experiments	52
3.3.4.	FTIR experiments	53
3.4.	Results	53
3.4.1.	Phosphorus-31 NMR	53
3.4.2.	Deuterium NMR	59
3.4.3.	Fourier transform infrared spectroscopy	62
3.5.	Discussion	65
3.5.1.	In zwitterionic membranes	66
3.5.2.	In anionic model enterocyte membranes	67
3.6.	Conclusions	70
3.7.	Acknowledgements	71
4. Développement de membranes artificielles modèles.....		
4.1.	Introduction	72
4.2.	Mode opératoire et complément théorique	72
4.2.1.	Matériel	76
4.2.2.	Préparation des formulations pharmaceutiques	77
4.2.3.	Préparation des membranes	78
4.2.4.	Analyses de pénétration membranaire	79
4.2.5.	Analyses de chromatographie en phase liquide à haute performance	79
4.3.	Résultats et Discussion	80
4.4.	Conclusions	85

5. Conclusions et Perspectives.....	86
6. Bibliographie.....	89

Liste des figures

Figure 1: Caractéristiques physiques et chimiques de la paroi gastro-intestinale	15
Figure 2 : Structure des principaux phospholipides membranaires.	16
Figure 3 : Voies potentielles de transport de l'ingrédient actif à travers la paroi gastro-intestinale	17
Figure 4 : Cheminement d'un médicament administré par voie orale.....	18
Figure 5 : Structure de la fluvastatine (FS).....	20
Figure 6 : Schéma du PAMPA commercialisé par pION inc.....	22
Figure 7 : Cellule de Franz.....	22
Figure 8 : Phospholipides organisés en bicouche	24
Figure 9 : Exemples de structures adoptées par les phospholipides.....	25
Figure 10 : Représentation d'une vésicule multilamellaire.....	26
Figure 11 : Direction du moment angulaire de spin (I) dans un champ magnétique.....	28
Figure 12 : Niveaux d'énergie pour un noyau de spin $\frac{1}{2}$	30
Figure 13 : Effet de l'anisotropie de déplacement chimique sur la largeur des raies en RMN.....	32
Figure 14 : Schématisation du couplage dipolaire.....	33
Figure 15 : Diagramme des niveaux d'énergie d'un noyau de spin 1.	34
Figure 16 : Effet du quadripôle électrique sur l'allure du spectre de RMN lorsqu'un noyau quadripolaire est exposé à un champ magnétique externe	34
Figure 17 : Spectres simulés de RMN du phosphore-31 de vésicules en fonction de leur taille.	35
Figure 18 : Spectre statique de RMN du phosphore-31 d'un phospholipide dans une vésicule multilamellaire	38
Figure 19 : Éclatement quadripolaire $\Delta\nu_Q$ d'un lien C-D en fonction de l'orientation du vecteur internucléaire par rapport à B_0 . Cas d'une vésicule immobile.	40
Figure 20 : Éclatement quadripolaire $\Delta\nu_Q$ d'un lien C-D en fonction de son positionnement sur la chaîne acyle.	41
Figure 21 : Schématisation de la transition de phase de phospholipides organisés en bicouches lamellaires.....	43
Figure 22 : Thermotropisme de la bande d'élongation CD_2 asymétrique.....	44
Figure 23 : Chemical structure of Fluvastatin Sodium (FS).	49

Figure 24 : ^{31}P NMR spectra of the model membranes at 37°C with and without fluvastatin and sodium bicarbonate at lipid-to-FS and lipid-to- NaHCO_3 molar ratios of 25:1 and 7.5:1, respectively. (A) DMPC, and (B) DMPC/DMPS.	55
Figure 25 : ^{31}P MAS NMR spectra of the model membranes at 37°C with and without fluvastatin and sodium bicarbonate at lipid-to-FS and lipid-to- NaHCO_3 molar ratios of 25:1 and 7.5:1, respectively. (A) DMPC, and (B) DMPC/DMPS..	58
Figure 26 : ^2H NMR spectra of the model membranes at 37°C with and without fluvastatin and sodium bicarbonate at a lipid-to-FS and lipid-to- NaHCO_3 molar ratios of 25:1 and 7.5:1, respectively. (A) DMPC- d_{54} , and (B) DMPC- d_{54} /DMPS.	60
Figure 27 : Temperature dependence of the frequency of the CH_2 symmetric stretching vibration in DMPC vesicles in the absence or presence of FS and NaHCO_3 at a lipid-to-FS and lipid-to- NaHCO_3 molar ratios of 25:1 and 7.5:1, respectively.....	63
Figure 28 : Temperature dependence of the frequency of (A) the CD_2 symmetric stretching vibration of DMPC- d_{54} and (B) the CH_2 symmetric stretching vibration of DMPS in DMPC- d_{54} /DMPS model membranes in the absence or presence of fluvastatin and sodium bicarbonate. Lipid-to-FS molar ratio of 25:1 and lipid-to- NaHCO_3 molar ratios of (1) 15:1, (2) 7.5:1, and (3) 3.8:1 were employed.	64
Figure 29 : Photographies de microscopie électronique et représentation schématique des divers types de vésicules	73
Figure 30 ; Processus de formation d'une bicouche phospholipidique par adsorption de vésicules	74
Figure 31 : Schématisation d'une bicouche phospholipidique supportée	75
Figure 32 : Images de microscopie électronique d'un filtre Anopore®	76
Figure 33 : Image de microscopie à force atomique en mode « tapping » d'un filtre Anopore® (taille des pores de 100 nm) sur lequel est déposée une suspension de DMPC et de DMPS (rapport molaire 10 : 1).	82
Figure 34 : Analyse de la pénétration membranaire de la FS à travers une membrane de DMPC / DMPS (rapport molaire 10 : 1) sur des filtres Anopore® (20 nm).	83
Figure 35 : Analyse de la pénétration membranaire de la FS à travers une membrane de DMPC / DMPS (rapport molaire 10 : 1) sur des filtres Anopore® (100 nm).	83
Figure 36 : Analyse de la pénétration membranaire de la FS à travers un filtre Anopore® (20 nm) sans membrane lipidique.	84

Liste des tableaux

Tableau 1 : Abondance naturelle, nombre de spin, rapport gyromagnétique et fréquence de Larmor du proton et des noyaux étudiés dans ce travail.....	29
Tableau 2 : Effect of fluvastatin and the excipient NaHCO ₃ on the ³¹ P chemical shift anisotropy (CSA), isotropic chemical shift (δ_{iso}), and full width at half height (FWHH) of the isotropic resonance of DMPC in pure DMPC and DMPC/DMPS model membranes at 37°C.....	56
Tableau 3 : Quadrupolar splittings of the plateau ($\Delta\nu_p$) and methyl ($\Delta\nu_m$) regions of DMPC-d ₅₄ in pure DMPC and DMPC/DMPS model membranes at 37°C in the absence and in the presence of fluvastatin (FS) and the excipient NaHCO ₃	61
Tableau 4 : Préparation des formulations pharmaceutiques.....	78

Liste des abréviations, symboles et acronymes

^1H	Proton
^2H	Deutérium
^{31}P	Phosphore-31
ADC	Anisotropie de déplacement chimique (δ)
AFM	Microscopie à force atomique (atomic force microscopy)
B_0	Champ magnétique externe
Caco-2	Cellules d'adénocarcinome du côlon humain
CLHP	Chromatographie liquide à haute pression
CMC	Concentration micellaire critique
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMPS	Dimyristoylphosphatidylsérine
FDA	Food and drug administration
FS	Fluvastatine
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
IRTF	Infrarouge à transformée de Fourier
LUV	Grands liposomes unilamellaires (large unilamellar vesicle)
L_α	Phase liquide cristalline de phospholipides organisés en bicouches lamellaires
L_β et L_β'	Phase gel de phospholipides organisés en bicouches lamellaires
MAS	Rotation à l'angle magique (magic angle spinning)
MDCK	Cellules rénales du chien Madin-Darby (Madin-Darby canine kidney Cells)
MLV	Vésicules multilamellaires (multilamellar vesicle)
NaHCO_3	Bicarbonate de sodium
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PI	Phosphatidyliositol
PS	Phosphatidylsérine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SLV	Petits liposomes unilamellaires (small unilamellar vesicle)
T_m	Température de transition de phase (melting temperature)
USP	Pharmacopée américaine (United States pharmacopeia)
UV	Ultraviolet

Liste des unités

Da	Unité de masse atomique (Dalton)
g/mol	Masse molaire (grammes par mole)
p/p	Rapport poids/poids
v/v	Rapport volume/volume
l	Nombre quantique de spin
γ	Rapport gyromagnétique (unité = $10^7 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$)
T	Unité de force d'un champ magnétique (Tesla)
s	Unité de mesure du temps (seconde)
h	Constante de Planck
ppm	Unité de mesure de concentration ou de déplacement chimique (partie par million)
cm^{-1}	Unité de fréquence (1/centimètre)
nm	Unité de mesure (nanomètre)
mm	Unité de mesure (millimètre)
μm	Unité de mesure (micromètre)
mL/min.	Débit (millilitres par minute)
N	Unité de force (Newton)

Résumé

La faible biodisponibilité de certaines molécules est un obstacle majeur lors de la conception de principes actifs innovateurs. L'optimisation de formulations pharmaceutiques peut améliorer de façon significative la biodisponibilité de ces molécules. Une attention particulière est donc accordée au choix et au dosage des excipients lors de la mise au point de médicaments. Afin de minimiser les études cliniques infructueuses, le potentiel d'absorption d'une molécule ayant un effet thérapeutique peut-être évalué *in vitro*. Des techniques qui tentent de reproduire les conditions biologiques telles que le PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) peuvent alors être utilisées. Plus spécifiquement, cette technique permet l'étude du passage d'une molécule à travers une membrane modèle par voie passive. Depuis l'introduction du PAMPA en 1998, la recherche de conditions expérimentales mimant correctement le comportement *in vivo* a compliqué la technique sans toutefois améliorer la pertinence des résultats. C'est pourquoi une membrane artificielle modèle simple, représentative de l'environnement biologique et adaptable à un appareil de type PAMPA sera éventuellement mise au point dans le cadre de ce projet de recherche. Les résultats de travaux préliminaires effectués lors de la mise en place de ce nouveau volet de recherche seront présentés. Auparavant, nous avons entrepris d'étudier l'impact de la formulation pharmaceutique sur le mécanisme d'absorption d'un médicament modèle, la fluvastatine (FS), dans la paroi gastro-intestinale. Les conclusions de cette étude vont permettre, ou à tout le moins faciliter, la compréhension des résultats lors des analyses de pénétration membranaire effectuées avec la technique PAMPA. L'effet de l'excipient, le bicarbonate de sodium (NaHCO_3), sur l'interaction de la FS avec des membranes modèles a donc été étudié. Pour ce faire, les spectroscopies infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et de résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'état solide ont été utilisées. Nos résultats ont démontré que la FS induit une ségrégation entre les lipides anioniques et zwitterioniques composant la membrane. Cet effet est par contre altéré suite à l'addition de quantités croissantes d'excipient. Cependant, l'addition de NaHCO_3 n'affecte pas l'interaction de la FS avec une membrane entièrement zwitterionique. Nos travaux soulignent à la fois l'impact de la formulation pharmaceutique sur l'interaction entre le médicament et la membrane et l'importance de la composition de la membrane lors de ce type d'étude. En ce qui a trait à la mise au point d'une membrane artificielle modèle pour l'étude de la pénétration membranaire de médicaments, il est rapidement devenu évident que l'ampleur du projet sortait du cadre de cette maîtrise. Toutefois, les travaux effectués mettent en évidence les difficultés qui seront rencontrées dans la suite du projet tout en suggérant de possibles approches afin de surmonter ces obstacles.

Mots clés : RMN de l'état solide; Spectroscopie infrarouge; Fluvastatine; Formulation pharmaceutique; Interaction médicament-membrane; Biodisponibilité de médicaments; PAMPA

1 Introduction

La recherche de nouveaux médicaments par l'industrie pharmaceutique est à la fois risquée et coûteuse (Avdeef, 2003). En effet, une étude menée par le cabinet Bain & Co. (Massachusetts) a révélé qu'au cours de la période s'échelonnant entre les années 2000-2002, les coûts associés à la mise en marché d'une seule molécule innovatrice approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) a nécessité des investissements moyens s'élevant à 1.7 milliards de dollars américains (US \$). Il s'agit d'une hausse de 55% en comparaison aux années 1995-2000 (Singh & Henske, 2003). Toutefois, malgré les coûts sans cesse croissants et la diminution du nombre de molécules atteignant le marché, cette industrie reste lucrative. En effet, selon une étude conduite par la revue Forbes, les revenus engendrés par les dix médicaments les plus vendus à l'échelle mondiale s'élèvent à près de 57 milliards (US \$) pour la seule année 2005 (Herper & Kang, 2006).

Due en grande partie à sa simplicité, l'administration de médicaments solides par voie orale est généralement préconisée lors du processus de développement. En effet, l'absence d'un dispositif d'administration (ex : seringue et aiguille) diminue l'inconfort du patient en plus de minimiser les risques que pourrait entraîner un dosage inexact. Cependant, plusieurs facteurs contribuent à compliquer la tâche des chercheurs lors de la mise au point de nouveaux médicaments. L'étendue des molécules potentielles est un bon exemple puisque même en se limitant aux atomes communs et à une taille maximum de 600 Da, il y aurait entre 10^{40} et 10^{100} possibilités de molécules. Jusqu'à présent, moins de 500 cibles biologiques ont été exploitées afin de provoquer un effet thérapeutique. Toutefois, on estime à plusieurs milliers le nombre de cibles qui seront disponibles suite aux progrès en génomique (Avdeef, 2003). Ces nouvelles cibles pourraient s'avérer exploitables, mais l'augmentation des combinaisons molécule-cible a aussi pour effet de compliquer les travaux de recherche. C'est pourquoi certains outils ont été développés afin de restreindre le bassin de molécules (Amidon et al., 1995; Lipinski, 2000). Pour ce faire, le potentiel

d'absorption des composés soupçonnés d'avoir un effet thérapeutique particulier est évalué en fonction de la structure moléculaire. Toutefois, l'expérience a démontré que les nombreux impondérables liés à l'absorption de médicaments dans la paroi gastro-intestinale rendent l'estimation du potentiel d'absorption difficile. Par exemple, le temps de transit à travers la paroi ne peut être évalué qu'*in vivo* (Hidalgo, 2001). Une absorption insuffisante se soldera généralement en une faible biodisponibilité et aucun effet thérapeutique significatif ne sera observé. De plus, la découverte d'une possible interaction entre la cible biologique et une molécule novatrice n'est pas garante de succès. Les principales causes d'échec lors du processus de développement sont les propriétés pharmacodynamiques, la toxicité, l'absence d'effet thérapeutique significatif ou la métabolisation (van de Waterbeemd et al., 2003).

1.1 La biodisponibilité d'un médicament

La biodisponibilité d'un médicament par voie orale est déterminée par la quantité et le taux d'absorption de l'ingrédient actif dans la paroi gastro-intestinale (Martinez & Amidon, 2002). L'absorption est le résultat d'une série complexe d'événements largement influencés par les propriétés physicochimiques de la molécule et les conditions biochimiques de la paroi gastro-intestinale (Lennernäs, 2003). Ces dernières sont détaillées dans la Figure 1.

Afin d'atteindre la cible biologique et exercer une action thérapeutique, les médicaments doivent généralement entrer dans la circulation sanguine (Seydel & Wiese, 2002). Pour ce faire, il est important que l'ingrédient actif soit absorbé à une concentration et à un rythme optimal. En premier lieu, il doit être suffisamment hydrophile pour lui permettre de se solubiliser à une concentration suffisante dans le milieu gastrique ou intestinal. Il sera donc exposé à des pH pouvant varier entre 1.4 et 8.0 (Figure 1) (Avdeef, 2003).

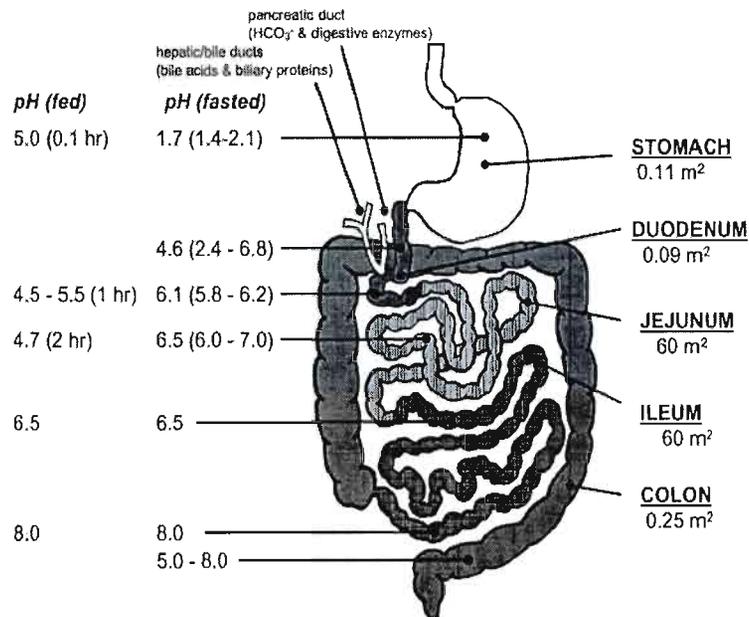


Figure 1: Caractéristiques physiques et chimiques de la paroi gastro-intestinale (Avdeef, 2003).

Contrairement aux acides faibles, les bases faibles ont généralement un degré de dissolution inférieur à pH élevé. Dans ces conditions, une plus grande portion de l'ingrédient actif basique est sous forme moléculaire (Martinez & Amidon, 2002). Bien qu'il ne s'agisse pas d'une règle absolue, il est couramment accepté de considérer qu'un médicament est mieux absorbé sous sa forme moléculaire qu'ionisée (Avdeef et al., 2008). De plus, la stabilité de l'ingrédient actif est susceptible d'être compromise par le pH, la présence de bactéries et d'enzymes. Ces facteurs augmentent le potentiel de dégradation ou de métabolisation enzymatique de la molécule (Chan & Stewart, 1996; Löbenberg & Amidon, 2000).

L'ingrédient actif doit ensuite pénétrer la paroi gastro-intestinale. Ce processus implique généralement que la molécule possède un certain degré d'hydrophobicité. Les membranes biologiques sont riches en lipides afin de préserver le contenu cellulaire du milieu externe. En général, les phospholipides sont les lipides structuraux les plus abondants au sein des membranes eucaryotes. Ils sont composés de deux

chaînes hydrocarbonées liées à un groupement glycérol étant lui-même lié à un groupement phosphate substitué (Figure 2). La nature de cette substitution déterminera la charge globale de la tête polaire.

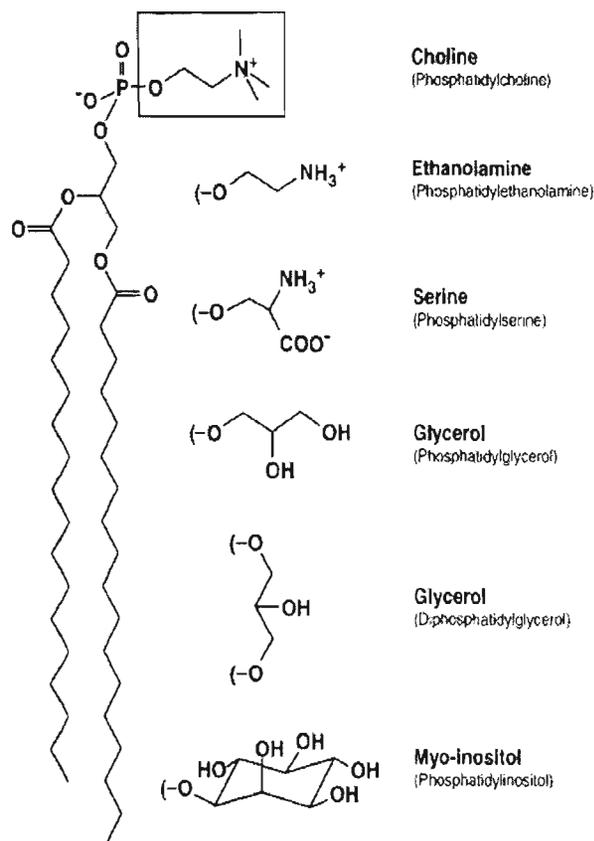


Figure 2 : Structure des principaux phospholipides membranaires. Les chaînes hydrocarbonées peuvent être saturées ou non (Vance & Vance, 2002).

Selon les propriétés physicochimiques de la molécule, la pénétration membranaire d'un médicament s'effectuera selon un ou plusieurs mécanismes différents. Ces mécanismes sont divisés en trois catégories : le transport passif, actif et spécialisé (Löbenberg & Amidon, 2000). La diffusion passive est le mécanisme de

transport le plus important pour la majorité des médicaments (Camenisch et al., 1996). Divisé en deux catégories, ce mode de transport implique le passage de l'ingrédient actif à travers les cellules (transcellulaire) ou entre celles-ci (paracellulaire). Les mécanismes de transport à travers la paroi gastro-intestinale sont illustrés dans la Figure 3.

