



HAL
open science

Application de la classification biopharmaceutique des médicaments au développement de compléments nutritionnels et évaluation de l'impact de la qualité des ingrédients sur la biodisponibilité.

Mohamed Ali Begag

► **To cite this version:**

Mohamed Ali Begag. Application de la classification biopharmaceutique des médicaments au développement de compléments nutritionnels et évaluation de l'impact de la qualité des ingrédients sur la biodisponibilité.. Santé. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2020. Français. NNT : 2020CLFAC090 . tel-04013338

HAL Id: tel-04013338

<https://theses.hal.science/tel-04013338>

Submitted on 3 Mar 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

*ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT*

N° d'ordre :

Thèse

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Biopharmacie et technologie pharmaceutique

Unité de recherche : UMR 454 MEDiS

Soutenue le 08 septembre 2020

Ali BEGAG

Application de la classification biopharmaceutique des médicaments au
développement de compléments nutritionnels et évaluation de l'impact
de la qualité des ingrédients sur la biodisponibilité

Directeur de thèse : Pr Éric BEYSSAC (Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand)

Membre du jury : M. Frédéric BARBALAT (Société RecoverLab, Clermont-Ferrand)

Rapporteurs : Dr. Valérie HOFFART (Université Paris Descartes)
Dr. Mohamed SKIBA (Université de Rouen)
Pr. Marylène VIANA (Université de Limoges)



Remerciements

Trois années de thèses paraissent très longues au départ, mais je ne réalise toujours pas qu'en ce moment, je me retrouve en train d'écrire mes remerciements, une des étapes finales qui me dit que c'est bientôt terminé, et qu'il faudrait commencer une nouvelle aventure, à laquelle j'étais bien préparé tout au long de cette période.

Ce travail a été effectué au sein de l'unité mixte de recherche UMR MEDiS-454 (Microbiologie, Environnement Digestif et Santé) dans le laboratoire de biopharmacie de la faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand. Je tiens tout d'abord à en remercier très vivement les directeurs : Pr Monique ALRIC, Pr. Jean-Michel CARDOT et Pr. Pierre PEYRET de m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

Je remercie également Dr. Valérie HOFFART, Dr. Mohamed SKIBA et Pr. Marylène VIANA, qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse et pour avoir accepté et pris le temps de juger ce travail ; je les en remercie vivement.

Ensuite, je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à mes directeurs de thèse : M. Frédéric BARBALAT et Pr. Éric BEYSSAC, car sans eux, cette thèse n'aurait jamais vu le jour.

Frédéric, d'abord je te remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir accordé ta confiance pour réaliser ce projet de recherche, je sais que tu as consacré beaucoup de temps afin d'obtenir, et cofinancer cette thèse, c'est un grand honneur pour moi d'être ton candidat numéro un. Je te remercie également de ton soutien qui dure depuis mon stage chez RecoverLab jusqu'à aujourd'hui, merci de tes conseils et surtout de ta patience et de ta gentillesse. Que tu sois persuadé de ma profonde reconnaissance.

Éric, les mots sont insuffisants pour t'exprimer ma réelle reconnaissance. Je te remercie de m'avoir accepté dans ton équipe, de ta confiance et surtout de ta grande gentillesse et les fruits que tu m'offrais chaque jour au repas de midi. J'ai énormément appris à tes côtés aussi bien du côté professionnel et scientifique que relationnel. Je garderai toujours de bons souvenirs de tous les moments qu'on a eu ensemble, les discussions et aussi de tes blagues très spéciales. Je ne saurais te remercier assez.

J'ai eu la chance de travailler au sein d'une très bonne équipe que je considérais comme ma deuxième famille pendant ces trois ans de thèses.

Je remercie chaleureusement Dr. Ghislain GARRAIT de m'avoir épaulé tout au long de cette période, de m'avoir aidé dans les expérimentations animales et surtout d'être le sauveur face aux problèmes analytiques. Dr Emmanuelle LAINÉ, pour son aide et pour sa bonne humeur quotidienne. Sandrine, essentiellement pour ses fou-rires !! Khaled, mon partenaire des pauses clope sur la passerelle et Améline, ma voisine du bureau et mon bras droit.

