

UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

**THESE**

Présentée par M. Gilles CORNAIRE



En vue de l'obtention du

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER**

- Discipline : Pharmacologie -

**ETUDE DES EFFETS DES EXCIPIENTS  
PHARMACEUTIQUES SUR L'ABSORPTION  
DES MEDICAMENTS PAR INTERACTION  
AVEC LA P-GLYCOPROTEINE**

Soutenue le 24 septembre 2001

Devant le Jury composé de :



Pr. Georges HOUIN  
Dr. Pierre GIRES  
Pr. Fernand RODRIGUEZ  
Pr. John WOODLEY  
Dr Alix CLOAREC  
Dr Jean-Yves LEGENDRE

Président  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur

# SOMMAIRE

<b>PARTIE A. INTRODUCTION.....</b>	<b>15</b>
<b>PARTIE B. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>18</b>
I. INTRODUCTION :.....	19
II. ASPECTS MOLÉCULAIRES DE LA P-GLYCOPROTÉINE :.....	20
II.1. Classification et super-famille des transporteurs ABC :.....	20
II.1.1. Super-famille des transporteurs ABC :.....	20
II.1.2. Différents types de P-glycoprotéine :.....	23
II.2. Structure moléculaire et topologie :.....	26
II.2.1. Gènes impliqués dans la synthèse de la P-glycoprotéine :.....	26
II.2.2. Structure tridimensionnelle :.....	28
II.2.3. Topologie membranaire :.....	34
II.3. Activités de la P-glycoprotéine :.....	35
II.3.1. La P-glycoprotéine : une pompe d'efflux énergie dépendante :.....	35
II.3.2. Modalités du transport des substrats :.....	36
II.3.3. Sites de reconnaissance et caractéristiques des substrats :.....	37
II.4. P-glycoprotéine et phénotype MDR :.....	41
II.4.1. Implication dans les phénomènes de résistance aux anticancéreux :.....	41
II.4.2. Inhibition de la P-glycoprotéine : enjeux et modalités :.....	43
II.4.2.a. Différents modes d'inhibition :.....	43
II.4.2.b. Perspectives cliniques :.....	47
II.5. Rôles dans les Tissus normaux :.....	49
II.5.1. Foie :.....	50
II.5.2. Barrière hémato-encéphalique :.....	52
II.5.3. Rein :.....	53
II.5.4. Autres tissus :.....	55
III. P-GLYCOPROTÉINE DANS L'INTESTIN :.....	56
III.1. Absorption intestinale :.....	56
III.1.1. Différents modes d'absorption :.....	56
III.1.2. Implication de la P-glycoprotéine :.....	57
III.2. Méthodes d'études :.....	58
III.2.1. Détection de la P-glycoprotéine :.....	58
III.2.2. Etudes <i>in vitro</i> :.....	60
III.2.2.a. Cultures cellulaires :.....	60
III.2.2.b. Chambre de Ussing :.....	63
III.2.2.c. Méthode du sac d'intestin éversé de rat :.....	65
III.2.3. Perfusion <i>in situ</i> :.....	67
III.2.4. Etudes <i>in vivo</i> :.....	69
III.2.4.a. Souris transgéniques :.....	69
III.2.4.b. Perfusion <i>in situ</i> chez l'homme :.....	70
III.2.4.c. Etudes cliniques :.....	72
III.3. Influence sur l'absorption des xénobiotiques :.....	74
III.3.1. P-glycoprotéine et métabolisme :.....	75
III.3.2. Exemples de substrats.....	78
III.3.3. Des excipients inhibiteurs de la P-glycoprotéine :.....	81
<b>PARTIE C. ETUDES IN VITRO.....</b>	<b>85</b>
I. OBJECTIFS :.....	86
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES :.....	88
II.1. Produits, réactifs et matériel :.....	88
II.1.1. Composés étudiés :.....	88
II.1.2. Animaux utilisés :.....	89
II.1.3. Réactifs et Matériel :.....	89
II.1.3.a. Réactifs :.....	89
II.1.3.b. Matériel :.....	89