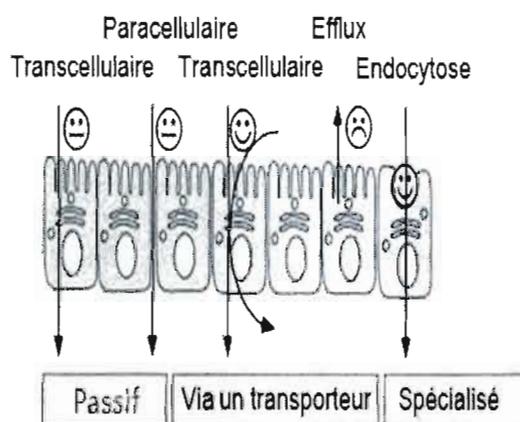


Figure 3 : Voies potentielles de transport de l'ingrédient actif à travers la paroi gastro-intestinale. Tiré et modifié de Löbenberg & Amidon, 2000.

Avant d'atteindre la circulation sanguine, la molécule est transportée au foie (un organe riche en enzymes métaboliques) via la veine porte (Figure 4). Toutefois, seule la portion de l'ingrédient actif non métabolisé pourra atteindre la cible biologique par le système sanguin (Chan & Stewart, 1996). Si la concentration du médicament est suffisante, un effet thérapeutique sera obtenu. Cependant, s'il s'agit d'un médicament de type pro-drogue, c'est le métabolite qui possède le potentiel thérapeutique.

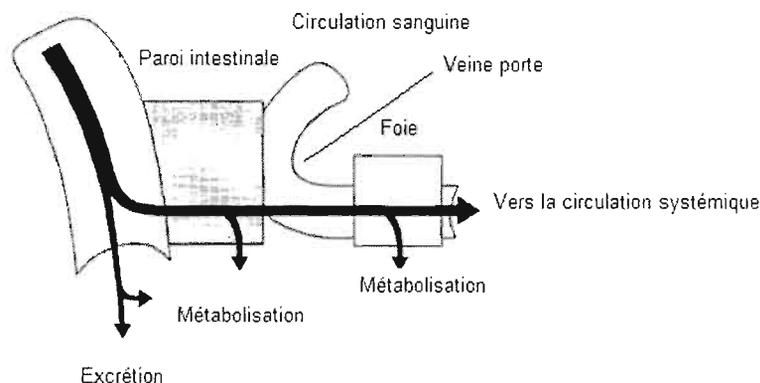


Figure 4 : Cheminement d'un médicament administré par voie orale. Tiré et modifié de Chan & Stewart, 1996.

1.2. La formulation pharmaceutique

La proportion de molécules étant à la fois suffisamment solubles en milieu aqueux et assez hydrophobes pour permettre la pénétration à travers la paroi gastro-intestinale à une concentration optimale est plutôt faible. Dans la majorité des cas, la solubilité et la pénétration membranaire (ou une combinaison des deux) de l'ingrédient actif seul est insuffisante afin d'assurer une biodisponibilité adéquate (Hidalgo, 2001). Cependant, si les propriétés physicochimiques d'une molécule possédant un potentiel thérapeutique sont inadéquates, il est possible de développer une formulation pharmaceutique dans le but de favoriser son absorption.

Longtemps utilisés dans le seul but de permettre la production de comprimés solides, les excipients composant la formulation pharmaceutique sont maintenant incontestablement reconnus comme des substances pouvant influencer l'absorption de l'ingrédient actif (Jackson et al., 2000). Aujourd'hui, l'impact du choix et du dosage des excipients composant la formulation est inévitablement évalué lors de la mise au point d'un nouveau médicament. L'addition d'un excipient dans une formulation peut être

justifiée par plusieurs facteurs autres que ceux reliés à la production : esthétique, identification, dissolution, désintégration, stabilisation, absorption, etc. Par exemple, le bicarbonate de sodium (NaHCO_3) est utilisé par la compagnie innovatrice afin de maintenir l'environnement de la fluvastatine (FS) suffisamment alcalin pour minimiser la dégradation de la molécule (Kabati & Vivilecchia, 1994). Cependant, l'ajout d'un excipient remplissant un rôle donné peut nuire à l'absorption de l'ingrédient actif.

1.3. Les statines

À l'échelle mondiale, il y a plus de 20 millions de patients traités avec des médicaments servant à contrôler le taux de cholestérol (Davidson & Toth, 2004). Depuis l'approbation de la lovastatine en 1987, les statines sont devenues la classe de molécules la plus prescrite afin de contrer l'hypercholestérolémie et la dyslipidémie (Sarr et al., 2008b). L'hypercholestérolémie joue un rôle crucial dans le développement de troubles de santé graves comme l'athérosclérose qui est la principale cause de décès dans le monde (Lindahl et al., 1996).

La diminution du niveau de cholestérol, ou plus précisément le cholestérol de basse densité dans le plasma, s'explique par la capacité des statines à inhiber la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase. La conversion de la HMG-CoA en mévalonate par cette enzyme constitue la première étape menant à la biosynthèse du cholestérol (Sarr et al., 2008a). Les statines, naturelles et synthétiques, sont toutes dotées du même groupement inhibiteur de la HMG-CoA réductase. Toutefois, les différences structurelles entre les statines conduisent à une efficacité et des propriétés pharmacocinétiques différentes (Davidson & Toth, 2004). De plus, l'impact de la formulation pharmaceutique sur l'absorption de ces molécules n'est pas compris. Par exemple, on ignore si la présence de l'agent stabilisant NaHCO_3 influence le mécanisme d'absorption de la fluvastatine (Figure 5). Une diminution de l'absorption causée par le NaHCO_3 impliquerait aussi une diminution de la biodisponibilité, donc

l'effet thérapeutique pourrait être atténué. Le patient serait ainsi forcé de prendre des doses plus élevées pour compenser cette diminution de la biodisponibilité.

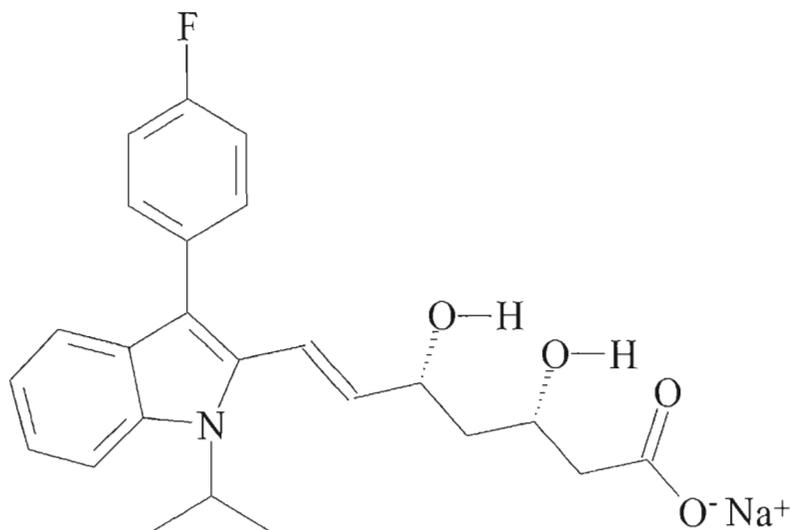


Figure 5 : Structure de la fluvastatine (FS).

1.4. Évaluation *in vitro* de l'absorption d'un médicament

Le potentiel d'absorption d'une molécule possédant un potentiel thérapeutique peut être évalué *in vitro* en cours de développement afin de minimiser le risque d'échec relié à une faible biodisponibilité. Actuellement, la pénétration de médicaments à travers la paroi gastro-intestinale peut être estimée à l'aide de techniques qui reproduisent les conditions biologiques à différents degrés : PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay), Caco-2 (cellules d'adénocarcinome du côlon humain) et MDCK (cellules rénales du chien Madin-Darby) (Di & Kerns, 2003). Ces techniques évaluent la pénétration de substances chimiques à travers les membranes organiques

(ex. : épiderme, paroi cellulaire, paroi gastro-intestinale). Cependant, la plupart des études sont effectuées sur des substances pures et négligent l'impact de la formulation pharmaceutique sur l'absorption d'actifs par le corps humain. Les résultats obtenus peuvent inciter les entreprises à conduire une étude clinique avec une molécule ayant des caractéristiques d'absorption différentes une fois que celle-ci est formulée sous forme solide. Dans un tel cas, des changements doivent alors être apportés à la molécule afin d'en permettre l'absorption et la formulation sous une forme posologique stable et facilement utilisable. En plus d'investir de fortes sommes d'argent dans des études souvent infructueuses, les entreprises perdent un temps précieux lorsqu'elles doivent faire marche arrière.

1.5. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA)

Parmi les techniques visant l'évaluation de l'absorption d'une molécule, le PAMPA est particulièrement intéressant puisqu'il est simple, rapide et relativement peu coûteux (Seo et al., 2006). De plus, la réalisation d'une expérience de PAMPA implique peu ou pas de préparation préalable contrairement aux tests de Caco-2 qui demandent d'effectuer une culture cellulaire. Introduite par Kansy et al. en 1998 (Kansy et al., 1998), le PAMPA permet d'étudier la pénétration membranaire de médicaments transportés passivement à travers la paroi gastro-intestinale (Kansy et al., 2004). La technique consiste à doser (ex. : spectrophotométrie) une molécule traversant une membrane hydrophobe séparant la cellule de départ de la cellule réceptrice. Illustrée à la Figure 6, la version commerciale (pION inc.) est composée de deux plateaux de 96 puits séparés par un filtre enduit d'une solution faite de lécithine d'œuf (10 % p/p dans le dodécane) (Avdeef, 2003). Cet appareil permet d'évaluer rapidement le potentiel d'absorption par voie passive de plusieurs composés simultanément.

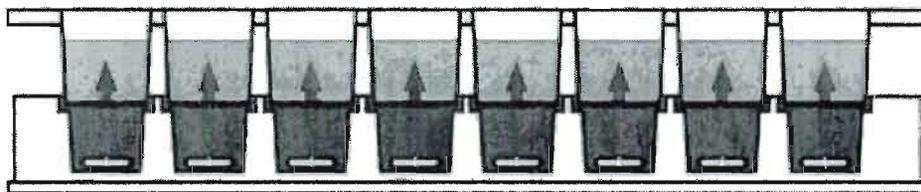


Figure 6 : Schéma du PAMPA commercialisé par pION inc. (Avdeef, 2003).

Le montage expérimental utilisé pour notre étude de pénétration membranaire est une adaptation du PAMPA et est composé d'une cellule de Franz (cellule réceptrice) et d'une cellule de départ séparées par une membrane. Le système complet comprend six montages comme celui présenté à la Figure 7 afin d'effectuer plusieurs analyses en parallèle. Le mode opératoire nécessaire à la réalisation d'une expérience de pénétration membranaire avec ce montage est détaillé dans la section 4.2.4 du présent travail.

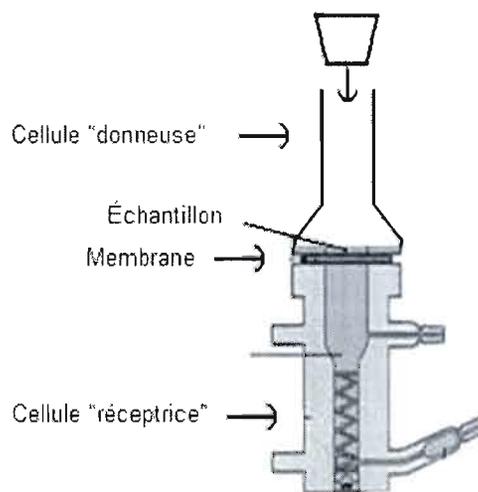


Figure 7 : Cellule de Franz (réceptrice) et cellule de départ (donneuse) pour l'étude de la pénétration membranaire de médicaments. Tiré et modifié de <http://www.hansonresearch.com/>, 2009.01.14.

1.6. Problématique

Au cours des 10 dernières années, plusieurs articles furent consacrés à modifier les conditions expérimentales de la technique PAMPA afin de mieux mimer le comportement *in vivo* (voir Avdeef, 2005 pour une synthèse). L'augmentation du nombre de variables impliquées dans la technique (composition de la solution dans les cellules, choix du filtre, composition de la solution enduisant le filtre, agitation, etc.) complique l'analyse sans nécessairement améliorer la pertinence des résultats (Galinis-Luciani et al., 2007).

Dans ce contexte, un des buts de ce projet était d'initier le développement d'une membrane modèle simple et utilisable sur un appareil de type PAMPA. De plus, cette membrane se devait d'être représentative de l'environnement biologique, afin d'être sensible à la formulation pharmaceutique. La paroi gastro-intestinale étant principalement composée de phospholipides, nous avons mis au point des membranes à partir de ces derniers. Pour ce faire, des phospholipides devaient être déposés sous forme de bicouche à la surface de filtres commerciaux. Nous avons également étudié l'impact de la formulation sur le mécanisme d'absorption d'une statine modèle, la fluvastatine, dans la paroi gastro-intestinale, a été effectuée. L'importance des statines sur le marché et le manque d'information à propos de l'impact du bicarbonate de sodium sur l'absorption de la FS ont motivé notre choix. Les spectroscopies infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et de résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'état solide ont été utilisées afin d'élucider les mécanismes régissant l'absorption de la FS en fonction de la formulation pharmaceutique. Ces techniques sont largement utilisées afin de sonder l'effet de médicaments, de protéines et autres molécules sur la dynamique et l'organisation des lipides. Plus précisément, ces analyses spectroscopiques permettent d'évaluer l'interaction de la FS avec la membrane lipidique en fonction de la présence de NaHCO_3 . L'étude de cette interaction peut aider à l'interprétation du mécanisme d'absorption de l'ingrédient actif.

1.7. Membranes modèles pour l'étude de la pénétration membranaire d'un médicament

L'étude spectroscopique de l'interaction médicament/membrane en fonction de la formulation pharmaceutique implique la mise au point de membranes modèles mimant la paroi gastro-intestinale. Bien que la composition lipidique des différentes membranes biologiques varie, les phospholipides sont généralement les lipides structuraux les plus courants. Étant amphiphiles, ils s'organisent de façon à protéger les chaînes hydrophobes du milieu aqueux. En effet, la tête du lipide est polaire (le phosphoglycérol substitué) alors que les chaînes hydrocarbonées sont apolaires. Lorsque la concentration de phospholipides dépasse grandement la concentration micellaire critique (CMC), il y aura formation spontanée de structures supramoléculaires pouvant s'organiser en bicouche (Figure 8). La forme de ces structures dépendra entre autres de la taille relative des parties polaire et apolaire (Mouritsen, 2005). La Figure 9 illustre diverses structures que peuvent adopter les phospholipides en fonction de la composition lipidique d'une membrane (Mouritsen, 2005).

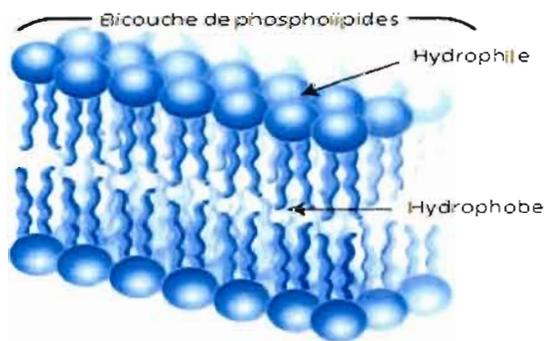


Figure 8 : Phospholipides organisés en bicouche. Tiré et modifié de <http://www.biotech.ubc.ca/Bio-industry/Inex/>, 2009.01.07.

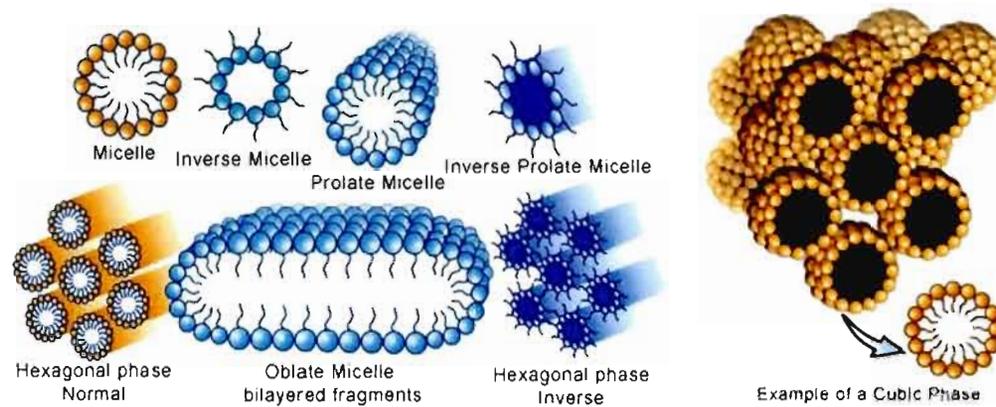


Figure 9 : Exemples de structures adoptées par les phospholipides (<http://www.bioteach.ubc.ca/Bio-industry/Inex/>, 2009.01.07).

Puisque l'étude porte sur l'absorption de médicaments par voie orale, des phospholipides (Figure 2) s'organisant en bicouche ont été choisis afin de mimer la paroi gastro-intestinale. Des vésicules multilamellaires (MLV, multilamellar vesicles), telles qu'illustrées dans la Figure 10, ont été fabriquées à partir de phosphatidylcholine (zwitterionique), le phospholipide le plus abondant dans les membranes eucaryotes (> 50 %) (van Meer et al., 2008). Les lipides chargés négativement pouvant représenter jusqu'à 13 % de la quantité totale de lipides dans les membranes d'enterocytes (Avdeef, 2003), la phosphatidylsérine fut ajoutée au mélange lipidique.

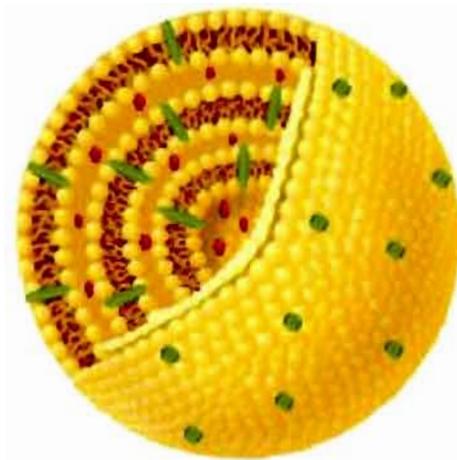


Figure 10 : Représentation d'une vésicule multilamellaire (<http://www.encapsula.com/>, 2008.04.13)

Le prochain chapitre est un rappel des principes de bases de la résonance magnétique nucléaire (Section 2.1) et de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Section 2.2). Le chapitre 3 est un article scientifique soumis à *Chemistry and Physics of Lipids* qui traite de l'impact de la formulation pharmaceutique sur l'interaction fluvastatine/membrane par spectroscopies infrarouge et de résonance magnétique nucléaire. Le quatrième chapitre présente des travaux préliminaires pour le développement de membranes artificielles modèles utilisables avec la technique PAMPA.

2. Aspect théorique

Seuls les éléments nécessaires à la compréhension des résultats seront détaillés dans ce chapitre. La compréhension des résultats lors des analyses de pénétration membranaire ne requiert pas d'informations supplémentaires.

2.1. Étude des systèmes biologiques par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Dans le cadre de cette étude, les spectroscopies de RMN du phosphore-31 (^{31}P) et du deutérium (^2H) ont été utilisées afin d'élucider les mécanismes d'interactions fluvastatine/membrane en présence de la formulation pharmaceutique. La RMN du ^{31}P est employée afin de sonder les effets à la surface des membranes tandis que la RMN du ^2H permet d'étudier le cœur hydrophobe de lipides deutérés. La RMN est particulièrement adaptée à l'étude des phospholipides dans les systèmes membranaires dû en partie à sa capacité de détecter un large éventail de mouvements typiques de ces lipides au sein d'une bicouche (Moreau, 2000). En effet, la résonance magnétique nucléaire permet d'étudier des mouvements ayant des temps caractéristiques variant entre 10^{-12} et 10^{-1} secondes (Cevc, 1993). Puisque les membranes utilisées pour mimer la paroi gastro-intestinale sont caractérisées par des mouvements lents de rotation globale, on parlera alors de RMN de l'état solide. Au meilleur de nos connaissances, la RMN de l'état solide n'a jamais été utilisée pour l'étude de l'impact de la formulation sur l'interaction d'un médicament avec une membrane modèle.

2.1.1. Théorie générale

La résonance magnétique nucléaire est une méthode d'analyse non invasive permettant l'étude des noyaux ayant un spin I non nul (nombre entier ou demi-entier). On peut imaginer le spin, ou le moment angulaire de spin (\vec{I}), comme un « vecteur pointant dans la direction de l'axe autour duquel il tourne » (ex.: la direction du champ magnétique) (King & Williams, 1989). On appelle précession le mouvement de rotation du moment angulaire autour de l'axe qui définit la direction du champ magnétique (axe z par convention). La Figure 11 illustre la relation entre le moment angulaire de spin et un champ magnétique externe.

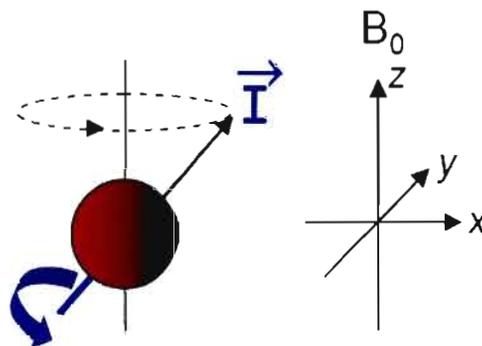


Figure 11 : Direction du moment angulaire de spin (\vec{I}) dans un champ magnétique (\mathbf{B}_0) (Marcotte, 2008).