Je ne saurais oublier toute l'équipe du labo et de la fac, mais je tiens à remercier particulièrement les gens du 5^{ème} : Lucie, Sophie, Thomas, Ophélie, Claude, Carine, Cécile, Sylvain, Stéphanie, Elora et Charlotte avec qui j'ai partagé pleins de moments ; Les réunions mensuelles de convivialité, les repas de Noël, les pique niques...etc. Je vous remercie tous de votre gentillesse et de la bonne ambiance.

Enfin, je ne pourrais terminer sans remercier mes deux amours, ma femme Loubna, qui était toujours à mes côtés et qui m'a supporté pendant les heures de rédaction, et surtout depuis son arrivée, elle m'a changé du sandwich bagnat au poulet que je prenais tous les jours.

Ma petite Dina qui m'a apporté tellement de joie pour cette fin de thèse, elle était sage pendant que papa terminait la rédaction. Merci pour tous ces moments de bonheur passés à vos côtés, je vous dédie cette thèse.

Liste des abréviations

ABC : Atp-Binding Cassette

ACN : Acétonitrile

ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail

AT: Active Transport

ATP: Adenosine Triphosphate

BCS: Biopharmaceutical Classification System

BDDCS: Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System

BP: Bilayer Permeability

CCD : Curcumin-CycloDextrin complex

CMC: Concentration Micellaire Critique

CN : Natural Curcumin

CPVP : Curcumin-PVP solid dispersion

CTAB: hexadecyltrimethylammonium Bromide

CYP3A4: Cytochrome P450 3A4

CYP450: Cytochromes P450

DAD: Diode Array Detector

DCS: Developability Classification System

DCS: Dual-Comb Spectroscopy

DE : Dissolution Efficiency

DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : DiMéthylSulfOxide

EFSA: European Food Safety Authority

EMA: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products

EMEM : Eagle's Minimal Essential Medium

ET : Efflux Transporters

EurPh 10.0 : European Pharmacopoeia 10.0

F_{abs}: Biodisponibilité absolue

FaSSGF: Fast State Simulated Gastric Fluid

FaSSIF: Fasted State Simulated Intestinal Fluid

FeSSGF: Fed State Simulated Gastric Fluid

FeSSIF: Fed State Simulated Intestinal Fluid

FIP: Fédération Internationale Pharmaceutique.

FoSSand: Food Supplement Standardized Development Method

F_{rel}: Biodisponibilité relative

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy

GI: Gastro Intestinal

HLB: Balance Hydrophile Lipophile

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IP: Iodure de Propidium

IR: Immediate Release

IV: Intra-Veineuse

IVIVIC: *In Vitro In Vivo* Correlation

JS: Jonctions Serrées

LADME : Libération, Absorption, Distribution, Elimination

MDT: Median Deviation Time

ML: Mucin Layer

MR: Modified Release

MRP2: Multi-drug Resistance-associated protein 2

NuBACS : Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme

Papp : perméabilité apparente

Pe_{ff} : perméabilité effective

P-gp: P-Glycoprotéine

RDA : Apport Diététique Recommandé,

RPM: Rotation Par Minute

Rsv: Resveratrol

SA: Substance Active

SDS: Lauryl Sulfate De Sodium

SLC: Solute Carrier

SYSADOA: Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis

TD : Tube Digestif

TDM : Temps de Dissolution Moyen

TGI: Tractus Gastro-Intestinal

TJ: Tight Junction

UE : Union Européenne

UV : Ultra-Violet

XRD: X Ray Diffraction

Glossaire

Aliment

L'aliment est un élément d'origine animale, végétale, fongique (parfois bactérienne ou minérale) ou chimique, consommé par des êtres vivants à des fins énergétiques ou nutritionnelles, dans le processus d'alimentation.

Nutriment

Les nutriments, ou éléments nutritifs, sont constitués dans le corps par l'ensemble des composés organiques et inorganiques nécessaires à l'organisme vivant pour entretenir la vie. Le processus d'assimilation des nutriments est la nutrition. Les nutriments sont des composants élémentaires contenus dans les aliments, ou issus de la nature ambiante. Ils sont utilisés par l'organisme pour couvrir ses besoins physiologiques, notamment de son développement et de sa croissance. Un nutriment peut être directement assimilé sans aucune modification chimique.

Aliment fonctionnel

Qui fait partie de l'alimentation normale, qui en a l'apparence et qui a pour caractéristique de procurer des effets physiologiques bénéfiques dépassant ses fonctions nutritionnelles de base ou de réduire le risque de maladies chroniques.