II.2.	Description de la méthode :.....	90
II.3.	Dosage des protéines :.....	91
II.4.	Comptage de la Radioactivité :.....	91
II.5.	Dosage H.P.L.C. du céliprolol :.....	91
II.6.	Mesure de la Lactate Déshydrogénase (LDH) :.....	92
II.7.	Calculs :.....	92
III.	EFFETS DES EXCIPIENTS SUR L'ABSORPTION DE LA DIGOXINE :.....	92
III.1.	Méthodologie :.....	93
III.1.1.	Caractéristiques du transport de la digoxine :.....	93
III.1.2.	Effets des excipients sur l'absorption de la digoxine :.....	93
III.1.3.	Effets des excipients sur la toxicité cellulaire :.....	93
III.1.4.	Essais d'associations d'excipients :.....	93
III.1.5.	Étude du mécanisme d'action des excipients :.....	94
III.2.	Résultats :.....	94
III.2.1.	Etudes préliminaires :.....	94
III.2.1.a.	Passage en fonction du temps et de la concentration :.....	94
III.2.1.b.	Comparaison entre sacs éversés et sacs non éversés :.....	95
III.2.1.c.	Influence de la zone intestinale :.....	96
III.2.2.	Excipients sans effets sur l'absorption :.....	97
III.2.2.a.	Absorption dans les contenus :.....	97
III.2.2.b.	Accumulation tissulaire :.....	98
III.2.3.	Excipients modifiant l'absorption :.....	98
III.2.3.a.	Absorption dans les contenus :.....	98
III.2.3.b.	Accumulation tissulaire :.....	99
III.2.4.	Relargage de la Lactate-deshydrogénase (LDH) et de la Phosphatase alcaline (PAL) :.....	101
III.2.4.a.	Relargage de la LDH :.....	101
III.2.4.b.	Relargage de PAL :.....	102
III.2.5.	Effets des excipients sur l'absorption de la digoxine et sur la toxicité :.....	102
III.2.5.a.	Absorption dans les contenus :.....	103
III.2.5.b.	Accumulation tissulaire :.....	105
III.2.5.c.	Libération de LDH :.....	107
III.2.6.	Effets d'associations d'excipients sur l'absorption de la digoxine <i>in vitro</i> :.....	108
III.2.6.a.	Association T.P.G.S./Softigen767 :.....	108
III.2.6.b.	Association T.P.G.S./Labrasol :.....	108
III.2.6.c.	Association T.P.G.S./Solutol HS15 :.....	109
III.2.6.d.	Association T.P.G.S./Acconon E :.....	110
III.2.7.	Étude du mécanisme d'action des excipients :.....	111
IV.	EFFETS DES EXCIPIENTS SUR L'ABSORPTION DU MANNITOL :.....	114
IV.1.	Méthodologie :.....	114
IV.2.	Résultats :.....	114
V.	EFFETS DES EXCIPIENTS SUR L'ABSORPTION DU CÉLIPROLOL :.....	116
V.1.	Validation de la méthode de dosage du Céliprolol :.....	116
V.1.1.	Chromatographie liquide haute performance :.....	116
V.1.1.a.	Phase mobile :.....	116
V.1.1.b.	Analyse chromatographique :.....	117
V.1.2.	Procédure d'Extraction.....	117
V.1.3.	Courbes de calibration :.....	117
V.1.3.a.	Préparation pour le milieu TC199 :.....	117
V.1.3.b.	Préparation pour le tissu intestinal dissous dans la soude 1M et pour le plasma de sang de rat :.....	119
V.1.4.	Contrôles de qualité :.....	120
V.1.4.a.	Préparation pour le milieu TC199 :.....	120
V.1.4.b.	Préparation pour le tissu intestinal dissous dans la soude 1M et pour le plasma de sang de rat :.....	121
V.1.5.	Précision et inexactitude :.....	122
V.1.6.	Contrôles de qualité :.....	123
V.1.7.	Limite de quantification :.....	123
V.1.8.	Expression des résultats :.....	123
V.1.9.	Validation dans le milieu TC 199 :.....	123
V.1.9.a.	Validation intra-jour :.....	123
V.1.9.b.	Validation Interjour.....	125
V.1.9.c.	Reproductibilité des gammes de calibration.....	126
V.1.9.d.	Limite de quantification :.....	126
V.1.9.e.	Spécificité :.....	126
V.1.10.	Résultats dans les tissus dissous dans la soude 1M :.....	126