Dû à sa capacité d'interaction avec un champ magnétique, un noyau possédant un spin non nul a un moment magnétique $\vec{\mu}$. Le moment magnétique est relié au moment angulaire de spin par le rapport gyromagnétique γ qui est propre à chaque noyau.

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I} \quad (2.1)$$

où $\hbar = h/2\pi$ et h est la constante de Planck. Le tableau 1 présente le nombre de spin, le rapport gyromagnétique et l'abondance naturelle des noyaux étudiés dans ce travail.

Le mouvement de précession du moment angulaire de spin aura une fréquence de résonance donnée (fréquence de Larmor ν_0) qui dépend à la fois de la force du champ magnétique et du rapport gyromagnétique du noyau. Conséquemment, chaque noyau aura une fréquence de résonance différente en fonction de la valeur de son rapport gyromagnétique pour un champ donné.

Tableau 1 : Abondance naturelle, nombre de spin, rapport gyromagnétique et fréquence de Larmor du proton et des noyaux étudiés dans ce travail.

Noyau	Abondance naturelle (%)	Spin	Rapport gyromagnétique γ ($10^7 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Fréquence de Larmor ν_0 (MHz) pour $B_0 = 14.1 \text{ T}$
^1H	99.985	$\frac{1}{2}$	26.75	600
^2H	0.02	1	4.11	92.2
^{31}P	100	$\frac{1}{2}$	10.83	243.3

2.1.1.1. Effet Zeeman

Exposé à un champ magnétique externe, le spin pourra adopter $2I + 1$ projections (états de spin) sur l'axe z du champ. Sans l'influence d'un champ magnétique externe, les états de spin du noyau auront la même énergie. Cependant, la présence d'un champ magnétique B_0 aura pour effet de lever la dégénérescence entre les niveaux d'énergie. Il s'agit de l'effet Zeeman et les niveaux sont séparés par :

$$\Delta E = h\nu = \gamma \hbar B_0 \quad (2.2)$$

où

$$\nu = \frac{\gamma B}{2\pi} \quad (2.3)$$

ΔE est la différence d'énergie séparant deux états de spin et ν est la fréquence de précession. Le signal observé en RMN est le résultat de la différence de population de spin entre les différents niveaux d'énergie. Donc plus ΔE sera important, plus l'intensité du signal augmentera. En plus de l'intensité du champ magnétique externe et du rapport gyromagnétique du noyau, le rapport de population de spin entre les niveaux d'énergie est affecté par la température. De plus, l'équation 2.2 démontre qu'il est possible d'induire des transitions entre les niveaux d'énergie adjacents à l'aide de la radiation électromagnétique. La Figure 12 illustre la levée de la dégénérescence des niveaux d'énergie d'un noyau possédant un spin $\frac{1}{2}$ lorsqu'exposé à champ magnétique externe.

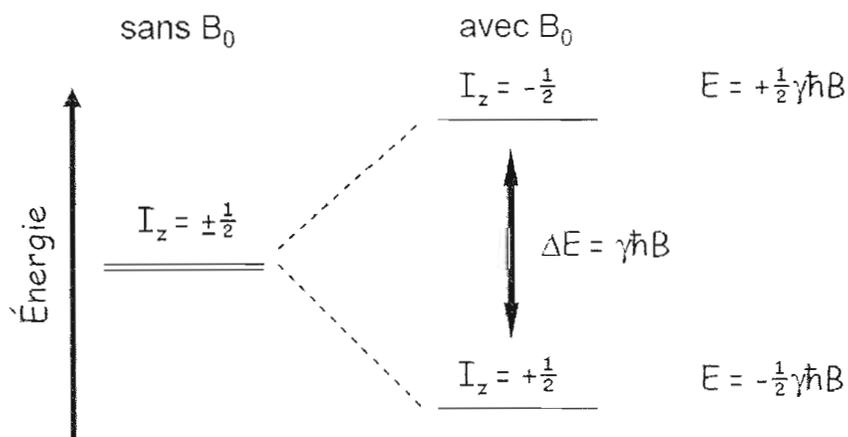


Figure 12 : Niveaux d'énergie pour un noyau de spin $\frac{1}{2}$ avec ou sans B_0 (Marcotte, 2008).

2.1.1.2. Anisotropie de déplacement chimique

La fréquence de résonance spécifique d'un noyau au sein d'une molécule dépend de son environnement. En effet, le champ au niveau du noyau (B_{eff}) sera différent du champ externe B_0 dû aux perturbations induites par la présence de champs magnétiques locaux créés par les électrons avoisinants. Le blindage électronique généré par la présence de ce nuage électronique a pour conséquence de diminuer l'effet du champ magnétique externe au niveau du noyau ce qui lui confèrera une fréquence de résonance spécifique dite « effective » (ν_{eff}).

$$\nu_{eff} = (1 - \sigma) \frac{\gamma}{2\pi} B_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_{eff} \quad (2.4)$$

où σ est le paramètre d'écran chimique. Dans le cas des systèmes anisotropes comme les vésicules multilamellaires, le paramètre d'écran chimique dépend de l'orientation du noyau dans le champ magnétique. On parle alors d'anisotropie de déplacement chimique (ADC) et son effet sur l'allure du spectre est montré à la Figure 13. Le fait que la densité du nuage électronique ne soit pas identique dans toutes les directions autour du noyau implique que l'orientation de la molécule par rapport au champ magnétique influencera la fréquence effective de ce même noyau.

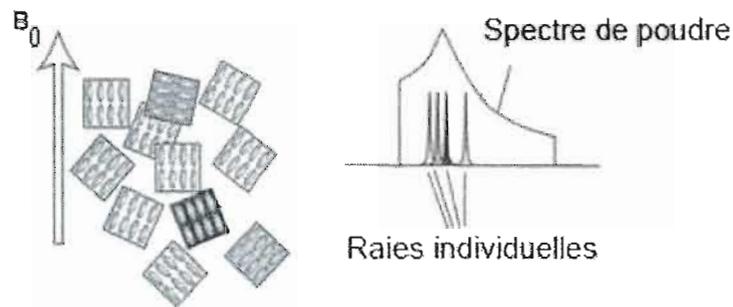


Figure 13 : Effet de l'anisotropie de déplacement chimique sur la largeur des raies en RMN. Chaque orientation du noyau par rapport à la direction du champ magnétique aura une fréquence spécifique, ce qui conduit à un spectre de poudre (Marcotte & Arnold, 2009).

2.1.1.3. Couplage dipolaire et couplage électrique quadripolaire

En plus de l'effet Zeeman et de l'ADC, le spin peut subir l'influence des noyaux voisins étant donné qu'un spin nucléaire crée un champ magnétique local. L'interaction entre le spin d'un noyau et un spin voisin provoque un éclatement dipolaire observable sur le spectre de RMN par une division des pics. Le couplage entre deux noyaux est appelé couplage dipolaire et est présenté à la Figure 14.

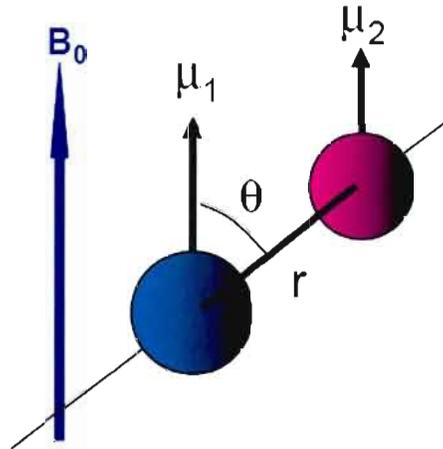


Figure 14 : Schématisation du couplage dipolaire (Marcotte, 2008).

L'énergie de ce couplage (E_d) dépend de la distance internucléaire (r) et de l'orientation relative de ces deux noyaux par rapport à la direction du champ magnétique (angle θ) (Levitt, 2008).

$$E_d = \frac{\vec{\mu}_1 \vec{\mu}_2}{r^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_1 \vec{r})(\vec{\mu}_2 \vec{r})}{r^5} = \frac{\mu^2}{r^3} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (2.5)$$

Lors de l'analyse de noyaux possédant un spin égal ou supérieur à 1 tel que le deutérium, la distribution non uniforme des charges du noyau induira un effet quadripolaire en présence d'un champ magnétique externe. L'interaction du quadripôle électrique avec le gradient de champ électrique des liens électroniques environnants a pour effet de modifier les niveaux d'énergie magnétique. La Figure 15 montre l'effet du quadripôle électrique sur la levée de la dégénérescence des transitions d'un noyau quadripolaire exposé à un champ magnétique externe.

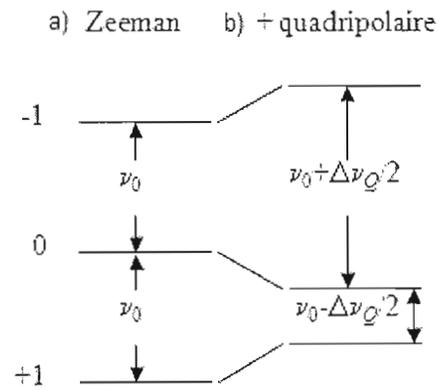


Figure 15 : Diagramme des niveaux d'énergie d'un noyau de spin 1 (a) effet Zeeman (b) effet Zeeman et effet du couplage quadripolaire lors de l'exposition à un champ magnétique externe. Tiré et modifié de Marcotte, 2008.

Comme on peut le constater dans la figure précédente, l'écart d'énergie entre les trois états de spin ($1 \rightarrow 0$ et $0 \rightarrow -1$) n'est pas le même et un doublet apparaît sur le spectre de RMN (Figure 16).

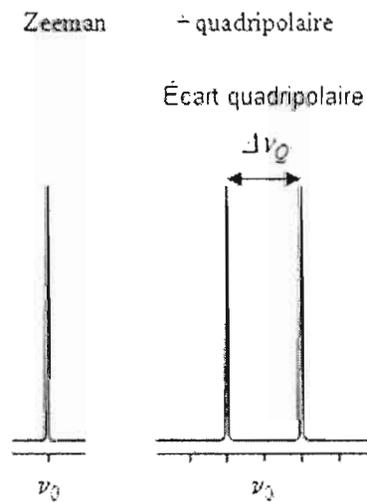


Figure 16 : Effet du quadripôle électrique sur l'allure du spectre de RMN lorsqu'un noyau quadripolaire est exposé à un champ magnétique externe (Marcotte & Arnold, 2009).

2.1.1.4. Rotation à l'angle magique

Dans la plupart des analyses de RMN conventionnelles en solution, la molécule tourne rapidement sur elle-même ce qui a pour conséquence d'annuler les effets de l'anisotropie de déplacement chimique et des couplages dipolaires. Ces mouvements isotropes rapides conduisent à des raies étroites centrées sur une valeur de déplacement chimique caractéristique (Burnell et al., 1980). Par exemple, les spectres de RMN des phospholipides dissouts dans le chloroforme sont caractérisés par des raies étroites. Toutefois, lorsque les échantillons sont animés par des mouvements lents comme c'est le cas pour les vésicules multilamellaires en milieu aqueux, la fréquence effective d'un noyau dépendra de son positionnement dans le système (ADC) et des noyaux avoisinants (couplages). On observera donc un élargissement des raies lors d'une analyse de RMN jusqu'à l'obtention d'un spectre de « poudre » (Figure 17).

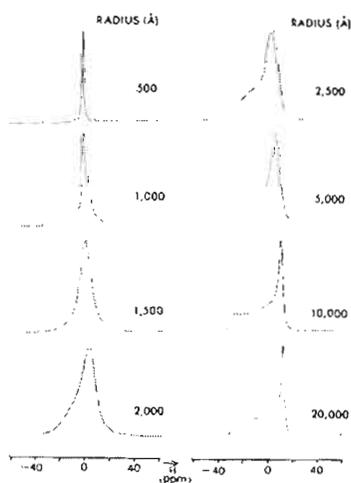


Figure 17 : Spectres simulés de RMN du phosphore-31 de vésicules en fonction de leur taille. Les petites vésicules sont caractérisées par des mouvements rapides et une raie isotrope est observée sur le spectre de RMN. Une augmentation du rayon des vésicules conduit à une diminution des mouvements jusqu'à l'obtention d'un spectre de « poudre » (Burnell et al., 1980).

La forme du spectre de poudre nous renseigne sur les mécanismes et la dynamique de la réorientation moléculaire au sein de ces systèmes. Toutefois, si l'on veut quantifier l'effet d'une molécule sur les différents lipides composant les vésicules multilamellaires, il est possible d'annuler l'effet des interactions anisotropes. En effet, ces interactions sont dépendantes de l'orientation de la molécule par rapport à la direction du champ magnétique B_0 et l'ADC est reliée au spectre par :

$$\Delta\nu(\theta) = \frac{2}{3} \Delta\sigma \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \quad (2.6)$$

où $\nu(\theta)$ est la fréquence, exprimée en Hertz ou en ppm et $\Delta\sigma$ est l'ADC. Selon l'équation 2.6, la fréquence dépend de l'orientation θ du noyau dans le champ magnétique. Ainsi, l'effet de la dépendance angulaire pourra être annulé si l'échantillon subit une rotation rapide à un angle de 54.7° par rapport à l'orientation du champ magnétique. Cette technique est appelée rotation à l'angle magique (MAS, magic angle spinning). Il est aussi important de noter que l'ADC dépend aussi de l'intensité du champ magnétique et il faut donc ajuster la fréquence de rotation en fonction de B_0 . Plus B_0 sera fort, plus il faudra faire tourner rapidement l'échantillon.

Au contraire de l'ADC, les interactions dipolaires ne sont pas affectées par la force du champ magnétique externe. L'annulation complète de l'effet d'interactions dû à des couplages dipolaires ou quadripolaires est possible si l'échantillon subit une rotation supérieure au temps caractéristique (ω_D) de l'interaction.

$$\omega_D = \frac{\mu_0}{4\pi} \times \frac{\hbar\gamma_1\gamma_2}{r_{12}^3} \quad (2.7)$$

Toutefois, lorsque l'on est en présence de couplages dipolaires homonucléaires ou quadripolaires forts, les interactions ne sont pas complètement moyennées.

2.1.2. RMN du phosphore-31 dans l'étude des membranes

Il est possible d'étudier les phospholipides dans leur ensemble puisque tous les noyaux composant ces molécules possèdent au moins un isotope ayant un spin non nul. Les principaux noyaux observés lors de l'étude des systèmes membranaires sont le phosphore localisé dans la tête polaire des phospholipides et le deutérium des chaînes acyle deutérées (section 2.1.3). L'utilisation du phosphore-31 pour ce type d'investigation est favorisée par une abondance naturelle de 100 % et un rapport gyromagnétique élevé (Seelig, 1980).

2.1.2.1. RMN statique du ^{31}P

L'allure du spectre de RMN statique du ^{31}P de phospholipides composant les vésicules multilamellaires (Figure 18) sera le résultat de l'anisotropie de déplacement chimique. Le terme $(3 \cos^2 \theta - 1)$ de l'équation 2.5 ne s'annule pas puisque les temps de corrélation caractérisant ces systèmes sont lents dû au large rayon des vésicules. Étant donné que l'énergie du couplage dipolaire dépend de la distance internucléaire, les interactions dipolaires homonucléaires ^{31}P - ^{31}P (distance internucléaire de 5 Å) pourront être négligées par rapport aux interactions hétéronucléaires ^{31}P - ^1H (2 Å) (Chan et al., 1981). Le couplage dipolaire ^{31}P - ^1H aura pour effet d'élargir le spectre. Ces interactions sont toutefois partiellement moyennées par les mouvements des phospholipides au sein des vésicules. Il est aussi possible de les supprimer complètement par découplage des protons. Le découplage consiste à irradier avec un haut champ de radiofréquences les noyaux responsables des couplages dipolaires avec le noyau d'intérêt. Dans ces conditions, seule l'anisotropie de déplacement chimique gouvernera l'allure du spectre de RMN.

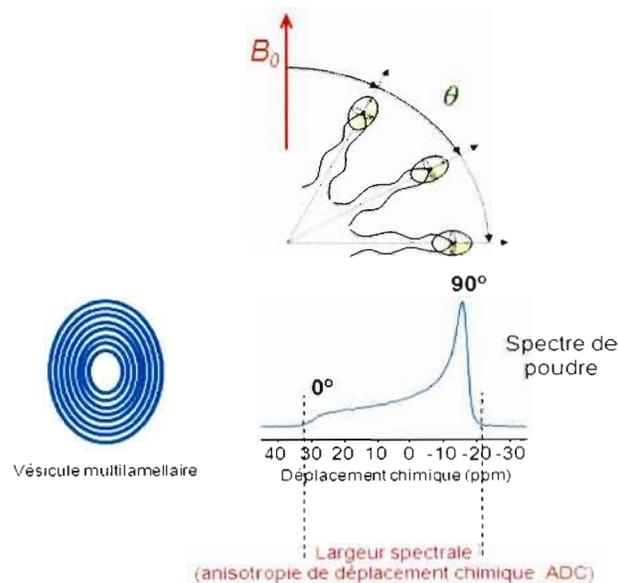


Figure 18 : Spectre statique de RMN du phosphore-31 d'un phospholipide dans une vésicule multilamellaire (Marcotte & Arnold, 2009).

Toutes les orientations des phospholipides par rapport à B_0 ont une fréquence de résonance caractéristique et l'intensité de chaque fréquence sera proportionnelle à la quantité de phospholipides ayant cette orientation. Dans le cadre de cette étude, les phospholipides orientés à 0° et 90° par rapport à la direction du champ magnétique seront identifiés par δ_{\parallel} et δ_{\perp} respectivement. Il est aussi important de noter que les mouvements des phospholipides au sein des membranes modèles induisent une moyenne partielle de l'anisotropie de déplacement chimique. Dans le cas des vésicules multilamellaires, les mouvements rapides de rotation axiale des phospholipides autour de leur axe longitudinal seront la principale cause de la diminution de l'ADC (Cevc, 1993). Une diminution de l'ADC est donc synonyme d'une augmentation de la dynamique au niveau de la tête polaire des lipides. Par conséquent, la RMN statique du ^{31}P nous renseigne sur la dynamique des membranes phospholipidiques

2.1.2.2. RMN du ^{31}P en rotation à l'angle magique

Le spectre de RMN du ^{31}P de vésicules multilamellaires subissant une rotation à l'angle magique est caractérisé une raie isotrope centrée au déplacement chimique isotrope (δ_{iso}) du phospholipide. Le déplacement chimique est exprimé en partie par million (ppm) par rapport à l'acide phosphorique 85 % (référence fixée à 0 ppm). La position de la raie isotrope nous renseigne entre autres sur l'environnement chimique du noyau. En effet, un changement de fréquence du δ_{iso} peut être attribuée à une modification de l'environnement électronique (blindage/déblindage) du noyau phosphore. De plus, l'apparition d'une raie isotrope sur des spectres RMN statiques nous informe de l'augmentation du degré de perturbation des vésicules.

2.1.3. RMN du deutérium dans l'étude des membranes

L'étude de la région hydrophobe des systèmes membranaires est possible grâce au marquage (^2H) sélectif des chaînes acyle des phospholipides. De plus, l'échelle de temps de la RMN du deutérium (microsecondes) est idéale pour l'étude des mouvements de la membrane (Davis, 1983). Le remplacement des protons par des deutérons est nécessaire dû à l'importance des interactions dipolaires homonucléaires (^1H - ^1H) et hétéronucléaires (^1H - ^{13}C) (Seelig, 1977). La présence des couplages complique l'allure du spectre de RMN et rend l'interprétation fastidieuse.

Le deutérium a une valeur de spin égale à 1 et est donc un noyau quadripolaire. L'écart quadripolaire $\Delta\nu_Q$ (la distance entre les doublets) dépend de l'orientation du lien carbone-deuteron (C-D) par rapport à la direction de B_0 . La Figure 19 illustre l'impact de cette dépendance orientationnelle sur l'allure du spectre de RMN.

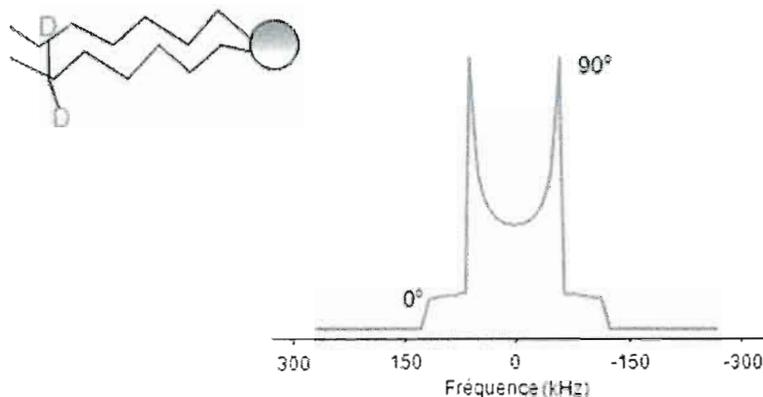


Figure 19 : Éclatement quadripolaire $\Delta\nu_Q$ d'un lien C-D en fonction de l'orientation du vecteur internucléaire par rapport à B_0 . Cas d'une vésicule immobile. (Marcotte & Arnold, 2009).