Nutraceutique

Composante bénéfique d'un aliment fonctionnel qui est extraite pour être vendue sous forme de pilules, de poudre ou sous d'autres formes médicinales qui ne sont pas généralement liées à des aliments.

Complément alimentaire

Denrée alimentaire dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité (Article 2 du Décret n°2006-352)

Médicament

Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines. Toute substance ou composition pouvant être administrée à l'homme en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques chez l'homme est également considérée comme médicament » (WHO Drug Dictionary Enhanced), (Directive européenne 65/65).

Liste des figures

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

Figure 1 Etapes de mise à disposition de la substance active à partir d'une forme orale solide (Système LADME) (4).....	12
Figure 2 Le devenir du médicament dans l'organisme : de l'ingestion à la réponse pharmacologique (12).....	16
Figure 3 Exemple d'un profil pharmacocinétique montrant la définition de la biodisponibilité orale d'une SA .	17
Figure 4 Exemple de profils pharmacocinétiques expliquant la détermination de la biodisponibilité absolue (F_{abs})	18
Figure 5 Schéma explicatif de l'effet du premiers passage hépatique (18).....	20
Figure 6 Exemple de profils pharmacocinétique expliquant la détermination de la biodisponibilité relative (F_{rel})	21
Figure 7 Schéma anatomique du tube digestif (23).....	24
Figure 8 Représentation schématique des différentes parties de l'estomac (27).....	26
Figure 9 Histologie Microscopique de l'estomac (28)	27
Figure 10 Structure de l'intestin grêle (32).....	30
Figure 11 . Représentation des diverses cellules présentes sur les microvillosités intestinales (33).....	31
Figure 12 Schéma montrant les mouvements péristaltiques intestinaux (34).....	32
Figure 13 Les mécanismes de transport des substances actives (44)	35
Figure 14 Organisation anatomique du côlon (45).....	36
Figure 15 Influence des pH GI sur la résorption des acides faibles (a) et bases faibles (b) (47).....	42
Figure 16 Exemple de l'influence de la taille des particules sur la vitesse de dissolution (cas de la phénacétine) dans un milieu gastrique 0.1 N : ● particules de 0.11 à 0.15 mm, ○ particules de 0.21 à 0.30 mm, Δ particules de 0.50 à 0.71 mm (49).....	43
Figure 17 Pic plasmatique (C_{max}) observé en fonction du pourcentage de la forme polymorphe B du chloramphénicol (50).....	44
Figure 18 Schéma explicatif des mécanismes et des voies d'absorption (56).....	46
Figure 19 Les étapes de la mise à disposition de la SA dans l'organisme	51

CHAPITRE II

Figure 20 Schéma illustrant la dissolution d'une particule selon la théorie de la couche de diffusion (63)	56
Figure 21 Appareil à paniers tournant (d'après EurPh 10.0) (a) schéma du panier, (b) schéma du réacteur(b) photographie de l'ensemble (panier + réacteur).....	59
Figure 22 Appareil à palettes tournantes selon EurPh 10.0: (a) schéma des palettes, (b) schéma du réacteur, (c) dispositif de lestage. (d) photographie de l'appareil	60
Figure 23 Appareil à cylindre réciproque selon EurPh 10.0; (a) schéma et mode de fonctionnement, (b) photographie de l'appareil.....	62
Figure 24 Cellule à flux continu selon EurPh 10.0; (a) description d'une cellule, (b) photographie de l'appareil, (c) schéma de fonctionnement en circuit ouvert et circuit fermé.	63
Figure 25 Les types de cellules à flux pour les différentes formes pharmaceutiques (72).....	64
Figure 26 Les principaux modèles des courbes de dissolution in vitro (78).	71

Figure 27 Méthodologies fréquemment utilisées dans l'évaluation de la perméabilité (86).....	77
Figure 28 Représentation schématique du système Transwell® (97)	79
Figure 29 Schéma représentant des étapes de la maturation des cellules Caco-2 (confluence au milieu puis différenciation au bout de 21 jours environ) (98).....	79
Figure 30 a) Schéma représentatif de l'électrode placée dans l'insert de culture cellulaire Traswell®. NB : l'électrode courte ne doit pas être en contact avec la couche cellulaire, tandis que l'électrode longue doit simplement toucher le fond de l'insert b) image de l'appareil de mesure MilliporeSigma™ Millicell-ERS2 ® (98)	82
Figure 31 a) Représentation schématique du système de l'intestin isolé ; b) Photographie du système.....	84
Figure 32 Biopharmaceutical Classification System (115)	86
Figure 33 Relation entre la perméabilité apparente et la biodisponibilité absolue (117)	88
Figure 34 Developability Classification System (DCS)(124).	93