V.1.10.a. Validation intra-jour :.....	127
V.1.10.b. Validation Interjour :.....	128
V.1.10.c. Reproductibilité des gammes de calibration :.....	129
V.1.10.d. Limite de quantification.....	129
V.1.10.e. Pourcentage d'extraction :.....	129
V.1.10.f. Spécificité :.....	131
V.1.11. Résultats dans le plasma de sang de rat :.....	131
V.1.11.a. Validation intra-jour :.....	131
V.1.11.b. Validation Interjour :.....	132
V.1.11.c. Reproductibilité des gammes de calibration :.....	133
V.1.11.d. Limite de quantification.....	133
V.1.11.e. Pourcentage d'extraction :.....	134
V.1.11.f. Spécificité :.....	134
V.2. <i>Méthodologie</i> :.....	135
V.2.1. Caractéristiques du transport du céliprolol :.....	135
V.2.2. Effets d'inhibiteurs de la P-glycoprotéine sur le passage du céliprolol :.....	135
V.2.3. Effets des excipients sur l'absorption du céliprolol :.....	135
V.3. <i>Résultats</i> :.....	136
V.3.1. Etudes préliminaires :.....	136
V.3.1.a. Passage en fonction du temps et de la concentration :.....	136
V.3.1.b. Comparaison entre sacs éversés et sacs non éversés :.....	137
V.3.1.c. Influence de la zone intestinale :.....	138
V.3.2. Effets du vérapamil et de la quinidine sur le passage du céliprolol :.....	138
V.3.2.a. Céliprolol à 1 mM :.....	138
V.3.2.b. Céliprolol à 100 µM :.....	139
V.3.3. Effets des Excipients sur l'absorption du céliprolol :.....	140
V.3.3.a. Absorption dans les contenus :.....	140
V.3.3.b. Accumulation tissulaire :.....	142
<b>PARTIE D. ETUDES <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>144</b>
I. OBJECTIFS :.....	145
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	145
II.1. <i>Produits, réactifs et matériel</i> :.....	145
II.1.1. Composés étudiés :.....	145
II.1.2. Animaux utilisés :.....	145
II.1.3. Réactifs et Matériel :.....	146
II.1.3.a. Réactifs :.....	146
II.1.3.b. Matériel :.....	146
III. EFFETS DES EXCIPIENTS SUR L'ABSORPTION DE LA DIGOXINE :.....	147
III.1. <i>Methodologie</i> :.....	147
III.1.1. Etudes d'inhibition du cytochrome P450 humain :.....	147
III.1.2. Etudes préliminaires à l'administration <i>per os</i> :.....	147
III.1.3. Effets des excipients sur l'absorption de la digoxine <i>in vivo</i> :.....	148
III.2. <i>Résultats</i> :.....	149
III.2.1. Dosage de la digoxine sur l'automate Cobas Mira® et solubilité dans la phase d'administration :.....	149
III.2.1.a. Principe de la méthode :.....	149
III.2.1.b. Kits de calibration et de contrôles :.....	149
III.2.1.c. Dosage de sérums de rats surchargés en digoxine :.....	150
III.2.1.d. Essai d'administration de digoxine par voie orale :.....	151
III.2.1.e. Vérification de la solubilité dans la phase d'administration :.....	152
III.2.2. Effets des excipients sur l'absorption de la digoxine par voie orale <i>in vivo</i> :.....	152
IV. EFFETS DES EXCIPIENTS SUR L'ABSORPTION DU CÉLIPROLOL :.....	158
IV.1. <i>Methodologie</i> :.....	158
IV.1.1. Etudes préliminaires :.....	158
IV.1.2. Design expérimental :.....	158
IV.1.3. Calculs pharmacocinétiques :.....	159
IV.2. <i>Résultats</i> .....	159
IV.2.1. Etudes préliminaires :.....	159
IV.2.2. Résultats :.....	159
<b>PARTIE E. DISCUSSION.....</b>	<b>163</b>
I. ETUDES <i>IN VITRO</i> :.....	164
I.1. <i>Modification du passage de la digoxine</i> :.....	164

I.2. <i>Modification du passage du céliprolol :</i> .....	172
II. ETUDES <i>IN VIVO</i> :.....	176
II.1. <i>Effets des excipients sur la pharmacocinétique de la digoxine :</i> .....	176
II.2. <i>Effets des excipients sur la pharmacocinétique du céliprolol :</i> .....	180
<b>PARTIE F. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>182</b>
<b>PARTIE G. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>186</b>

## RESUME

La P-glycoprotéine (P-gp) est une glycoprotéine membranaire impliquée dans certains phénomènes d'excrétion active ATP-dépendant. Sa surexpression dans les cellules cancéreuses est à l'origine du phénotype de *multidrug resistance* et entraîne une diminution des concentrations intracellulaires des médicaments cytotoxiques. La P-gp est aussi exprimée physiologiquement dans les tissus sains et notamment au niveau de la face apicale des cellules épithéliales de l'intestin. Ainsi, la biodisponibilité par voie orale de nombreux médicaments peut être affectée négativement par la P-gp qui agit comme une pompe rejetant les xénobiotiques dans la lumière intestinale.