L'éclatement quadripolaire des liens C-D d'un phospholipide au sein d'une vésicule multilamellaire est donné par :

$$\Delta\nu_Q(\delta) = \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} (3 \cos^2 \theta - 1) S_{CD} \quad (2.8)$$

où $\Delta\nu_Q$ est l'éclatement quadripolaire du deutérium, $e^2 q Q/h$ est la constante de couplage quadripolaire pour un lien C-D (~167 kHz), θ est l'angle entre la normale de la bicouche et la direction du champ magnétique externe et S_{CD} est le paramètre d'ordre orientationnel (Seelig, 1980; Davis, 1983). L'écart quadripolaire dépend de la dynamique et de l'orientation des lipides dans une bicouche (Seelig, 1977). Le spectre de RMN du ^2H renseigne donc sur le degré d'ordre d'un lien C-D en particulier ou de l'ensemble des liens C-D de la membrane. De plus, les deutérons situés au bout des chaînes acyle sont caractérisés par une plus grande gamme de mouvements comparativement aux deutérons près de la tête polaire. L'augmentation des mouvements due à la diminution des contraintes stériques implique une augmentation

du désordre conformationnel qui peut se traduire par une augmentation des défauts gauches sur les chaînes acyle. L'éclatement quadripolaire des deutérons sera donc de plus en plus moyenné en s'éloignant de la tête polaire (Figure 20).

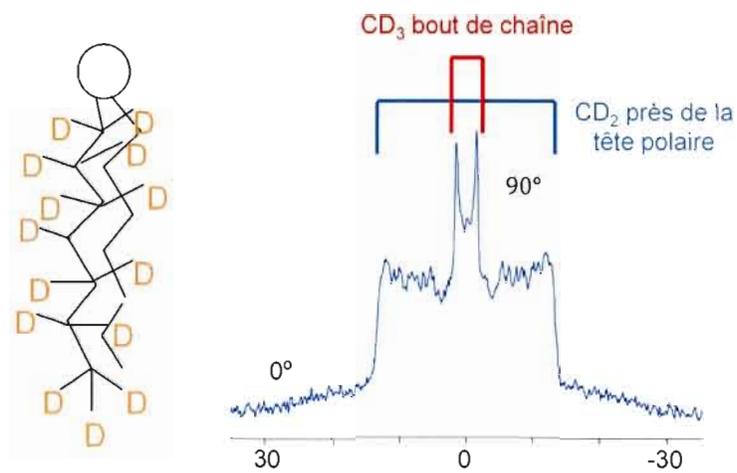


Figure 20 : Éclatement quadripolaire $\Delta\nu_Q$ d'un lien C-D en fonction de son positionnement sur la chaîne acyle (Marcotte & Arnold, 2009).

Le suivi des variations de $\Delta\nu_Q$, suite à l'ajout de molécules, permet d'évaluer si ces dernières ont induit des changements d'ordre au sein de membranes lipidiques.

2.2. Étude des systèmes biologiques par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Dans le cadre de ce projet, la spectroscopie IRTF permet d'étudier, en complément à la RMN du ^2H , la région hydrophobe de la membrane. Elle permet l'étude des systèmes phospholipidiques en milieu aqueux (Seydel & Wiese, 2002).

2.2.1. Théorie générale

La spectroscopie infrarouge permet l'étude des mouvements (ex : élongation, déformation) des différentes liaisons chimiques des molécules. Pour ce faire, l'échantillon est exposé à une radiation électromagnétique couvrant une région spectrale donnée (ex. : moyen infrarouge: entre 4000 et 400 cm^{-1}) (Rouessac & Rouessac, 2000). L'absorption de la radiation induit des transitions entre les niveaux de vibrations des molécules. La fréquence des mouvements de vibrations d'une liaison chimique dépend de la conformation et de la composition du lien chimique (Mendelsohn & Mantsch, 1986). Ainsi, les mouvements d'élongation et de déformation des liaisons chimiques ont une fréquence d'absorption caractéristique. Le spectre infrarouge d'une molécule donnée sera donc caractérisé par l'apparition de bandes d'absorption due aux mouvements des différents liens moléculaires. Cette propriété de la spectroscopie IR fait en sorte qu'il est possible d'étudier simultanément différentes régions du phospholipide. De plus, l'utilisation d'un lipide avec des chaînes acyle deutérées et d'un second lipide protoné dans un mélange de phospholipides permet le suivi des chaînes hydrophobes de deux lipides simultanément. La substitution isotopique n'affecte pas les constantes de force du lien, mais la variation de masse implique des fréquences d'élongations différentes (Mendelsohn & Mantsch, 1985).

La fréquence d'absorption ou nombre d'ondes de certains mouvements d'élongation est dépendante de la température de l'échantillon. Par exemple, la fréquence de certains mouvements d'élongation de la phosphatidylcholine est dépendante de la température (Lee & Chapman, 1986). Le suivi de la fréquence d'absorption en fonction de la température permet de tracer une courbe de thermotropisme révélatrice du changement de conformation des lipides. Comme le montre la Figure 21, les lipides étudiés peuvent adopter deux phases : la phase gel (L_{β}') exempte de défauts *cis* et la phase liquide cristalline (L_{α}).

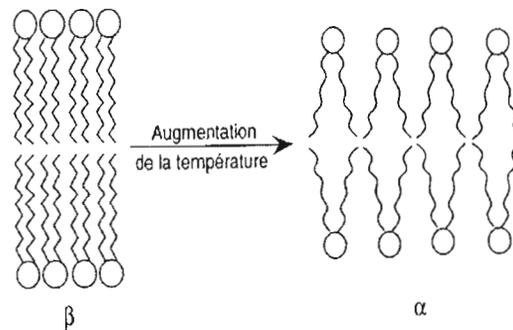


Figure 21 : Schématisation de la transition de phase de phospholipides organisés en bicouches lamellaires : passage de la phase gel (L_{β}') à la phase liquide cristalline (L_{α}) induit par une augmentation de la température (Vance & Vance, 2002).

La transition de phase s'accompagne d'une augmentation des mouvements dus au désordre conformationnel. La fréquence d'absorption observée sur le spectre augmentera donc de concert (Figure 22). La température à laquelle la transition s'effectue (T_m , melting temperature), observable sur la courbe de thermotropisme, est caractéristique à chaque phospholipide. Toutefois, d'autres facteurs comme l'addition d'un élément perturbateur (ex. : protéine, médicament, etc.) peuvent accélérer, ralentir ou changer cette transition.

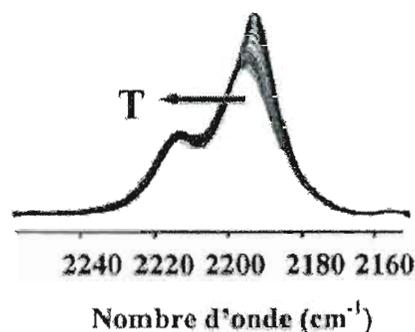


Figure 22 : Thermotropisme de la bande d'élongation CD_2 asymétrique (Cronier, 2006)

Dû à l'absorption de l'eau, il est préférable d'utiliser du D_2O lors d'analyses infrarouge de systèmes lipidiques (Mendelsohn & Mantsch, 1985). En effet, au contraire de l'eau les bandes d'absorption du D_2O n'interfèrent pas avec la majorité des bandes d'intérêt.

2.2.2. Fréquence d'élongation des chaînes acyle

Dans le cadre de ce projet, seules les bandes de vibrations associées aux mouvements d'élongation symétrique et asymétrique des groupements CH_2 (CD_2) ont été étudiées afin de sonder l'ordre global des chaînes hydrocarbonées. Le suivi des fréquences d'élongation du groupement méthyle (ν_{CH_2}) permet une mesure qualitative du niveau d'ordre des chaînes acyle. Suite à la transition de la phase gel à liquide cristalline, les fréquences d'élongation symétrique ($\nu_{sym} CH_2$) et asymétrique ($\nu_{asym} CH_2$) des groupements méthyle augmentent de ~ 2849 à ~ 2853 cm^{-1} et de ~ 2917 à ~ 2923 cm^{-1} respectivement (Tamm & Tatulian, 1997). La fréquence des modes d'élongation CD_2 symétrique et asymétrique est aussi dépendante de la conformation

du lipide. Le suivi de la fréquence des bandes d'élongation des groupements méthyle en fonction de la température permet de tracer la courbe de thermotropisme des lipides étudiés. L'analyse de cette courbe permet de déterminer la température de transition des lipides et de connaître les changements induits par la présence d'un médicament.

3. The effect of pharmaceutical formulations on drug-membrane interactions – the case of fluvastatin by solid-state NMR and infrared spectroscopy

Article soumis à: Chemistry and Physics of Lipids (# de manuscrit: CPL-D-09-00027)

Germain Larocque^{1,2}, Alexandre A. Arnold¹, Yves Mouget² and Isabelle Marcotte^{1*}

¹*Department of Chemistry, PharmaQAM / NanoQAM, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown Station, Montreal (Quebec), Canada H3C 3P8*

²*Corealis Pharma Inc., 141 President-Kennedy Avenue, Suite SB-6520, Montreal (Quebec), Canada H2X 3Y7*

*Address correspondence to:

Isabelle Marcotte, Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown Station, Montreal (Quebec) Canada, H3C 3P8.

Phone: 1-514-987-3000 #5015

Fax: 1-514-987-4054

E-mail: marcotte.isabelle@uqam.ca

Keywords: Solid-state NMR; Infrared spectroscopy; Fluvastatin; Pharmaceutical formulation; Drug-membrane interaction; Drug bioavailability

Contribution : J'ai effectué la totalité des manipulations et écrit la première version complète de l'article.

3.1. Abstract

The choice and dosage of excipients in the pharmaceutical formulation of orally administered drugs are important because they can affect the absorption and subsequent drug bioavailability. Passive transfer/transport through intestinal cell walls is the main absorption mechanism of drugs and involves an interaction with the membrane lipids. In that context, we have investigated the effect of an excipient (NaHCO_3) on the interaction of fluvastatin sodium (FS) with model membranes by solid-state NMR and Fourier transform infrared spectroscopy. Model enterocyte membranes were composed of DMPC with 10 mol% DMPS. Our results show that FS induces segregation between the anionic and zwitterionic lipids, and that this effect is thwarted by increasing amounts of the excipient. Interestingly, the excipient showed only minor effects on the drug/membrane interaction with pure DMPC bilayers. This work shows the impact of excipients on drug/membrane interactions and stresses the importance of the model membrane composition in their study.

3.2. Introduction

Prediction of the bioavailability of a new chemical entity (NCE) during the development of a drug product is a major concern due to the phenomenal cost associated with the process (Palm et al., 1997). A large number of molecules do not reach the market due to poor biopharmaceutical properties such as stability, solubility and particularly permeability in the gastro-intestinal tract (Hämäläinen & Frostell-Karlsson, 2004). Several articles have discussed the impact of those properties on the absorption of oral dosage forms (Hidalgo, 2001; Martinez & Amidon, 2002). Oral administration of solid dosage forms is the principal route for most clinical applications, and for this reason, computational models based on molecular characteristics have been developed in order to estimate drug absorption in relevant biological membranes such as the blood brain barrier and the intestinal walls (van de Waterbeemd et al.,

2003). The absorption potential of new chemical entities can also be evaluated using *in vitro* model systems such as the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) (Kansy et al., 1998) and human colon carcinoma cell lines (Caco-2) (Hidalgo et al., 1989). In 1995, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) introduced the Biopharmaceutical Classification System (BCS) in order to classify drugs in terms of solubility and intestinal permeability (Davis, 2005). This system allows pharmaceutical chemists to predict whether the bioavailability of a drug will be either limited by its solubility, its intestinal permeability, or both. However, insufficient bioavailability of a NCE that may have a significant therapeutic potential can sometimes be improved with a suitable pharmaceutical formulation. Therefore, the contribution of the excipients on the absorption and subsequent bioavailability should be studied during the development process of a new drug (Jackson et al., 2000).

Excipients are added to pharmaceutical formulations to modify the physical or chemical environment of the NCE. Unfortunately, the benefits of an excipient can sometimes adversely affect the drug bioavailability. For example, the addition of certain sugar alcohols (e.g. mannitol) to the formulation of slow dissolving drugs most often reduce their bioavailability (Martinez & Amidon, 2002). Those compounds are known to decrease the gastro-intestinal transit time, thus compromising the therapeutic effect because of an insufficient drug concentration at the target site (Avdeef, 2003). Clearly, the optimization of the excipient-drug combination in early drug development phases should both stabilize the NCE and improve its bioavailability. There is, thus, no doubt that this task would be facilitated by better understanding the interactions of excipients and drugs with the relevant biological barriers (Lennernäs & Lundgren, 2004).

In that context, we have studied the effect of an excipient on the interaction of fluvastatin (FS) with model enterocyte membranes by solid-state nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared spectroscopy. Sodium bicarbonate is combined with FS in order to maintain an alkaline pH that prevents the degradation of the drug (Kabati & Vivilecchia, 1994). Fluvastatin was selected as a statin representative because it represents a class of drugs amongst the most extensively sold on the international market (Davidson & Toth, 2004; Herper & Kang, 2006). This drug is a synthetic inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA)

reductase. The conversion of HMG-CoA into mevalonate by this enzyme is the first step leading to the biosynthesis of the cholesterol (Sarr et al., 2008a). The structure of FS is presented in Figure 23. This molecule is amphiphilic and negatively-charged at physiological pH. Its great permeability through jejunum cell walls has been related to its favorable octanol/water partition coefficient (Lindahl et al., 1996).

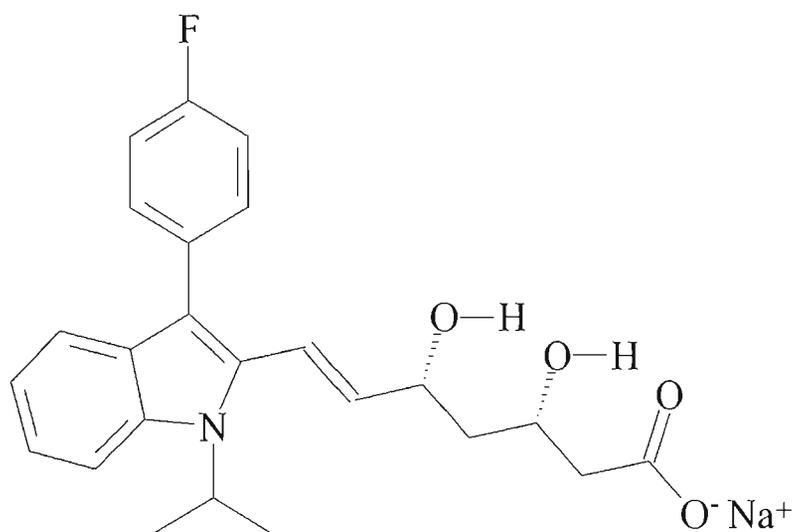


Figure 23 : Chemical structure of Fluvastatin Sodium (FS).

Biological membranes are natural lipid-rich bilayers that preserve the intracellular contents from the external milieu. These membranes include the epithelial barrier of the small intestine where most of the nutrients and drug absorption takes place, mainly via a passive permeation mechanism (Camenisch et al., 1996; Seo et al., 2006). The lipid composition of biological membranes is different from one tissue to another (Avdeef, 2003) but overall, glycerophospholipids represent the most common and frequently encountered structural lipids in eukaryotic membranes. Phosphatidylcholine is the most abundant phospholipid, accounting for more than 50% of the phospholipids (van Meer et al., 2008) and must be considered in the composition of a model membrane. Moreover, negatively-charged phosphatidylserine (PS) is

invariably present in intestinal cell membranes with a proportion up to 13% (Avdeef, 2003). Therefore, to better understand the effect of pharmaceutical formulation on the interaction of fluvastatin with model gut membranes, biologically-relevant lipid vesicles composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylserine (DMPS) have been employed. Results were compared to model DMPC membranes in order to verify the impact of anionic lipids on the drug/membrane interaction.

Solid-state nuclear magnetic resonance (SS-NMR) has been used to shed light on the interaction of FS with the model membranes in the presence of sodium bicarbonate. Phosphorus (^{31}P) and deuterium (^2H) NMR are known to be useful tools to determine the effect of proteins (Seelig et al., 1982), peptides (Marcotte et al., 2004) and anesthetics (Castro et al., 2008) on the organization and dynamic properties of lipids. To the best of our knowledge, SS-NMR has not yet been used to study the mechanism by which the pharmaceutical formulation can modify drug-membrane interactions. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was also employed to better investigate the mechanism by which the drug and the excipient interact with the phospholipid acyl chains and to verify the occurrence of preferential interactions in phospholipid mixtures. A portrait of the interaction of fluvastatin with model intestinal cell membranes composed of zwitterionic DMPC and negatively-charged DMPS will be proposed. Most importantly, the effect of the excipient NaHCO_3 on this interaction will be discussed.

3.3. Materials and Methods

3.3.1. Materials

DMPS and DMPC with either unlabelled or deuterated (d_{54}) acyl chains were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) and used without further purification. Fluvastatin sodium was provided by Corealis Pharma Inc. (Montréal, QC, Canada). Deuterium oxide (D_2O) was obtained from CDN Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada), while deuterium-depleted water and the excipient, $NaHCO_3$ were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St-Louis, MO, USA).

3.3.2. Sample preparation

The drug and excipient were diluted in water then added to the lipid mixture to obtain a lipid-to-drug molar ratio of 25:1 and a lipid-to-excipient molar ratio of 7.5:1 if not otherwise specified. The lipid vesicles were prepared by mixing 36 mg of phospholipids in 120 μ L of water or the aqueous solution of drug and/or excipient, giving a total proportion of 23% (w/w) lipids in water. The samples underwent at least three series of freeze (liquid N_2)/thaw ($50^\circ C$)/vortex shaking cycles and were stored at $-20^\circ C$. The pH was 6 in all FS-containing samples, and increased to ~ 8 in the presence of the excipient. To allow FTIR analyses, DMPC acyl chains were completely deuterated, while 2H NMR analyses were performed using only 10 mol% of DMPC with deuterated acyl chains, the remaining 90% being completely protonated. To study the impact of FS and $NaHCO_3$ on model membranes containing negatively-charged lipids, samples we prepared with DMPC and DMPS at a molar ratio of 10:1. Interference of water on the FTIR spectra was eliminated by utilization of D_2O . ^{31}P and 2H NMR

experiments were performed with samples made of deionized and deuterium-depleted water, respectively.

3.3.3. NMR experiments

^{31}P and ^2H NMR spectra were acquired with a Bruker Avance 600 WB spectrometer (Bruker Canada Ltd., Milton, ON, Canada). For both the ^{31}P and ^2H NMR experiments, the sample was placed into a 4-mm NMR zirconium oxide rotor and the temperature was maintained at 37°C. The ^{31}P NMR spectra were obtained at 292.94 MHz using a phase-cycled Hahn echo pulse sequence with gated broadband proton decoupling (Rance & Byrd, 1983). 4K data points were recorded and typically 1K scans were acquired with a 90° pulse length of 4.5 μs , an interpulse delay of 40 μs , and a recycle delay of 3 s. A line broadening of 50 Hz was applied to all spectra. For the magic-angle spinning (MAS) experiments, the samples were spun at a frequency of 10 kHz, and a line broadening of 10 Hz was applied to all spectra. The chemical shifts were referenced relative to external H_3PO_4 85% (0 ppm). The ^2H NMR experiments were carried out at 92.13 MHz using a quadrupolar echo sequence (Davis et al., 1976). The 90° pulse length was 4.1 μs with an interpulse delay of 40 μs . 5000 scans were acquired using 16K data points, and the recycle time was set to 500 ms. A line broadening value of 100 Hz was applied to the spectra. All data were processed using the matNMR processing toolbox (van Beek, 2007). DePaking of the ^2H NMR spectra was performed using a program kindly provided by P. Audet (Université Laval) and based on Bloom et al. (Bloom et al., 1981), integrated to the software Grams/AI version 7.02 (Galactic Industries Corporation, Waltham, MA, USA).

3.3.4. FTIR experiments

Infrared spectra were recorded with a Nicolet Nexus 670 Fourier transform spectrometer (Thermo-Nicolet, Madison, WI, USA) equipped with a narrow-band mercury-cadmium-telluride (MCT) detector and a germanium-coated KBr beam splitter. Twenty microliters of the sample were placed between CaF₂ windows separated by a 6 μm Mylar spacer. A total of 100 interferograms were acquired with a resolution of 2 cm⁻¹ in the spectral range of 4000-650 cm⁻¹ at various temperatures ranging from 15 to 50°C. The spectra were corrected for water vapor and CaF₂ contribution by subtraction of a reference spectrum. The data were processed with the software Grams/AI mentioned above. The spectral region corresponding to the carbon-hydrogen and carbon-deuterium stretching vibrations were baseline-corrected using a linear function.

3.4. Results

3.4.1. Phosphorus-31 NMR

Because phosphorus-31 nuclei have a 100% natural abundance and a high gyromagnetic ratio, ³¹P NMR stands as a unique tool to study the motion and average orientation of the phosphate group in model phospholipid membranes. Since the electron cloud that surrounds phosphorus nuclei is not evenly distributed, the ³¹P resonance frequency (and resulting chemical shift) will be a function of the phospholipid orientation with respect to the magnetic field. The chemical shift anisotropy (CSA), which reflects the spread of NMR frequency with orientation, can be measured from the powder spectrum of non-oriented static samples. Dynamic information can be extracted from the CSA measurement as increased motion of the

phospholipids will lead to its partial averaging. We have used ^{31}P SS-NMR spectroscopy to investigate the effects of FS and the excipient NaHCO_3 on the polar region of the lipid bilayer at physiological temperature.