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III

Figure 1 Structure de la caféine.....	111
Figure 2 Structure de la glucosamine	114
Figure 3.a) Photographie de l'appareil.....	116
Figure 4 Voltmètre épithélial (EVOM ² World Instrument Precision TM) pour la détermination de la résistance électrique trans-épithéliale	120
Figure 5 Montage de l'étude de perméabilité sur intestin isolé d'après (19).....	122
Figure 6 Chromatogramme obtenu lors du dosage de la caféine.....	123
Figure 7 Chromatogramme obtenu lors du dosage de la glucosamine	124
Figure 8 Résultats de dissolution apparente, présentés en quantités et % dissous, des poudres de caféine dans le tampon pH 1,2 (n=3).....	125
Figure 9 Résultats de dissolution apparente présentés en quantités et % dissous, des poudres de caféine dans le tampon pH 4,5 (n=3)	126
Figure 10 Résultats de dissolution apparente présentés en quantités et % dissous, des poudres de caféine dans le tampon pH 6,8 (n=3).....	126
Figure 11 Résultats de perméabilité apparente sur le modèle Caco-2 de la caféine (n=3).....	127
Figure 12 Taux de viabilité cellulaire (%) des échantillons testés de caféine (n=3) mesuré par cytométrie	128
Figure 13 Valeurs du TEER (%) évalués en T0, T2 et T48 (n=3).....	129
Figure 14 Résultats de perméabilité de la caféine sur le modèle ex vivo	129
Figure 15 Structure de la glucosamine base et de ses sels (28)	132
Figure 16 Résultats de dissolution apparente des poudres de glucosamine dans le tampon pH 4,5 (n=3).....	133
Figure 17 Résultats de perméabilité apparente sur le modèle Caco-2 de la glucosamine base (n=3)	134
Figure 18 Taux de viabilité cellulaire calculé (%) des échantillons testés de glucosamine (n=3).....	135
Figure 19 Valeurs du TEER (%) évalués en T0, T2 et T48 (n=3).....	136
Figure 20 Résultats de perméabilité de la glucosamine sur le modèle ex vivo	137

CHAPITRE IV

Figure 1 Rsv Spectrums (all batches except Rsv07)	158
Figure 2 Example of Rsv08 FTIR spectrum with details	158
Figure 3 Trans-Resveratrol Structure	158
Figure 4 Rsv07 FTIR spectrum	159
Figure 5 Chemical structure of Maltodextrin	159
Figure 6 Maltodextrin FTIR Spectrum.....	159
Figure 7 ¹ H NMR Nuclear magnetic resonance spectra of: a) Maltodextrin, b) Rsv07, c) Rsv11, d) Rsv06 and e) Rsv02	160
Figure 8 X-ray diffraction spectra of Rsv samples.....	161
Figure 9 Rsv particle size analysis	162
Figure 10 Particle size analysis of different batches of synthetic origin resveratrol	163
Figure 11 Particle size analysis of different batches of natural origin resveratrol.....	163
Figure 12 Particle size analysis of different batches of natural origin resveratrol.....	164
Figure 13 Particle size analysis of resveratrol from different origins.....	164
Figure 14 Rsv Solubility in pH 1.2, pH 4.5 and pH 6.8 buffers. Solubility value statistically different from the control *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0,001.....	165
Figure 15 Dissolution profiles of all resveratrol Batches in pH 6,8	167
Figure 16 Resveratrol permeability study in Caco-2 model.....	170
Figure 17 Cell viability (%) of Resveratrol tested on Caco-2. Viability value statistically different from the control (PBS) *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0,001.	172
Figure 18 TEER (%) profiles evaluated at T0, T2 and T48. TEER value statistically different from the control *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0,001.....	173
Figure 19 Resveratrol permeability study in ex vivo model of different batches.....	173
Figure 20 a) Comparing Rsv02 ex vivo permeability in suspension (Sus) vs supernatant (Sn).....	175
Figure 21 Correlation between in vitro permeability (Papp) and ex vivo permeability (Peff) of four Resveratrol batches.....	176