Dans ces travaux, nous avons recherché les interactions potentielles de grandes familles d'excipients pharmaceutiques avec la P-gp à l'aide du modèle *in vitro* du sac d'intestin éversé de rat. Dans cette technique, la muqueuse d'un intestin de rat, et donc la P-gp présente au niveau apical des cellules épithéliales, est mise au contact d'un milieu d'incubation renfermant une molécule de référence (la digoxine ou le céliprolol) substrat de la P-gp en absence ou en présence d'agent modulateur. Plus de vingt molécules ont été testées dans ce modèle. Leur éventuelle toxicité a été déterminée en mesurant la libération d'une enzyme marqueur, la lactate-déshydrogénase. Les composés entraînant une augmentation du passage de la digoxine ou du céliprolol sans effet toxique ont été choisis pour mener une étude *in vivo* chez le rat. Pour les études *in vivo*, l'objectif a été de comparer les proportions absorbées et les cinétiques plasmatiques obtenues chez le rat après administration par voie orale du substrat de la P-gp (digoxine ou céliprolol) seul ou associé aux excipients sélectionnés. Les résultats de ces travaux montrent que les excipients peuvent moduler l'activité de la P-gp quand ils sont solubles en milieu aqueux, et qu'ils présentent des liaisons esters, une chaîne carbonée en C10 environ et des groupements polyoxyéthylènes. Certains auxiliaires de fabrication peuvent donc agir non seulement sur la mise à disposition du principe actif mais aussi sur des systèmes physiologiques limitant leur entrée au niveau intestinal. Cette notion peut revêtir une importance particulière lors de la formulation d'un médicament générique qui peut différer du princeps mais qui ne doit pas entraîner de changement de la réponse *in vivo*.

**Mots clés :** P-glycoprotéine - Modèle *in vitro* du sac d'intestin éversé de rat - Digoxine - Céliprolol - Biodisponibilité - Étude pharmacocinétique .

## SUMMARY

P-glycoprotein (P-gp) is a membrane glycoprotein which is involved in ATP-dependent active extrusion phenomena. In cancer cells, overexpression of P-gp causes multidrug resistance phenotypes and leads to a decrease of the intracellular concentration of cytotoxic drugs. P-gp is also expressed in normal tissues and particularly at the apical face of intestinal epithelial cells. Thus, the oral bioavailability of various drugs can be negatively affected by P-gp which acts as a pump extruding xenobiotics in the intestinal lumen.

In this study, we have looked for potential interactions between a large family of pharmaceutical excipients and P-gp using the *in vitro* rat everted gut sac model. In this technique, the rat intestinal mucosa, and thus the P-gp of the apical face of enterocytes placed in an incubation medium containing a P-gp substrate reference molecule (digoxin or celiprolol) with or without a modulating agent. More than twenty excipients have been evaluated with this model. Their possible toxicity has been determined by measuring the release of a probe enzyme, lactate dehydrogenase. Excipients causing an increase of the digoxin or celiprolol uptake were selected to perform an *in vivo* study with rats. In these *in vivo* studies, the purpose was to compare the fraction absorbed and plasma pharmacokinetics obtained after the oral administration of the P-gp substrate (digoxin or celiprolol) alone or associated with chosen excipients. The results of this study show that pharmaceutical excipients can modulate P-gp activity when they are soluble, and when they have ester bonds, a C10 carbonated chain and polyoxyethylene groups. So, certain pharmaceutical excipients can act non only on the drug dissolution but also on physiologic systems restricting intestinal penetration of drugs. This observation is of particular importance when considering the formulation of generic drugs, where the formulation may differ from the original, but must not modify the *in vivo* behaviour of the drug.

**Keywords :** P-glycoprotein - *In vitro* rat everted gut sac model - Digoxin - Celiprolol - Bioavailability - Pharmacokinetic study .