In the liquid crystalline phase, membrane phospholipids rapidly rotate around their longitudinal axis. This motion averages the chemical shift tensor, and the resulting spectra are axially-symmetric powder patterns which can be characterized by the chemical shift anisotropy ($\Delta\sigma$) and the isotropic chemical shift (σ_{iso}). These two quantities can be expressed as, following the notation of Seelig (Seelig, 1978):

$$\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} \quad (3.1)$$

$$\sigma_{iso} = \frac{1}{3}(\sigma_{\parallel} - 2\sigma_{\perp}) \quad (3.2)$$

where σ_{\parallel} and σ_{\perp} are the chemical shifts respectively obtained for parallel and perpendicular orientations with respect to the magnetic field direction. These expressions can be rearranged to obtain:

$$\Delta\sigma = 3\sigma_{iso} - \sigma_{\perp} \quad (3.3)$$

The value of σ_{iso} can be determined from the ^{31}P NMR spectra acquired by magic-angle spinning of the sample, while σ_{\perp} is obtained by measuring the chemical shift of the 90° edge of the static ^{31}P NMR spectra at 90% of the maximum intensity (Picard et al., 1999). Expression (3.3) allows the calculation of the CSA for different membrane samples in the liquid crystalline phase.

3.4.1.1. Static experiments

The changes induced on the phospholipid headgroups by the drug and the excipient have been studied by static and MAS ^{31}P NMR, and the spectra are displayed in Fig. 24 and 25. Effects on model enterocyte membranes composed of DMPC with 10 mol% DMPS are compared to pure DMPC bilayers in order to highlight any impact of the presence of negatively-charged lipids in the natural gut cell membranes. Table 2 presents the ^{31}P NMR CSAs and full widths at half height (FWHH) of the different systems. The CSAs are calculated as described above using the spectra presented in Fig. 24 and 25.

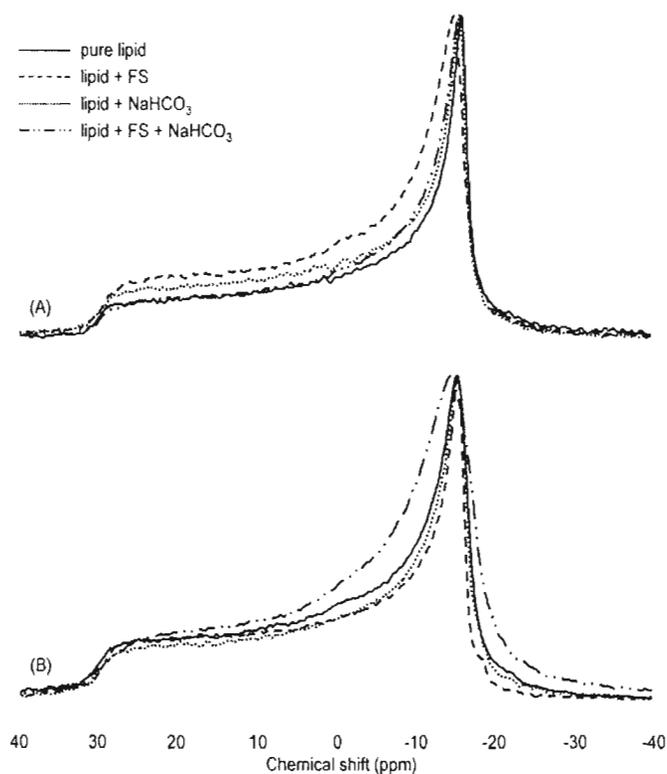


Figure 24 : ^{31}P NMR spectra of the model membranes at 37°C with and without fluvastatin and sodium bicarbonate at lipid-to-FS and lipid-to- NaHCO_3 molar ratios of 25:1 and 7.5:1, respectively. (A) DMPC, and (B) DMPC/DMPS.

All spectra presented in Fig. 24 are characteristic of a lamellar phase with axial symmetry (Smith & Ekiel, 1984). A small shoulder can be observed on DMPC/DMPS spectra (Fig. 23B) which can be attributed to the 90° edge of DMPS which has a larger powder pattern (Marcotte et al., 2004). When the drug, its excipient or both are added to the membranes, no isotropic component at ~0 ppm - indicative of the presence of fast reorienting structures - could be detected on the spectra of Fig. 24A and 24B. Except for the addition of FS which reduces the CSA of DMPC by ~6%, no major changes on the CSA of this lipid can be observed (Fig. 24A and Table 2) in pure DMPC membranes. Moreover, the presence of the excipient reduces this effect of the drug on the CSA by ~5%.

The effect of FS and NaHCO₃ on DMPC/DMPS vesicles is shown in Fig. 24B. No major lineshape or CSA changes are observed upon the addition of the drug and the excipient separately. However, a slight sharpening of the peaks can be observed, akin to an increase in transverse relaxation (T₂). When both the drug and the excipient are present, the CSA shows a small decrease (-3%) and the spectrum is globally broadened indicating a decrease in T₂.

Tableau 2 : Effect of fluvastatin and the excipient NaHCO₃ on the ³¹P chemical shift anisotropy (CSA), isotropic chemical shift (δ_{iso}), and full width at half height (FWHH) of the isotropic resonance of DMPC in pure DMPC and DMPC/DMPS model membranes at 37°C.

System	Molar ratio	CSA (ppm)	δ_{iso} (ppm)	FWHH (ppm)
DMPC	N/A	45.8	-0.87	0.25
DMPC : FS	10 : 0.2	43.0	-0.87	0.26
DMPC : NaHCO ₃	10 : 0.6	44.9	-0.87	0.16
DMPC : FS : NaHCO ₃	10 : 0.2 : 0.6	45.2	-0.87	0.20
DMPC : DMPS	10 : 1	43.7	-0.87	0.19
DMPC : DMPS : FS	10 : 1 : 0.2	44.2	-0.85	0.19
DMPC : DMPS : NaHCO ₃	10 : 1 : 0.6	43.8	-0.85	0.19
DMPC : DMPS : FS : NaHCO ₃	10 : 1 : 0.2 : 0.6	42.5	-0.85	0.23

3.4.1.2. Magic-angle spinning experiments

Additional information on the interaction of FS and NaHCO₃ with the phospholipid headgroups in pure DMPC or DMPC/DMPS bilayers can be obtained with ³¹P NMR spectra acquired under MAS conditions. These consist of a fast rotation of the sample at an angle of 54.7° with respect to the magnetic field. As a consequence, the anisotropic part of the chemical shift is averaged out. The resulting isotropic chemical shift is characteristic of each phospholipid but most importantly also depends on the surrounding environment. It is thus possible to verify shielding/deshielding effects of FS and NaHCO₃ on the lipid phosphate region by monitoring changes in the isotropic chemical shift value. In addition, drug- or excipient-induced changes in headgroup dynamics can lead to changes in the FWHH of the isotropic resonances obtained by MAS.

Fig. 25A and 25B show the ³¹P MAS spectra acquired at 37°C for DMPC and DMPC/DMPS vesicles, respectively. The dominant peak centered at -0.87 ppm in Fig. 25B corresponds to DMPC while the small peak at circa -0.24 ppm and not fully resolved is assigned to phosphatidylserines present in lower proportions (Marcotte et al., 2004). As substantiated in Table 2, no significant changes in the isotropic chemical shift value (δ_{iso}) were detected on DMPC in either membrane systems upon separate or combined addition of FS and NaHCO₃. This suggests a lack of or an undetectable shielding/deshielding effect of the drug and its excipient on the phosphorus nuclei of the lipid phosphate region. Table 2 also shows that the full width at half height of DMPC (Fig. 25A) isotropic resonance is practically unchanged when FS is incorporated to the lipid dispersion, whereas a decrease of ~36% is observed when NaHCO₃ is present. When both the drug and excipient are added to the DMPC vesicles, the FWHH of the isotropic peak is reduced by ~20%.

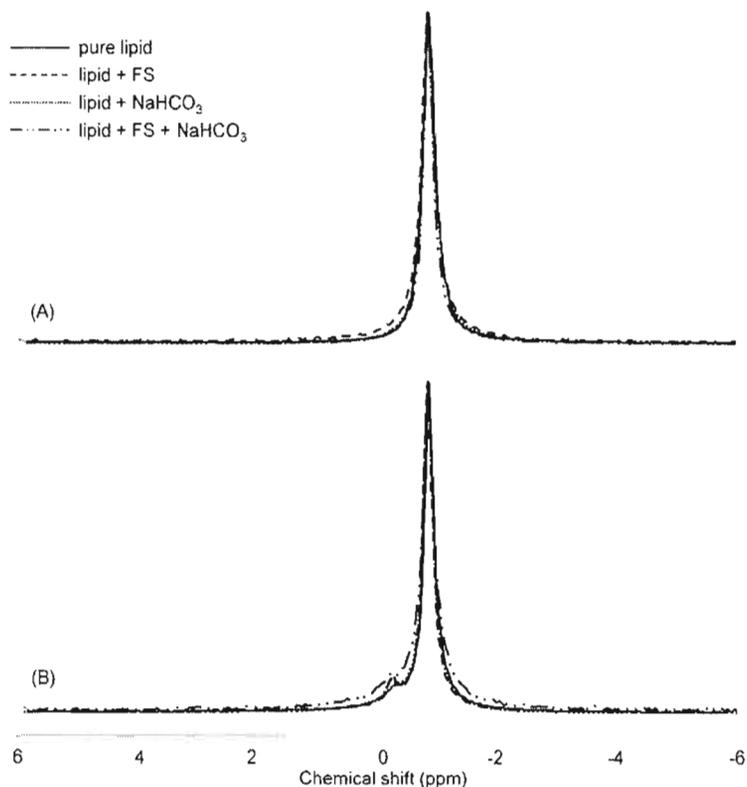


Figure 25 : ^{31}P MAS NMR spectra of the model membranes at 37°C with and without fluvastatin and sodium bicarbonate at lipid-to-FS and lipid-to- NaHCO_3 molar ratios of 25:1 and 7.5:1, respectively. (A) DMPC, and (B) DMPC/DMPS.

The results obtained with DMPC- d_{54} /DMPS (Fig. 25B) show that FS leaves the FWHH of DMPC unchanged. Interestingly, the decrease of the FWHH when NaHCO_3 is added to the DMPC bilayers is no longer observed. When FS and NaHCO_3 are co-mixed to the model enterocyte DMPC/DMPS membranes, the FWHH increases by $\sim 17\%$, in good agreement with the increase in linewidth on the static spectrum.

3.4.2. Deuterium NMR

The interaction of FS and the excipient NaHCO₃ with the hydrophobic region of the lipid bilayer was studied by ²H NMR at 37°C using phosphatidylcholines with deuterated acyl chains (DMPC-d₅₄). The degree of organization along these chains is reflected by changes of the quadrupolar splitting ($\Delta\nu_Q$) value of a given C-D bond. The quadrupolar splitting for a C-D bond in a lipid bilayer system with axial symmetry is given by:

$$\Delta\nu_Q(\delta) = \frac{3}{4} \frac{e^2qQ}{h} (3 \cos^2\theta - 1) S_{CD} \quad (3.4)$$

where e^2qQ/h is the quadrupole coupling constant (~167 kHz), θ is the angle between the bilayer normal and the magnetic field, and S_{CD} is the order parameter of a deuterium bond vector (Seelig, 1980; Davis, 1983). An increase in the quadrupolar splitting is indicative of an ordering effect of the drug, the excipient, or both, on the lipid acyl chains, while a decrease reflects a disordering effect (Davis, 1983).

Fig. 26A shows the ²H NMR spectra of zwitterionic vesicles made of DMPC-d₅₄. FS and NaHCO₃ were added individually or together to this membrane system. The quadrupolar splittings at the plateau and methyl regions of the lipid acyl chains obtained after dePaking are shown in Table 3. A small decrease in quadrupolar splittings is measured in the presence of FS with or without NaHCO₃, i.e. -4% and -12% for the plateau and methyl regions, respectively, suggesting more disorder within the hydrophobic region of the bilayer. The effect of FS on the lipid acyl chains thus appears to be independent of the presence of the excipient since identical $\Delta\nu_Q$ values are obtained in DMPC/FS and DMPC/FS/NaHCO₃ at both the plateau and methyl portions. Only the methyl region of the lipid chains is affected when the excipient alone is added (-1% and -4% for the plateau vs methyl region). A broadening of the resonances corresponding to deuterium nuclei near the polar headgroup is seen when

FS alone or FS/NaHCO₃ are present. This effect is not seen when the excipient is added individually.

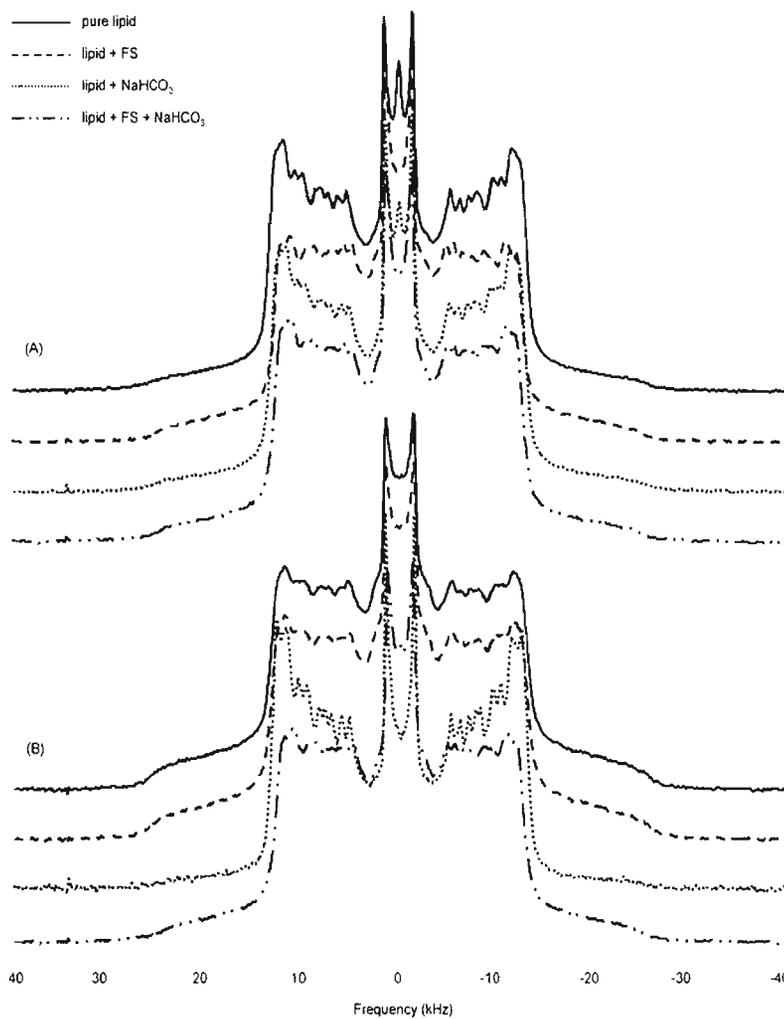


Figure 26 : ²H NMR spectra of the model membranes at 37°C with and without fluvastatin and sodium bicarbonate at a lipid-to-FS and lipid-to-NaHCO₃ molar ratios of 25:1 and 7.5:1, respectively. (A) DMPC-d₅₄, and (B) DMPC-d₅₄/DMPS.

The effects of FS and the excipient NaHCO_3 on DMPC- d_{54} in DMPC/DMPS vesicles revealed by ^2H NMR are presented in Fig. 26B. First, the introduction of 10 mol% DMPS in DMPC- d_{54} bilayers at physiological temperature decreases the resolution of the quadrupolar splittings at the different positions along the lipid acyl chains; however, the $\Delta\nu_Q$ values (plateau and methyl regions) are only very slightly decreases. As was the case in pure DMPC membranes, the plateau and methyl quadrupolar splittings of DMPC in DMPC/DMPS vesicles are decreased when FS is present. However, this disordering effect observed on the zwitterionic lipid when FS is added is less pronounced in the methyl region when 10 mol% of DMPS is in the bilayer. Interestingly, we no longer observe a decrease of the quadrupolar splitting resolution when FS is present with or without its excipient, as was the case for pure DMPC. Actually, there is no significant change in the resolution of the quadrupolar splittings on the spectra. The addition of NaHCO_3 to the DMPC/DMPS vesicles, on the other hand, greatly sharpens the resonances.

Tableau 3 : Quadrupolar splittings of the plateau ($\Delta\nu_p$) and methyl ($\Delta\nu_m$) regions of DMPC- d_{54} in pure DMPC and DMPC/DMPS model membranes at 37°C in the absence and in the presence of fluvastatin (FS) and the excipient NaHCO_3 .

System	Molar ratio	$\Delta\nu_p$ (kHz)	Difference	$\Delta\nu_m$ (kHz)	Difference
DMPC	N/A	25.9		3.2	
DMPC : FS	10 : 0.2	24.9	-4%	2.8	-12%
DMPC : NaHCO_3	10 : 0.6	25.6	-1%	3.1	-4%
DMPC : FS : NaHCO_3	10 : 0.2 : 0.6	24.9	-4%	2.8	-12%
DMPC : DMPS	10 : 1	25.8		3.1	
DMPC : DMPS : FS	10 : 1 : 0.2	25.0	-3%	2.9	-4%
DMPC : DMPS : NaHCO_3	10 : 1 : 0.6	25.8	-0%	3.2	+4%
DMPC : DMPS : FS : NaHCO_3	10 : 1 : 0.2 : 0.6	24.8	-4%	2.8	-8%

3.4.3. Fourier transform infrared spectroscopy

The thermotropic phase behavior of pure DMPC, pure DMPS, and DMPC-d₅₄ mixed to 10 mol% of DMPS has been studied in order to assess the impact of the addition of the drug and the excipient on the organization of the hydrophobic core of the phospholipids. This behavior can be obtained by plotting the frequency (in cm⁻¹) of the methylene symmetric (ν_{sym} CH₂) or anti-symmetric stretching frequencies in the acyl chains as a function of temperature (Mendelsohn & Mantsch, 1986). These stretching vibrations are sensitive to changes in the trans/gauche conformer ratio and inform on structural rearrangements in lipid bilayers such as the gel-to-liquid crystal phase transition (Casal & Mantsch, 1984; Mendelsohn & Mantsch, 1986). Moreover, the mass variation due to isotopic substitution will change the frequency of the absorption band without affecting the force constants (Mendelsohn & Mantsch, 1986). As a result, it is possible to simultaneously study the effect of the addition of FS and NaHCO₃ on both the zwitterionic and negatively charged lipids. This is done by using one lipid with deuterated acyl chains (DMPC-d₅₄) and one protonated lipid (DMPS) and monitoring the temperature dependence of both the CD₂ and CH₂ symmetric stretching vibrations. Such a study, thus, complements the information obtained on the hydrophobic core of the membranes by ²H NMR.

The changes induced by the addition of the drug and excipient on the thermotropic behavior of pure DMPC vesicles are illustrated in Fig. 27. First, the gel-to-liquid crystal phase (melting) transition temperature (T_m) of DMPC is observed at -23.5°C, consistent with the value of 23°C reported in the literature (Marsch, 1990). The small increase in the T_m value can be accounted for by the use of deuterated water (Wang & Chen, 1993). The addition of NaHCO₃ at a lipid-to-excipient molar ratio of 7.5:1 does not affect the melting temperature of the phospholipids; however, the small increase in ν_{sym} CH₂ in the L_α phase indicates some level of disordering. The presence of FS in DMPC bilayers increases the CH₂ symmetric stretching vibration frequency in both lipid phases and decreases the phase transition temperature to 22.5°C. When the drug and excipient are added to the DMPC membranes, the thermotropic behavior as

detected by infrared spectroscopy is identical to the case where FS is incorporated alone, namely an increase in $\nu_{sym}CH_2$ ($\sim 1\text{ cm}^{-1}$).

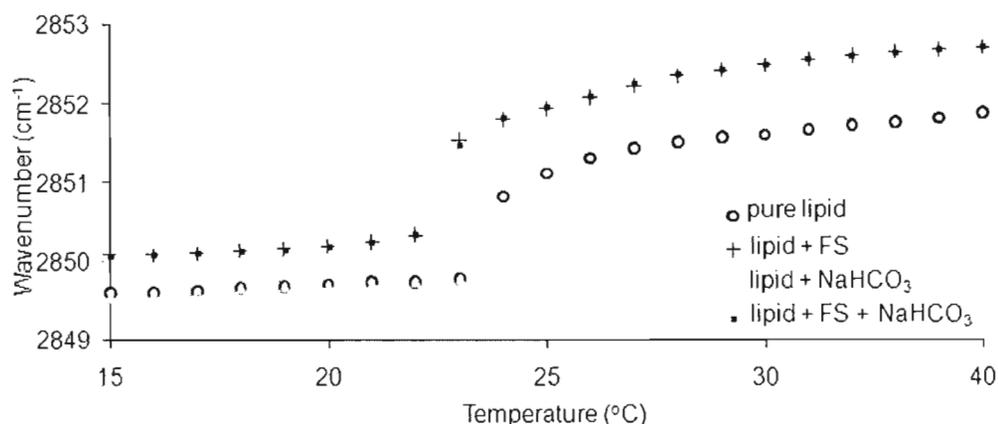


Figure 27 : Temperature dependence of the frequency of the CH_2 symmetric stretching vibration in DMPC vesicles in the absence or presence of FS and $NaHCO_3$ at a lipid-to-FS and lipid-to- $NaHCO_3$ molar ratios of 25:1 and 7.5:1, respectively.

Fig. 28 shows the impact of the presence of 10 mol% of negatively-charged DMPS in DMPC bilayers on the interaction with the drug and/or excipient. In order to better evidence the effect of $NaHCO_3$ on the drug/membrane interaction, three different lipid-to-excipient molar ratios have been employed, i.e. 15:1, 7.5:1 and 3.8:1. In particular, the effect on deuterated DMPC in the mixed vesicles can be seen on Fig. 28A which presents changes in the CD_2 stretching vibrations between 15 and 50°C. First, the transition of DMPC- d_{54} is observed at $\sim 21^\circ C$ in the pure lipid mixture. This gel-to-liquid crystal phase transition temperature is consistent with the values reported in the literature for deuterated lipids (Guard-Friar et al., 1985; Mendelsohn & Mantsch, 1986; Moore et al., 1996). The addition of $NaHCO_3$ at a lipid-to-excipient molar ratio of 7.5:1 has virtually no effect on the thermotropic behavior of this lipid. The presence of FS induces a small decrease in the melting temperature of DMPC- d_{54} . When both the drug and excipient are present in the mixture, the transition temperature is further reduced, especially at high salt concentration.

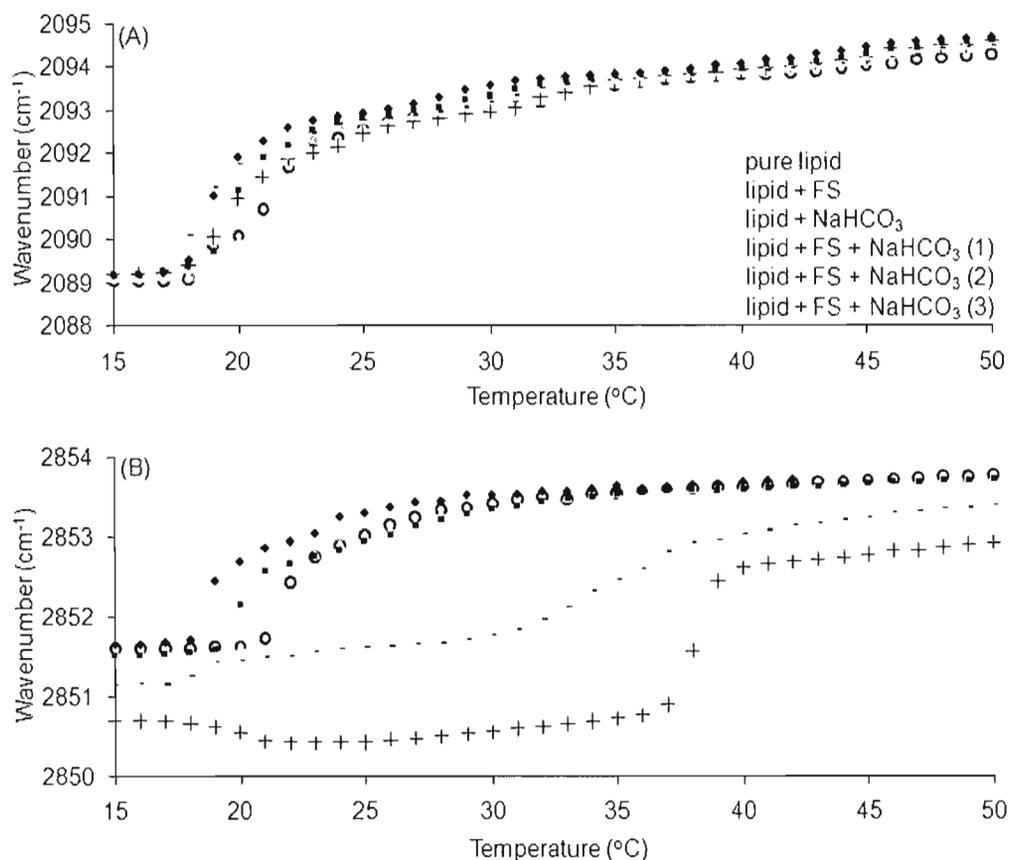


Figure 28 : Temperature dependence of the frequency of (A) the CD₂ symmetric stretching vibration of DMPC-d₅₄ and (B) the CH₂ symmetric stretching vibration of DMPS in DMPC-d₅₄/DMPS model membranes in the absence or presence of fluvastatin and sodium bicarbonate. Lipid-to-FS molar ratio of 25:1 and lipid-to-NaHCO₃ molar ratios of (1) 15:1, (2) 7.5:1, and (3) 3.8:1 were employed.

Fig. 28B presents the behavior of DMPS found in the model enterocyte membranes in the presence of FS and NaHCO₃. First, the gel-to-liquid crystal phase transition temperature of DMPS in the DMPC/DMPS (10:1) mixture is similar to that of DMPC seen in Fig. 28A, indicative of a homogeneous mixture. This temperature is identical in the presence of NaHCO₃, at a lipid-to-excipient molar ratio of 7.5:1 as for DMPC in the lipid mixture. Interestingly, we observe a dramatic increase of the gel-to-fluid phase transition temperature when FS is added individually to the model

membranes, together with a decrease ($\sim 1.5 \text{ cm}^{-1}$) of the CH_2 symmetric stretching frequency of DMPS acyl chains. More specifically, the T_m of 38°C in this case is close to the melting transition of 37°C for pure DMPS (sodium salt) (Marsch, 1990). A small transition is observed in the gel phase at $\sim 21^\circ\text{C}$, close to the T_m value of DMPC- d_{54} . The addition of the NaHCO_3 together with the drug at lipid-to-excipient molar ratios of 15:1, 7.5:1 and 3.8:1 shows a decrease of the effect of FS with increasing proportions of NaHCO_3 . At a lipid-to-excipient molar ratio of 3.8:1, the melting temperature of DMPS (19°C) is identical to that of DMPC- d_{54} in the same mixture and conditions (Fig. 28A).

3.5. Discussion

The aim of this work was to better understand the mechanism by which an excipient can affect the interaction of a drug with intestinal cell membranes, which could have an effect on the absorption and bioavailability of the drug. To do so, we have studied the interaction of fluvastatin and an excipient used in its pharmaceutical formulation - sodium bicarbonate - with model enterocyte membranes composed of DMPC and DMPS which proportions were tuned to that of natural membranes. This anti-cholesterolemic drug is known to be rapidly and completely absorbed due to the favorable biopharmaceutical properties of the molecule and possible interactions with the apical membrane of the intestinal cells (Lindahl et al., 1998). Using SS-NMR and FTIR spectroscopy, we have examined the interaction of fluvastatin with the membrane lipids, verified the impact of sodium bicarbonate as well as the contribution of the presence of negatively charged lipids on this interaction. According to our results, two different scenarios have to be examined: the case of zwitterionic membranes and that of anionic enterocyte membranes.

3.5.1. In zwitterionic membranes

The case of model zwitterionic membranes composed of pure DMPC will be considered first. The results obtained by static and MAS ^{31}P NMR (Fig. 24a and 25a) at physiological temperature show that neither fluvastatin nor sodium bicarbonate, each individually or together, has disrupting effects on this lipid system. The observed static ^{31}P NMR lineshapes are typical of lipid bilayers in the liquid-crystalline phase and the absence of an isotropic component indicates a preservation of the vesicle morphology upon addition of FS combined or not to NaHCO_3 . Only small changes in linewidth are observed for DMPC bilayers in the presence of FS suggesting a moderate perturbation of the headgroup dynamics upon drug addition. This perturbation is reduced when the drug is combined to its excipient, possibly due to the ordering effect of Na^+ ions which tend to orient PC headgroups perpendicular to the bilayer surface, as reported by Söderman et al. (Söderman et al., 1983).

The ^2H NMR experiments performed at 37°C (Fig. 26a) using deuterated DMPC confirm that the integrity of zwitterionic membranes is preserved when the drug and the excipient are present. They also show that the occurrence of FS in the bilayers has a disordering effect on DMPC acyl chains, especially at the methyl region. This effect is not modified by the presence of NaHCO_3 . These results are supported by infrared spectroscopy experiments which show both a reduction of the lipid melting temperature upon individual or mutual addition of the drug and excipient and an increase in the methylene symmetric stretching frequency (Fig. 27), indicating a perturbation of the hydrophobic core of the membrane by the drug. The broadening of the ^2H resonances observed in SS-NMR upon addition of FS could be explained by an increase in slow motions which contribute to transverse relaxation, consistent with the ^{31}P NMR results.

In light of the NMR and FTIR spectroscopy data, fluvastatin molecules are as shown to insert in the DMPC bilayers. Considering the amphiphilic nature of FS, the drug would be located at the polar/apolar interface of the bilayer, consistent with some perturbation of the headgroup dynamics. Clearly, the presence of the excipient has only a minor effect on the insertion of the drug in the bilayer composed of pure DMPC.

3.5.2. In anionic model enterocyte membranes

The portrait of the interaction of fluvastatin with model gut cell membranes emerges as being more complex than with zwitterionic bilayers. As was done with pure DMPC model membranes, ^{31}P and ^2H NMR experiments were carried out to verify the impact of the presence of negatively-charged lipids on the interaction with the drug and its excipient. The low proportion of DMPS (10 mol%) in the lipid mixture and unavailability of deuterated DMPS prevented the behavior of this lipid from being probed directly by SS-NMR. However, the FTIR experiments permitted a verification of possible effects on the negatively-charged lipids.

As observed for pure DMPC, ^{31}P and ^2H NMR spectra (Fig. 24B and 26B) indicate that the integrity of the model intestinal cell membranes of DMPC/DMPS is preserved when FS and its excipient are incorporated in the milieu. In addition, the spectral lineshapes show that DMPC is in a liquid crystal phase in the lipid mixture, as expected at 37°C for this lipid. Contrary to what was observed in the zwitterionic membranes, the ^{31}P NMR (static and MAS) data show that FS induces small dynamical changes in the lipid headgroups solely when adding NaHCO_3 . A decrease in T_2 is observed and could be attributed to an increase in slow motions which contribute to relaxation. These results suggest a specific effect of the excipient in the case of membranes containing anionic lipids.

The quadrupolar splitting values at 37°C extracted from the ^2H NMR spectra (Fig. 26B) show that the drug and the excipient induce slight disordering in the plateau and methyl regions of DMPC deuterated acyl chains. It is noteworthy that this perturbation, especially at the methyl region, is reduced when compared to the pure PC membranes, suggesting a different effect of the excipient depending on the membrane charge. However, the effect of FS on the $\Delta\nu_m$ value becomes comparable to that found in the pure DMPC system only when NaHCO_3 is added to the drug.

The effects observed by SS-NMR are confirmed by FTIR spectroscopy (Fig. 28A) which shows a reduction in the melting temperature of DMPC- d_{54} in the lipid mixture – an effect increased by the presence of the excipient. These results obtained

over a wide range of temperatures suggest that the interaction of the drug with DMPC is favored in the fluid phase (Davio & Low, 1981). Overall, in the presence of anionic lipids, the interaction of FS with the zwitterionic lipids appears to be diminished. The important effect of the excipient is to re-establish this interaction. The mechanism by which this is done will be elucidated by studying the effect on the anionic lipid, and described in the following paragraphs.

When no drug or excipient is added (Fig. 28B), the melting temperature of DMPS in the mixture is very close to that of DMPC, indicating a homogeneous mixing of the two phospholipids. Most interestingly, the addition of FS shifts the melting temperature of DMPS to 38°C, i.e. close to the value of 37°C reported in the literature for the pure lipid (Marsch, 1990). This behavior indicates drug-induced segregation between the anionic and zwitterionic lipids. More specifically, DMPC-rich parts of the membrane would undergo a gel-to-fluid phase transition at ~21°C while DMPS domains would transit at the DMPS characteristic melting temperature. Moreover, DMPS acyl chains would be more ordered in the liquid crystal phase when compared to the DMPC/DMPS mixture, as revealed by the decrease in CH₂ asymmetric stretching frequency when FS is present. The important effect of the excipient becomes clear in Fig 28B: as the excipient concentration increases, the DMPS melting temperature is gradually decreases while the zwitterionic and anionic form again a homogeneous mixture.

The small transition observed at ~21°C can be explained by the compartmentalization of DMPS molecules into gel domains. This transition is accompanied by a better ordering of DMPS acyl chains as revealed by a decrease in CH₂ symmetric stretching vibrations. This can be explained by the tighter packing of phosphatidylserines as compared to their PC analogs due to intermolecular H bonds, as detailed by Petrache et al. (Petrache et al., 2004). This could also justify the better ordering of DMPS acyl chains within the DMPS-rich domains in the liquid crystal phase as compared to DMPS in the pure lipid mixture. However, a possible ordering of the anionic lipids induced by the insertion of FS cannot be ruled out.

Our results suggest a mechanism of interaction of fluvastatin with model enterocyte membranes and a better understanding of the effect of the excipient.

Fluvastatin is a negatively charged molecule at pH 6 (no excipient) to 8 (with NaHCO_3) measured in this study (Fig. 23). It is also amphiphilic, bearing polar groups such as -OH and -F, as well as hydrophobic aromatic counterparts. When incorporated into the DMPC/DMPS membrane milieu, FS would be able to insert at the bilayer interface and form intermolecular hydrogen bonds with neighboring PS headgroups, especially the amines and phosphates since the carboxylate groups are most likely to be complexed by the Na^+ counterions of DMPS. As shown by Roux and Bloom, Na^+ tends to remain above the PS headgroup (Roux & Bloom, 1990). Phosphatidylserine ability to form hydrogen bonds was demonstrated by Lewis and McElhaney (Lewis & McElhaney, 2000) and also supported by Pandit and Berkowitz (Pandit & Berkowitz, 2002) from molecular dynamics simulations which also suggested that hydrogen bonds would occur between the NH_3^+ and the PO_4^- groups of PS. The aromatic moieties of the drug would be buried between the acyl chains.

Sodium bicarbonate is an excipient employed to protect fluvastatin from degradation (Kabati & Vivilecchia, 1994). When added to the drug in the aqueous DMPC/DMPS membrane milieu, this salt would dissociate and raise the pH value from 6 to 8, the serine headgroup being totally ionized (Marsch, 1990). The HCO_3^- could thus bind the NH_3^+ sites of the phosphatidylserines, while Na^+ ions could associate to the phosphate groups of the lipids deeper in the bilayer surface, thus limiting the available sites on PS for association or H bonding with the drug. The preferential interaction of FS would be hindered by raising the proportion of excipient, resulting in a re-homogenization of the PC and PS lipids. Therefore, in the presence of NaHCO_3 , the interaction of the FS with the DMPC/DMPS membrane would be similar to that observed with pure DMPC bilayers. This is supported by the NMR data of the DMPC/DMPS/FS/ NaHCO_3 system similar to DMPC/FS.

3.6. Conclusions

Fluvastatin penetrates through intestinal cell walls mostly via passive permeation enabled by its amphiphilicity and low molecular weight (Lindahl et al., 1996). Its interaction with cell membranes is thus important for its entry within the blood circulation and access to the liver, the target organ of HMG-CoA reductase inhibitors.

In this work, we have evidenced the perturbation of model membranes by fluvastatin, the effect of the excipient NaHCO_3 on the interaction, and its specificity towards the membrane charge. While almost no effect of the excipient was observed when FS interacts with DMPC vesicles, the opposite was seen with DMPC/DMPS membranes, indicating that the drug/membrane interaction is affected by the membrane charge. In addition, the presence of the excipient NaHCO_3 in the model enterocyte membrane milieu modifies the interaction of the drug with the phospholipids. More specifically, the salt reestablishes the lipid homogeneity in the zwitterionic/anionic lipid bilayer, and the membrane is increasingly perturbed as the excipient concentration is raised.

These results demonstrate the significant role that can play an excipient in drug/membrane interactions. It also stresses the importance of the choice of model membrane composition in such studies. Finally, correlated to membrane permeation assays, an investigation of the mechanism by which an excipient can influence the drug/membrane interaction, akin to the work presented here, could represent a useful tool in the adequate selection of drug formulation.

3.7. Acknowledgements

This work was supported by the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and the *Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies* (FQRNT). G.L. is grateful to the NSERC for the award of a M.Sc. scholarship. The authors wish to thank C. Malveau (High Field NMR Laboratory, University of Montreal), J.-P. Gaudet, M. Crepel, F. Iachourène, and P. Audet for technical assistance. D.E. Warschawski (CNRS-Paris), P. Gosselin and Y. Roy (Corealis Pharma Inc.) are acknowledged for stimulating discussions and support. G.L., A.A.A. and I.M. are members of the CQMF (*Centre Québécois des Matériaux Fonctionnels*).

4. Développement de membranes artificielles modèles

4.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, l'étude des mécanismes d'interaction entre la fluvastatine et la membrane en fonction de la formulation pharmaceutique a été présentée. Suite à la conclusion de cette étape, nous avons amorcé le développement d'une membrane artificielle modèle pour l'étude de la pénétration membranaire de médicaments par la technique PAMPA. L'objectif à long terme est de mettre au point une membrane mimant la paroi gastro-intestinale et sensible à la formulation pharmaceutique. Pour ce faire, nous avons entrepris de déposer une bicouche de phospholipides à la surface de filtres commerciaux adaptables à une cellule de Franz.

4.2. Mode opératoire et complément théorique

Depuis la publication des travaux de Tamm et McConnell en 1985 (Tamm & McConnell, 1985), les bicouches de phospholipides déposées sur une surface solide ont été largement utilisées afin de mimer les membranes biologiques. Un avantage de cette technique est que le dépôt d'une membrane lipidique peut être effectué sur une grande variété de matériaux : verre, silicone, mica, or, platine, etc. (Hennesthal et al., 2002). En général, le dépôt d'une bicouche s'effectue par fusion de vésicules ou par transfert de Langmuir (Chan & Boxer, 2007). Cette dernière technique consiste à compresser une monocouche lipidique dans un bain Langmuir-Blodgett afin d'induire un repliement de la monocouche sur elle-même. Nous avons toutefois opté pour la fusion de vésicules puisque cette technique ne requiert aucun équipement spécialisé et implique peu de manipulations minimisant ainsi les risques d'erreur. L'adsorption de

vésicules sur un substrat solide s'effectue par fusion de petites vésicules unilamellaires (SUV, small unilamellar vesicles) (Figure 29B). Ces vésicules sont formées d'une ou deux bicouches lipidiques et obtenues par sonication de vésicules multilamellaires (MLV) (Figure 29A). La fréquence des ultra-sons permet le « bris » des MLV et la formation de structures plus petites (Machy & Leserman, 1987).

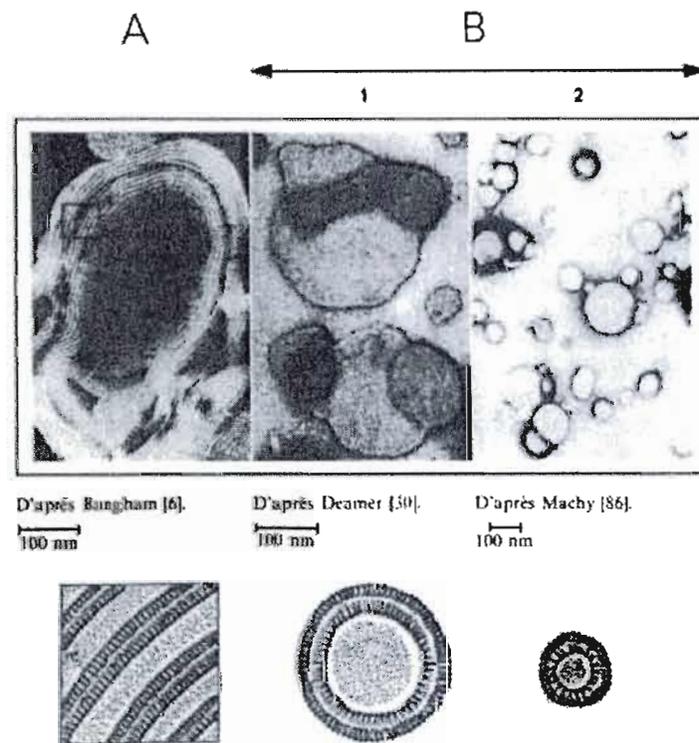


Figure 29 : Photographies de microscopie électronique et représentation schématique des divers types de vésicules. A) vésicules multilamellaires (MLV). B) vésicules unilamellaires : 1) grands liposomes unilamellaires (LUV) ; 2) petites vésicules unilamellaires (SUV) (Machy & Leserman, 1987).

Tel que montré à la Figure 30, l'adsorption des SUV à la surface d'un substrat solide se fait en deux étapes : la fusion puis la rupture des vésicules. La fusion des vésicules est le processus par lequel deux ou plusieurs vésicules partagent des

phospholipides afin de former un système plus volumineux. La rupture est le processus par lequel les grosses vésicules se déforiment, libèrent leur contenu et se déposent sur une surface sous forme de bicouche (Schonherr et al., 2004).

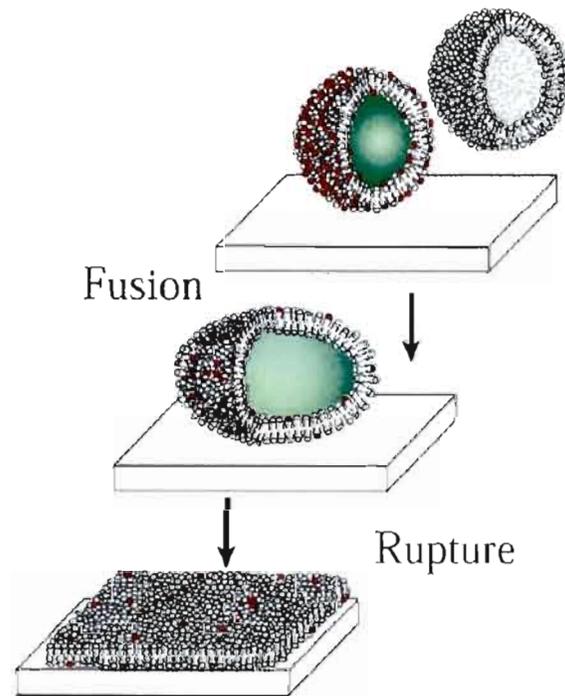


Figure 30 ; Processus de formation d'une bicouche phospholipidique par adsorption de vésicules (Johnson et al., 2002).

Les lipides ne sont pas liés chimiquement au support, mais maintenus près de la surface par des forces d'attraction de van der Waals et d'hydratation (Johnson et al., 2002). Tel qu'illustré dans la Figure 31, le maintien de la fluidité de l'ensemble est assuré par la présence d'une fine couche d'eau entre le support et la bicouche (Tamm & Tatulian, 1997; Cremer & Boxer, 1999).

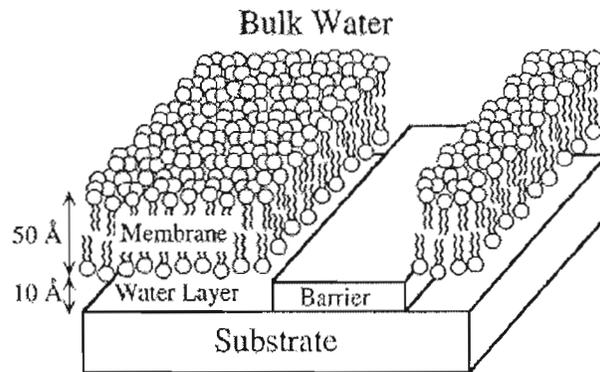


Figure 31 : Schématisation d'une bicouche phospholipidique supportée (Cremer & Boxer, 1999).

L'étude de la pénétration membranaire de médicaments à l'aide du montage expérimental présenté à la Figure 7 implique toutefois l'utilisation d'un support poreux. Plusieurs travaux ont démontré la possibilité de déposer une bicouche phospholipidique à l'intérieur des pores de supports composés d'oxyde d'aluminium nanoporeux (AAO) (Smirnov & Poluektov, 2003; Wattraint et al., 2005a; Wattraint et al., 2005b; Wattraint & Sarazin, 2006). Ces supports, commercialisés comme filtres (Whatman Anodisc®), sont hydrophiles et adaptés à la formation d'une bicouche compte tenu de l'hydrophilicité de la tête polaire des phospholipides (Wattraint et al., 2005b). L'étude du passage de médicaments à travers la paroi gastro-intestinale implique toutefois que la membrane lipidique soit maintenue à la surface du support poreux. La formation d'une telle membrane à la surface des filtres Anodisc® sera favorisée par le haut degré d'organisation de ce produit (faible rugosité et taille des pores contrôlée) (Hennesthal et al., 2002). En effet, les risques de ruptures de la bicouche au niveau des pores sont accentués par l'augmentation de la taille des pores et du niveau de rugosité du matériel. Ainsi, la haute densité de pores des filtres Anodisc® pourrait constituer un obstacle à l'obtention d'une bicouche suspendue (Figure 32).

Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué le potentiel de filtres commerciaux pour la fabrication d'une membrane utilisée pour étudier la pénétration

membranaire de médicaments. Les filtres Anodisc[®] (taille des pores de 20 et 100 nm) ont été utilisés. Tout comme lors des études spectroscopiques, l'effet du bicarbonate de sodium sur la pénétration membranaire de la fluvastatine a été étudié à l'aide de la technique PAMPA. Des comprimés de fluvastatine comprenant des quantités croissantes de NaHCO₃ ont été fabriqués tels que décrit à la section 4.2.2.

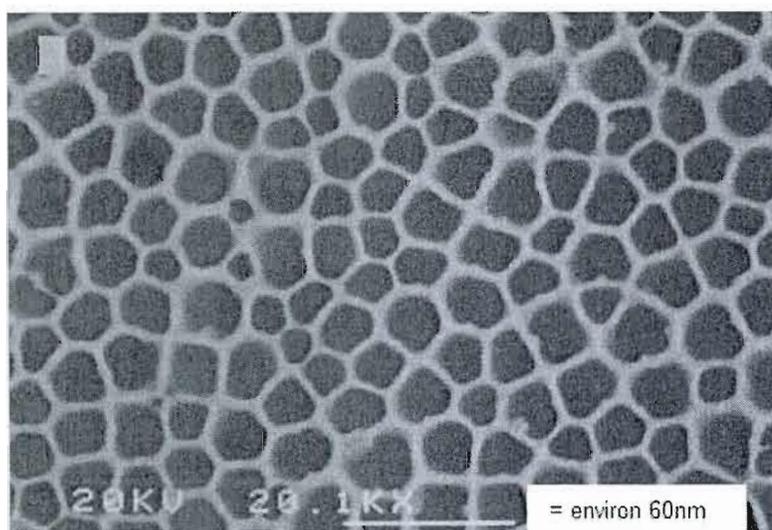


Figure 32 : Images de microscopie électronique d'un filtre Anopore[®]. (Jones et al., 1989)

4.2.1. Matériel

La dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) et la dimyristoylphosphatidylsérine (DMPS) ont été achetées d'Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) et utilisées sans purification additionnelle. La fluvastatine provient de Corealis Pharma Inc. (Montréal, QC, Canada) et le bicarbonate de sodium de Sigma-Aldrich Co. (St-Louis, MO, USA). La cellulose microcristalline (MCC pH 101) a été obtenue de FMC Co. (Philadelphie, PA, USA) et le stéarate de magnésium de A&C Ltd. (Montréal, QC, Canada). Le

méthanol de qualité CLHP (chromatographie liquide à haute performance) provient de EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Allemagne) et les filtres Anopore[®] proviennent de Whatman (Florham Park, NJ, USA).

4.2.2. Préparation des formulations pharmaceutiques

Les quatre formulations pharmaceutiques ont été préparées en mélangeant la fluvastatine (10% p/p), le bicarbonate de sodium (entre 0 et 15% p/p) et la cellulose microcristalline (composé inerte utilisé comme agent de remplissage) à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Un résumé des ingrédients requis lors de la fabrication des formulations pharmaceutiques est présenté dans le Tableau 4. Les formulations 2008 B, C et D contiennent des quantités croissantes de NaHCO₃ alors que la formulation 2008 A n'en contient pas. Ensuite 200 mg du mélange est compressé manuellement pour faire des comprimés en appliquant une force de 2100 N à l'aide d'une presse hydraulique Carver (Wabash, IN, USA) modèle C équipée d'un poinçon de 8 mm de diamètre.

Tableau 4 : Préparation des formulations pharmaceutiques

Ingrédients	Masse des ingrédients (mg)			
	Lot 2008 A	Lot 2008 B	Lot 2008 C	Lot 2008 D
Fluvastatine	560	560	560	560
NaHCO ₃	0	280	560	840
MCC pH 101	5040	4760	4480	4200
Concentration FS (mg/comprimé)	20	20	20	20
Rapport p:p FS : NaHCO ₃	1 : 0	1 : 0.5	1 : 1	1 : 1.5

4.2.3. Préparation des membranes

En premier lieu, 8 mg de phospholipides sont mélangés dans 16 mL d'eau purifiée. Après 3 cycles de gel (azote liquide), dégel (50°C) et mélange (vortex), la solution lipidique subit une sonication par sonde pendant 10 min. à une fréquence de 20 kHz. Les ultrasons générés par l'appareil ont pour effet de détruire les vésicules multilamellaires afin de former de petites vésicules unilamellaires (Machy & Leserman, 1987). La solution est par la suite centrifugée afin d'éliminer de potentiels résidus métalliques de la sonde. Un filtre est ensuite immergé dans 2 mL de cette solution et entreposé à 40°C pour la nuit (i.e. $T_m + 17^\circ\text{C}$). Finalement, l'excès de lipides est éliminé par une série de lavage à l'eau purifiée. Les expériences ont été menées avec des membranes composées de DMPC, de DMPS et d'un mélange des deux phospholipides à un rapport molaire de 10 : 1 (DMPC : DMPS).

4.2.4. Analyses de pénétration membranaire

Lors d'une analyse, les cellules de Franz de 4 mL sont remplies d'eau et maintenues à température physiologique par la circulation d'eau provenant d'un bain thermostaté. Après avoir positionné les membranes sur les cellules, les comprimés de FS sont déposés à la surface de celles-ci. Les cellules de départ sont par la suite ajoutées au montage et remplies d'eau (3 mL). Il suffit alors de démarrer l'agitation dans les cellules de Franz afin d'amorcer l'expérimentation. À des temps prédéterminés, le contenu des cellules réceptrices est échantillonné (1 mL) et le dosage du médicament (par CLHP) nous renseigne sur la cinétique de la pénétration membranaire. Chacune des expériences présentées a été effectuée à au moins trois reprises.

4.2.5. Analyses de chromatographie en phase liquide à haute performance

L'analyse des échantillons recueillis a été effectuée CLHP au moyen d'un appareil Agilent modèle 1200 (Santa Clara, CA, USA) équipé d'une colonne Agilent XDB-C18 (taille des particules de 5 μm , diamètre interne de 4.6 mm, longueur de 150 mm). La phase mobile est composée de 30% (v/v) d'une solution tampon de phosphate de potassium (USP) ajustée à un pH de 7.2 et de 70% (v/v) de méthanol (qualité CLHP). Le débit de la phase mobile est de 1.2 mL/min, la température de la colonne est maintenue à 50°C et la longueur d'onde du détecteur UV est fixée à 305 nm. La température des échantillons est maintenue à 25°C et lors de l'injection, 5 μL de l'échantillon sont prélevés. Les équations 4.1 à 4.3 détaillent les calculs effectués pour l'obtention du pourcentage de fluvastatine ayant diffusé à travers la membrane en cours d'analyse.

$$\frac{A_{éch}}{A_{std}} \times C_{std} \times \frac{V_{cell}}{D} \times 100 = \% \text{ de Fluvastatine} \quad (4.1)$$

où $A_{éch}$ est l'aire du pic chromatographique de FS de l'échantillon, A_{std} est l'aire du pic de FS de la solution standard, C_{std} est la concentration de la solution standard de FS en mg/mL, V_{cell} est le volume de la cellule réceptrice en mL et D est le dosage de FS dans le comprimé en mg.

$$\left[1 - \left(\frac{1}{V_{cell}}\right)\right]^{n-1} = FD \quad (4.2)$$

où n est le nombre de prélèvements de 1 mL effectués et FD est le facteur de dilution.

$$\left(\frac{\% \text{ de Fluvastatine}}{FD}\right) = \% \text{ de Fluvastatine diffusé} \quad (4.3)$$

Lors de la présentation des résultats, le profil du pourcentage de fluvastatine diffusé en cours d'analyse est tracé.

4.3. Résultats et Discussion

La mise au point d'une membrane artificielle modèle pour l'étude de la pénétration membranaire de médicaments par la technique PAMPA n'est pas exempte de difficultés. Les principaux défis auxquels nous devons faire face sont 1) la

déposition et la consolidation d'une bicouche lipidique à la surface de filtres d'alumine ayant une haute densité de pores ; 2) la structure appropriée des filtres en alumine, c'est-à-dire la dimension, distribution et densité des pores; 3) évaluer l'impact de l'interaction entre les phospholipides et le support d'alumine sur les mécanismes d'interactions FS/membrane en fonction de la formulation pharmaceutique ; 4) déterminer si une possible modification de ces mécanismes d'interactions influence la pénétration membranaire de la FS.

En premier lieu, nous avons vérifié si la fusion de vésicules avait lieu à la surface des filtres d'alumine. Des membranes ont donc été préparées à l'aide de la méthodologie présentée dans la section 4.2.3. Pour ce faire, des filtres Anopore[®] ont été immergés dans une solution aqueuse de petites vésicules unilamellaires composées d'un mélange de DMPC et de DMPS. La surface des filtres a alors été sondée par microscopie à force atomique (AFM, atomic force microscopy). Cette technique permet entre autres de visualiser la surface d'échantillons biologiques, comme les systèmes lipidiques, en explorant celle-ci à l'aide d'une pointe effilée (cantilever) portée par un ressort très souple (Giocondi et al., 2003). Les analyses ont été effectuées en mode « tapping » avec un appareil Digital Instruments modèle Nanoscope IIIa Extended (Plainview, NY, USA).

La Figure 33 montre une image d'AFM en milieu aqueux d'un filtre Anopore[®] (taille des pores de 100 nm) et nous informe que les vésicules sont encore intactes et non déposées sous forme de bicouches à la surface du filtre. La taille moyenne des vésicules recouvrant les pores et la surface du filtre a été évaluée à approximativement 75 nm. Selon Schonherr et al., il s'agit de la taille de vésicules idéale pour l'adsorption et la fusion de ce type de lipides (Schonherr et al., 2004). De plus, le fait que le filtre soit couvert de lipides semble indiquer que ces derniers ont de l'affinité pour le support étant donné que la membrane est exposée à plusieurs cycles de lavage.

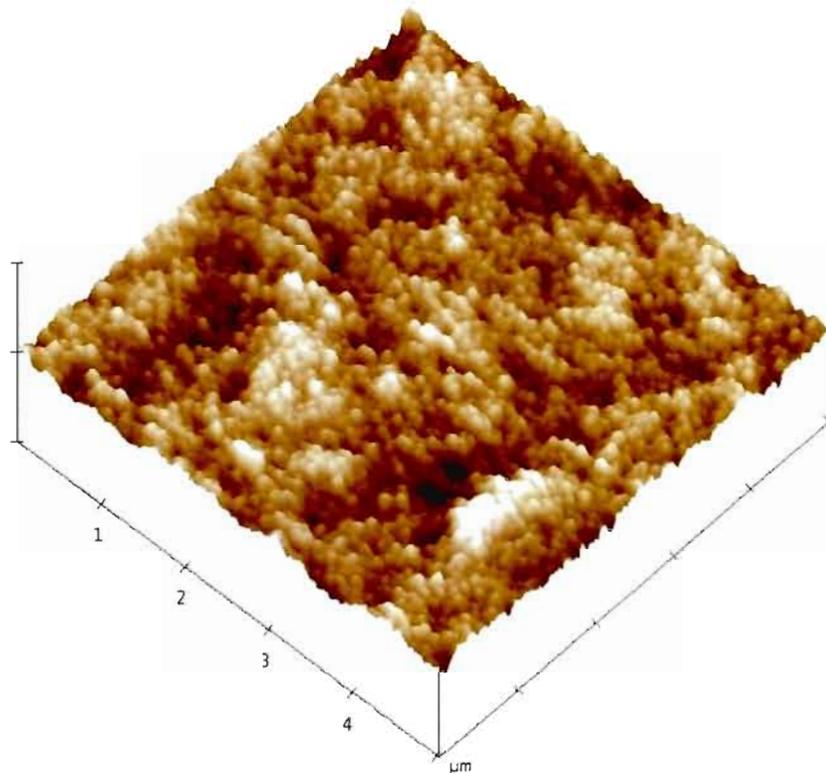


Figure 33 : Image de microscopie à force atomique en mode « tapping » d'un filtre Anopore® (taille des pores de 100 nm) sur lequel est déposée une suspension de DMPC et de DMPS (rapport molaire 10 : 1).

L'apparente affinité des phospholipides pour la surface des filtres d'alumine nous a encouragés à effectuer des analyses de pénétration membranaire avec ces membranes. Nous avons donc vérifié le passage de la FS à travers une membrane de DMPC / DMPS (rapport molaire 10 : 1) déposée sur des filtres Anopore® (taille des pores de 20 et 100 nm) afin de mimer la paroi cellulaire intestinale. Par la suite, l'impact de la formulation pharmaceutique sur la pénétration de la FS à travers ces membranes a été étudié. Les Figures 34 et 35 montrent l'effet de la composition de la formulation pharmaceutique sur le passage de l'ingrédient actif. La formulation pharmaceutique 2008 D contient du bicarbonate de sodium (rapport p:p FS : NaHCO₃ de 1 : 1.5) alors que la 2008 A n'en contient pas

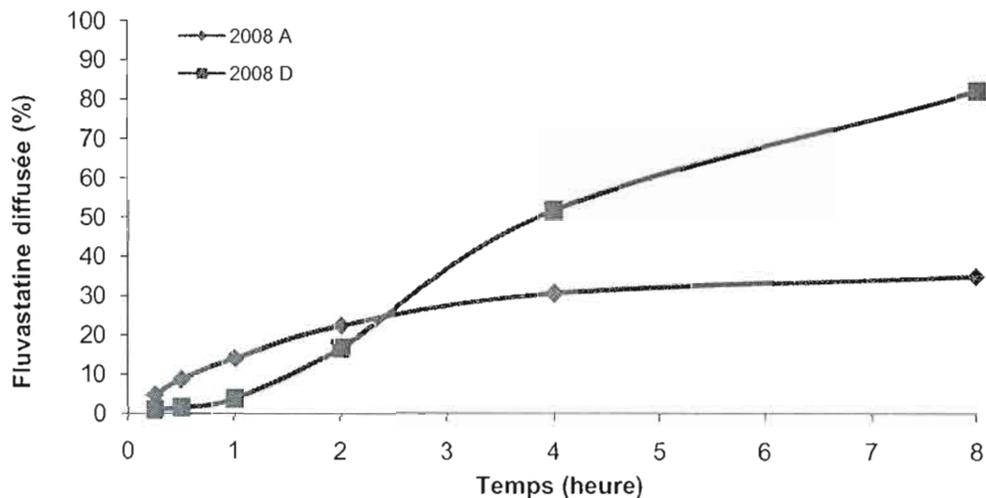


Figure 34 : Analyse de la pénétration membranaire de la FS à travers une membrane de DMPC / DMPS (rapport molaire 10 : 1) sur des filtres Anopore® (20 nm).

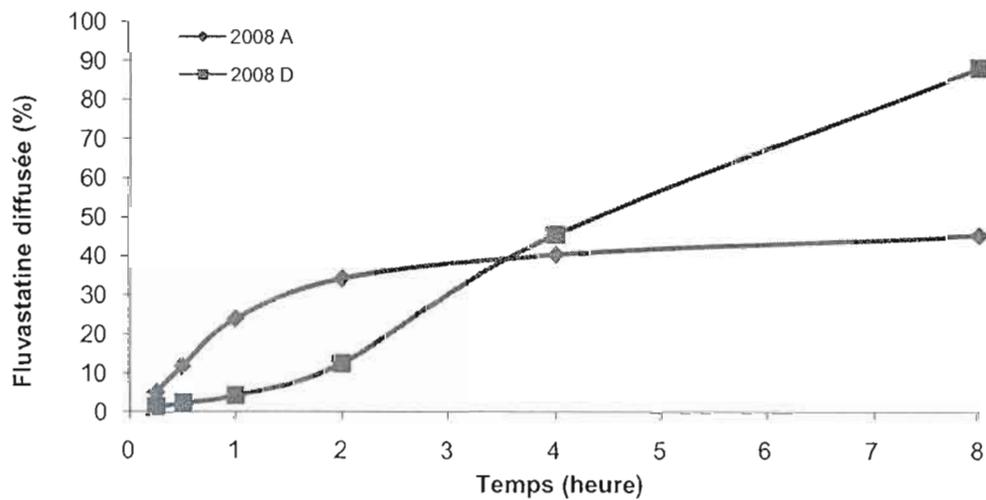


Figure 35 : Analyse de la pénétration membranaire de la FS à travers une membrane de DMPC / DMPS (rapport molaire 10 : 1) sur des filtres Anopore® (100 nm).

On peut d'abord constater que le passage de la fluvastatine présente dans la formulation 2008 A plafonne à ~30 % peu importe la taille des pores du support d'alumine. En présence de NaHCO_3 , la diffusion de la FS est d'abord ralentie dans les deux premières heures de l'analyse. On observe ensuite un changement de tendance et une plus grande quantité de FS présente dans la formulation 2008 D passe à travers la membrane (~90 %) après 8 heures. Lorsque cette expérience est répétée sur des filtres sans membrane lipidique (Figure 36), les mêmes profils sont obtenus.

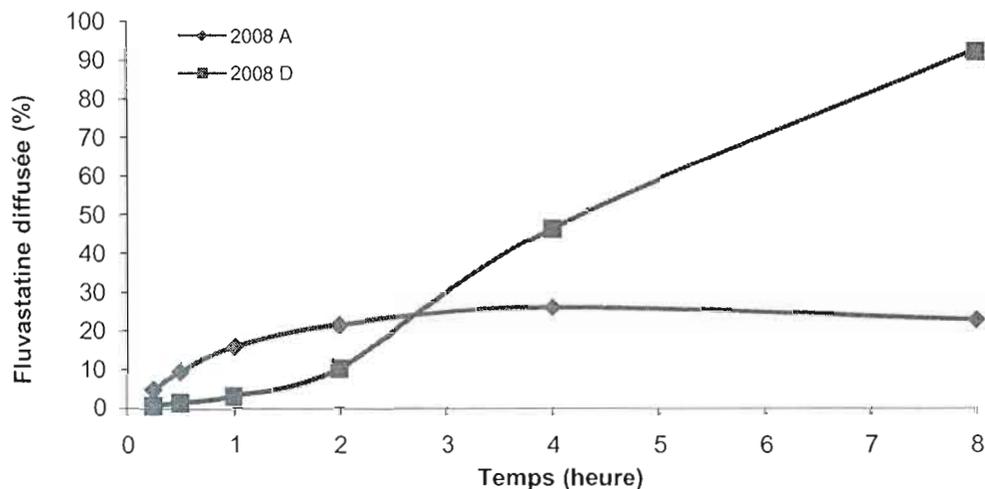


Figure 36 : Analyse de la pénétration membranaire de la FS à travers un filtre Anopore® (20 nm) sans membrane lipidique.

Ces expériences suggèrent que, malgré l'interaction entre la FS et les phospholipides démontrée auparavant au Chapitre 3, il y a aussi la possibilité d'une affinité de la FS pour la surface d'alumine, et que l'addition de NaHCO_3 influence cet effet. De plus, nous pouvons supposer que lorsque le sel alcalin est présent, le passage de la FS serait alors contrôlé par le système qui tend vers l'équilibre chimique entre les deux cellules. En cours d'analyse, le système répond aux prélèvements

effectués dans la cellule réceptrice provoquant ainsi un enrichissement en FS de cette dernière au détriment de la cellule de départ.

4.4. Conclusions

Ces travaux préliminaires fournissent des renseignements utiles pour la suite du projet. En premier lieu, il apparaît évident que les filtres spécifiquement testés ne sont pas adaptés au dépôt de lipides lors de la conception d'une membrane artificielle modèle pour l'étude de la pénétration membranaire de médicaments. L'absence de fusion de vésicules et le fait que le support d'alumine influence le passage de l'ingrédient actif en fonction de la formulation pharmaceutique soutiennent ce constat. De plus, il n'est pas exclu que les vésicules de lipides se détachent du filtre en cours d'analyse. Cependant, les lipides démontrent une apparente affinité pour la surface d'alumine, donc il serait toujours possible que l'utilisation d'une géométrie ou structure de filtre différente soit plus adéquate. En effet, il est probable que les sites chargés des phospholipides tels que les groupements amines et phosphates soient attirés par la surface des filtres d'alumine en raison de son caractère hydrophile. Toutefois, la méthodologie utilisée afin d'obtenir de petites vésicules unilamellaires est appropriée puisque la taille de vésicules résultantes est idéale afin d'induire la fusion de ces dernières. Dans l'éventualité où un support adéquat soit mis au point, la technique de fusion de vésicules devra fort probablement être optimisée.

5. Conclusions et Perspectives

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons étudié l'impact de la formulation pharmaceutique sur l'interaction de la fluvastatine (FS) avec des membranes modèles. L'obtention d'un effet thérapeutique lors de la prise de ce médicament administré par voie orale implique que l'ingrédient actif soit absorbé et requiert donc que ce dernier passe à travers la paroi gastro-intestinale. Or la FS accède principalement au foie en traversant la paroi des cellules intestinales de manière passive. Ainsi, l'étude de l'interaction entre la fluvastatine et les phospholipides, principaux lipides structuraux de la paroi gastro-intestinale, est donc nécessaire à la compréhension des mécanismes d'absorption. Puisque le NaHCO_3 est ajouté à la formulation pour assurer une dégradation minimale de la FS, nous avons comparé l'interaction de cette dernière avec des membranes intestinales modèles en présence ou en absence de l'excipient. Pour ce faire, nous avons utilisé les spectroscopies infrarouge à transformée de Fourier et de résonance magnétique nucléaire de l'état solide afin de mettre en évidence les différents mécanismes impliqués. Au meilleur de nos connaissances, la RMN de l'état solide est utilisée pour la première fois pour étudier l'impact de la formulation sur l'interaction d'un médicament avec une membrane modèle.

En premier lieu, nos résultats indiquent que la fluvastatine induit une ségrégation entre les lipides anioniques (DMPS) et zwitterioniques (DMPC) composant la membrane intestinale modèle. Cet effet est par contre altéré par l'addition de quantités croissantes d'excipient. Cependant, l'ajout du NaHCO_3 n'affecte pas l'interaction de la FS avec une membrane de DMPC entièrement zwitterionique. Nos travaux soulignent donc à la fois l'importance du choix des excipients composant la formulation pharmaceutique et de la composition de la membrane utilisée comme modèle.

Après avoir démontré que la RMN de l'état solide peut être utilisée dans le but d'optimiser la conception de formulations pharmaceutiques, il serait intéressant

d'améliorer les membranes modèles d'entérocytes. Pour ce faire, l'impact des autres phospholipides présents dans la paroi gastro-intestinale sur les mécanismes d'interaction observés dans le cadre de ce projet de recherche devrait être évalué. Par exemple, le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidyléthanolamine (PE) peuvent représenter jusqu'à 7% et 18% respectivement de la quantité totale de phospholipides composant la membrane biologique (Avdeef, 2003). L'addition de cholestérol (~37%) ou de sphingomyéline (~7%) pourrait aussi être considérée. Étendre le bassin de molécules actives et d'excipients testés est aussi un pré-requis à la mise au point d'une membrane intestinale modèle simple et représentative de l'environnement biologique. Afin de valider la pertinence de cette membrane, les résultats obtenus pourraient par la suite être comparés à l'absorption mesurée avec en modèle animal ou par une technique *in vitro* reconnue telle que le Caco-2.

Nous avons également amorcé un nouveau volet de recherche qui consiste à développer une membrane artificielle modèle pour l'étude de la pénétration membranaire de médicaments par la technique PAMPA. Les travaux exploratoires effectués avec des filtres en alumine excluent l'utilisation de ces derniers puisque ces supports influencent le passage de la FS avec et sans NaHCO_3 ajouté à la formulation pharmaceutique. L'objectif à long terme de ce projet est de mettre au point une membrane constituée de phospholipides afin que les résultats soient attribuables à la bicouche lipidique et non au support. Nos résultats suggèrent que les lipides ont de l'affinité avec l'alumine puisque les lipides demeurent à la surface du filtre malgré plusieurs cycles de lavage. Par contre, ils montrent aussi que la fusion de vésicules n'a pas lieu dans les conditions utilisées.

Sur les bases des résultats obtenus dans notre travail, il faudrait, pour la suite du projet, débiter par la recherche d'un support poreux qui soit à la fois hydrophile, hautement organisé et « inerte ». Ce dernier ne devra pas altérer le passage de l'ingrédient actif en fonction d'un changement de la formulation pharmaceutique. Il serait particulièrement intéressant d'évaluer le potentiel de supports de xérogels de silice (Weng et al., 2004). L'étape suivante consisterait à tenter de fusionner les petites vésicules unilamellaires par la technique présentée dans ce travail ou par une méthode alternative en cas d'échec (Cremer & Boxer, 1999; Smirnov & Poluektov, 2003;

Wattraint & Sarazin, 2006). Suite à l'obtention d'une membrane artificielle modèle, cette dernière pourra être mise à l'épreuve lors d'analyse de pénétration membranaire d'une variété de médicaments en fonction de différentes formulations pharmaceutiques. De plus, il serait pertinent de vérifier l'intégrité de la membrane suite à une analyse par AFM ou par dosage des phospholipides dans les cellules du PAMPA par spectrométrie de masse. Enfin, il serait intéressant, à long terme, de développer des filtres permanents. Par exemple, des phospholipides supportés liés de façon covalente à des filtres ayant des pores définis par nanofabrication (nanopatterned).

6. Bibliographie

Amidon, G.L., Lennernäs, H., Shah, V.P., Crison, J.R. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research* 12, 413-420.

Avdeef, A. (2003) *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*. John Wiley & Sons, Hoboken, 312 pages.

Avdeef, A. (2005) The rise of PAMPA. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 1, 325-342.

Avdeef, A., Kansy, M., Bendels, S., Tsinman, K. (2008) Absorption-excipient-pH classification gradient maps: Sparingly soluble drugs and the pH partition hypothesis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 33, 29-41.

Bloom, M., Davis, J.H., Mackay, A.L. (1981) Direct determination of the oriented sample NMR spectrum from the powder spectrum for systems with local axial symmetry *Chemical Physics Letters* 80, 198-202.

Burnell, E.E., Cullis, P.R., de Kruijff, B. (1980) Effects of tumbling and lateral diffusion on phosphatidylcholine model membrane ³¹P-NMR lineshapes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 603, 63-69.

Camenisch, G., Folkers, G., van de Waterbeemd, H. (1996) Review of theoretical passive drug absorption models: Historical background, recent developments and limitations. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 71, 309-327.

Casal, H.L., Mantsch, H.H. (1984) Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 779, 381-401.

Castro, V., Stevansson, B., V. Dvinskikh, S., Högberg, C.-J., Lyubartsev, A.P., Zimmermann, H., Sandström, D., Maliniak, A. (2008) NMR investigations of interactions between anesthetics and lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 2604-2611.

Cevc, G. (1993) *Phospholipids Handbook*. Marcel Dekker Inc., New-York, 988 pages.

Chan, O.H., Stewart, B.H. (1996) Physicochemical and drug-delivery considerations for oral drug bioavailability. *Drug Discovery Today* 1, 461-473.

Chan, S.I., Bocian, D.F., Peterson, N.O. (1981) *Membrane spectroscopy - Nuclear magnetic resonance studies of the phospholipids bilayer membrane*. Springer-Verlag, New York, 498 pages.

Chan, Y.-H.M., Boxer, S.G. (2007) Model membrane systems and their applications. *Current Opinion in Chemical Biology* 11, 581-587.

- Cremer, P.S., Boxer, S.G. (1999) Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *Journal of Physical Chemistry B* 103, 2554-2559.
- Cronier, F. (2006) Étude du mécanisme d'action de nouvelles substances thérapeutiques: les chloroéthylurées, Mémoire, Université Laval, Québec.
- Davidson, M.H., Toth, P.P. (2004) Comparative effects of lipid-lowering therapies. *Progress in Cardiovascular Diseases* 47, 73-104.
- Davio, S.R., Low, P.S. (1981) The effect of anesthetic charge on anesthetic-phospholipid interactions. *Biochimica Biophysica Acta* 644, 157-164.
- Davis, J.H. (1983) The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by ^2H -NMR. *Biochimica Biophysica Acta* 737, 117-171.
- Davis, J.H., Jeffrey, K.R., Bloom, M., Valic, M.I., Higgs, T.P. (1976) Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. *Chemical Physics Letters* 42, 390-394.
- Davis, S.S. (2005) Formulation strategies for absorption windows. *Drug Discovery Today* 10, 249-257.
- Di, L., Kerns, E.H. (2003) Profiling drug-like properties in discovery research. *Current Opinion in Chemical Biology* 7, 402-408.
- Galini-Luciani, D., Nguyen, L., Yazdani, M. (2007) Is PAMPA a useful tool for discovery? *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96, 2886-2892.
- Giocondi, M.C., Milhiet, P.E., Dosset, E., le Grimellec, C. (2003) Microscopie à force atomique : de l'imagerie cellulaire à la manipulation moléculaire. *Medecine/Science* 19, 92-99.
- Guard-Friar, D., Chen, C.H., Engle, A.S. (1985) Deuterium isotope effect on the stability of molecules: phospholipids. *Journal of Physical Chemistry* 89, 1810-1813.
- Hämäläinen, M.D., Frostell-Karlsson, A. (2004) Predicting the intestinal absorption potential of hits and leads. *Drug Discovery Today: Technologies* 1, 397-405.
- Hennesthal, C., Drexler, J., Steinem, C. (2002) Membrane-suspended nanocompartments based on ordered pores in alumina. *Chemistry Physics and Physical Chemistry* 3, 885-889.
- Herper, M., Kang, P. (2006) The world's ten best-selling drugs (<http://www.forbes.com/>).
- Hidalgo, I.J. (2001) Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1, 385-401.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736-749.
- <http://www.bioteach.ubc.ca/Bio-industry/Inex/> (2009.01.07).
- <http://www.encapsula.com/> (2008.04.13).
- <http://www.hansonresearch.com/> (2009.01.14).

- Jackson, K., Young, D., Pant, S. (2000) Drug-excipient interactions and their affect on absorption. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 3, 336-345.
- Johnson, J.M., Ha, T., Chu, S., Boxer, S.G. (2002) Early steps of supported bilayer formation probed by single vesicle fluorescence assays *Biophysical Journal* 83, 3371-3379.
- Jones, S.E., Ditner, S.A., Freeman, C., Whitaker, C.J., Lock, M.A. (1989) Comparison of a new inorganic membrane filter (Anopore) with a track-etched polycarbonate membrane filter (Nuclepore) for direct counting of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 529-530.
- Kabati, M.B., Vivilecchia, R.V. (1994) Stabilized pharmaceutical compositions comprising an HMG-CoA reductase inhibitor compound (United States Patent #5,356,896).
- Kansy, M., Avdeef, A., Fischer, H. (2004) Advances in screening for membrane permeability: high-resolution PAMPA for medicinal chemists. *Drug Discovery Today: Technologies* 1, 349-355.
- Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K. (1998) Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of Medicinal Chemistry* 41, 1007-1010.
- King, R.W., Williams, K.R. (1989) Topics in chemical instrumentation. The Fourier transform in chemistry. *Journal of Chemical Education* 66.
- Lee, D.C., Chapman, D. (1986) Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. *Bioscience reports* 6, 235-256.
- Lennernäs, H. (2003) Intestinal drug absorption and bioavailability: beyond involvement of single transport function. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55, 429-433.
- Lennernäs, H., Lundgren, E. (2004) Intestinal and blood-brain drug transport: beyond involvement of a single transport function. *Drug Discovery Today: Technologies* 1, 417-422.
- Levitt, M.L. (2008) *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons, Chichester, 744 pages.
- Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N. (2000) Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behavior of lipid bilayer model membranes composed of a homologous series of linear saturated Phosphatidylserines. *Biophysical Journal* 79, 2043-2055.
- Lindahl, A., Sandstrom, R., Ungell, A.-L., Abrahamsson, B., Knutson, T.W., Knutson, L., Lennernas, H. (1996) Jejunal permeability and hepatic extraction of fluvastatin in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 60, 493-503.
- Lindahl, A., Sandström, R., Ungell, A.-L., Lennernäs, H. (1998) Concentration- and region-dependant intestinal permeability of fluvastatin in rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50, 737-744.
- Lipinski, C.A. (2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44, 235-249.

- Löbenberg, R., Amidon, G.L. (2000) Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 3-12.
- Machy, P., Leserman, L. (1987) *Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie*. INSERM ed.; John Libbey Eurotext Ltd., 178 pages.
- Marcotte, I. (2008) Notes de cours, UQAM CHI-7600
- Marcotte, I., Arnold, A. (2009) Communication personnelle.
- Marcotte, I., Ouellet, M., Auger, M. (2004) Insights on the interaction of met-enkephalin with negatively charged membranes--an infrared and solid-state NMR spectroscopic study. *Chemistry and Physics of Lipids* 127, 175-187.
- Marsch, D. (1990) *CRC Handbook of Lipid Bilayers*. CRC Press Inc., Boca Raton, 387 pages.
- Martinez, M.N., Amidon, G.L. (2002) A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *Journal of Clinical Pharmacology* 42, 620-643.
- Mendelsohn, R., Mantsch, H.H. (1985) *Progress in Protein-Lipid Interactions* Elsevier Science & Technology, Amsterdam, 292 pages.
- Mendelsohn, R., Mantsch, H.H. (1986) in *Progress in Protein-Lipid Interactions* (Watts, A., De Pont, J.J.H.H.M., Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp 103-146.
- Moore, D.J., Sills, R.H., Patel, N., Mendelsohn, R. (1996) Conformational order of phospholipids incorporated into human erythrocytes: an FTIR spectroscopy study. *Biochemistry* 35, 229-235.
- Moreau, C. (2000) Organisation des phospholipides de la membrane plasmique de muscle squelettiques : étude par spectroscopie de RMN du phosphore-31 et par microscopie électronique, Thèse, Université de Rennes 1, Rennes.
- Mouritsen, O.G. (2005) *Life - As a Matter of Fat*. Springer, Berlin Heidelberg, 300 pages.
- Palm, K., Stenberg, P., Luthman, K., Artursson, P. (1997) Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharmaceutical Research* 14, 568-571.
- Pandit, S.A., Berkowitz, M.L. (2002) Molecular Dynamics Simulation of Dipalmitoylphosphatidylserine Bilayer with Na⁺ Counterions. *Biophys. J.* 82, 1818-1827.
- Petrache, H.I., Tristram-Nagle, S., Gawrisch, K., Harries, D., Parsegian, V.A., Nagle, J.F. (2004) Structure and fluctuations of charged phosphatidylserine bilayers in the absence of salt. *Biophysical Journal* 86, 1574-1586.
- Picard, F., Paquet, M.-J., Levesque, J., Bélanger, A., Auger, M. (1999) ³¹P NMR first spectral moment study of the partial magnetic orientation of phospholipid membranes. *Biophysical Journal* 77, 888-902.
- Rance, M., Byrd, R.A. (1983) Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media: Phase-cycled Hahn echo spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 52, 221-240.

- Rouessac, F., Rouessac, A. (2000) *Analyse chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod, Paris, 462 pages.
- Roux, M., Bloom, M. (1990) Calcium, magnesium, lithium, sodium, and potassium distributions in the headgroup region of binary membranes of phosphatidylcholine and phosphatidylserine as seen by deuterium NMR. *Biochemistry* 29, 7077-7089.
- Sarr, F.S., André, C., Guillaume, Y.C. (2008a) Statins (HMG-coenzyme A reductase inhibitors)-biomimetic membrane binding mechanism investigated by molecular chromatography. *Journal of Chromatography B* 868, 20-27.
- Sarr, F.S., Guillaume, Y.C., André, C. (2008b) Magnesium cation effect on passive diffusion of statin molecules: Molecular chromatography approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47, 651-657.
- Schonherr, H., Johnson, J.M., Lenz, P., Frank, C.W., Boxer, S.G. (2004) Vesicle adsorption and lipid bilayer formation on glass studied by atomic force microscopy. *Langmuir* 20, 11600-11606.
- Seelig, J. (1977) Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* 10, 353-418.
- Seelig, J. (1978) ³¹P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* 515, 105-140.
- Seelig, J. (1980) Lipid conformation in model membranes and biological membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* 13, 19-61.
- Seelig, J., Seelig, A., Tamm, L. (1982) in *Lipid-Protein Interactions* (Jost, P.C., Griffith, H.O., Eds.) John Wiley & Sons Inc., New York, pp 127-148.
- Seo, P.R., Teksin, Z.S., Kao, J.P.Y., Polli, J.E. (2006) Lipid composition effect on permeability across PAMPA. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 29, 259-268.
- Seydel, J.K., Wiese, M. (2002) *Drug-Membrane Interactions: Analysis, Drug Distribution, Modeling*. Wiley-VCH, Verlag, 367 pages.
- Singh, A., Henske, P. (2003) Has the pharmaceutical blockbuster model gone bust? (<http://www.bain.com/>).
- Smirnov, A.I., Poluektov, O.G. (2003) Substrate-supported lipid nanotube arrays. *Journal of the American Chemical Society* 125, 8434-8435.
- Smith, I.C.P., Ekiel, I.H. (1984) in *Phosphorus-31 NMR: Principles and Applications* (Gorenstein, D.G., Ed.) Academic Press, London, pp 447-475.
- Söderman, O., Arvidson, G., Lindblom, G., Fontell, K. (1983) The interactions between monovalent ions and phosphatidyl cholines in aqueous bilayers. *European Journal of Biochemistry* 134, 309-314.
- Tamm, L.K., McConnell, H.M. (1985) Supported phospholipid bilayers *Biophysical Journal* 47, 105-113.

- Tamm, L.K., Tatulian, S.A. (1997) Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics* 30, 365-429.
- van Beek, J.D. (2007) matNMR: a flexible toolbox for processing, analyzing and visualizing magnetic resonance data in Matlab®. *Journal of Magnetic Resonance* 187, 19-26.
- van de Waterbeemd, H., Lennernäs, H., Artursson, P. (2003) *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*. Wiley-VCH, Weinheim, 602 pages.
- van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Review Molecular Cell Biology* 9, 112-124.
- Vance, D.E., Vance, J.E. (2002) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier, Amsterdam, 576 pages.
- Wang, G., Chen, C.-H. (1993) Thermodynamic elucidation of structural stability of deuterated biological molecules: deuterated phospholipid vesicles in H₂O. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 301, 330-335.
- Watrtrait, O., Arnold, A., Auger, M., Bourdillon, C., Sarazin, C. (2005a) Lipid bilayer tethered inside a nanoporous support: a solid-state nuclear magnetic resonance investigation. *Analytical Biochemistry* 336, 253-261.
- Watrtrait, O., Sarazin, C. (2006) Études par RMN des solides de bicouches phospholipidiques supportées dans les nanopores cylindriques d'un oxyde d'aluminium. *Comptes Rendus Chimie* 9, 408-412.
- Watrtrait, O., Warschawski, D.E., Sarazin, C. (2005b) Tethered or adsorbed supported lipid bilayers in nanotubes characterized by deuterium magic angle spinning NMR spectroscopy. *Langmuir* 21, 3226-3228.
- Weng, K.C., Stalgren, J.J.R., Risbud, S.H., Frank, C.W. (2004) Planar bilayer lipid membranes supported on mesoporous aerogels, xerogels, and Vycor® glass: an epifluorescence microscopy study. *Journal of Non-Crystalline Solids* 350, 46-53.