CHAPITRE V

Figure 1 Sample preparation, extraction of curcumin for LC-MS quantification	192
Figure 2.a) Curcumin chemical structure (Ketonic form)	193
Figure 3 Beta cyclodextrin chemical structure	194
Figure 4 Proposed inclusion complex formation of curcumin with cyclodextrin. (17)	194
Figure 5 FTIR Spectrum of Natural Curcumin (CN)	196
Figure 6 CCD FTIR Spectrum	197
Figure 7 Polyvinylpyrrolidone chemical structure	197
Figure 8 FTIR Spectrum of PVP solid dispersion curcumin (C-PVP).....	197
Figure 9 FTIR Spectrum of pure PVP.....	198
Figure 10 X-ray diffraction pattern of curcumin samples	198
Figure 11.a) Particle size distribution of CN.....	200
Figure 12 Curcumin solubility in different dissolution media (pH 1.2, pH 4.5 and pH 6.8).....	201

Figure 13.a) Curcumin raw material dissolution in pH 1.2 in amount and percent dissolved expressed in curcumin (n=3).....	202
Figure 14 Amount absorbed of curcumin samples on Caco2 cells at 1h and 2h.	205
Figure 15 Cell viability (%) of curcumin samples tested on Caco-2.....	206
Figure 16 TEER (%) profiles evaluated at T0, T2 and T48. TEER value statistically different from the control* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$	207

CHAPITRE VI

Figure 1 Les grandes familles d'ingrédients utilisés dans les compléments alimentaires	217
Figure 2 Classification des nutraceutiques sur la base de trois grands aspects: fonction, composant bioactif et source nutritionnelle. (6).....	220
Figure 3 Biopharmaceutical Classification System (8)	221
Figure 4 NuBACS the Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme (11)	222
Figure 5 Représentation graphique des proportions des différentes classes dans la base de données	227
Figure 6 Représentation graphique de tous les éléments	228
Figure 7 Représentation graphique des éléments possédant au moins une allégation santé	229
Figure 8 Représentation graphique des vitamines	230
Figure 9 Représentation graphique des minéraux	231

CHAPITRE VII

Figure 1 Logigramme de la méthode FoSStand	241
---	-----

Liste des tableaux

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1 Exemples de facteurs affectant la biodisponibilité orale	23
Tableau 2 Caractéristiques anatomiques et physiologiques des différentes sections du tractus gastro-intestinal (24,25).....	25
Tableau 3 Principales caractéristiques des modes de transport des substances à travers les membranes (39).....	34
Tableau 4 Exemples de milieux de dissolution.....	67
Tableau 5 Composition des milieux de dissolution simulant les conditions à jeun (FaSSGF), en période post-prandiale (FeSSGF) dans l'estomac, à jeun (FaSSIF) et en période post-prandiale (FeSSIF) dans la partie proximale de l'intestin grêle (74).....	70
Tableau 6 Composition du tampon de Krebs-Henseleit (112).....	83
Tableau 7 La classification BDDCS	92

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III

Tableau 1 Spécifications des échantillons de caféine testés.....	112
Tableau 2 Spécification des échantillons testés de la glucosamine.....	114
Tableau 3 Taux de dissolution des poudres de caféine à 15 min (n=3) en fonction du pH.....	126
Tableau 4 Quantité, taux absorbé et perméabilité apparente (P_{app}) des poudre de caféine	127
Tableau 5 Quantité, taux absorbée (%) et perméabilité effective (P_{eff}) de la caféine sur le modèle ex vivo (n=3).	130
Tableau 6 Taux de dissolution et quantités dissoutes de glucosamine à 15 min (pH 4,5)	133
Tableau 7 Quantité, taux absorbé et perméabilité apparente (P_{app}) des échantillons testés de glucosamine sur le modèle in vitro (Caco-2).....	134
Tableau 8 Quantités, taux absorbée (%) et perméabilité effective (P_{eff}) à 120 min sur le modèle ex vivo des échantillons testés de glucosamine.....	137

CHAPITRE IV

Table 1 Resveratrol specifications and origins	149
Table 2 Table representing Rsv Distribution Volumes Dv_{10} , Dv_{50} , Dv_{90} and distribution width (Span) of the different resveratrol batches	162
Table 3 Resveratrol dissolution at 120 min (% and amount).....	167
Table 5 Amount, % absorbed at 120 min and apparent permeability (P_{app}) of Resveratrol tested	171
Table 6 Amount, % absorbed at 120 min and effective permeability (P_{eff}) of Resveratrol tested	174

CHAPITRE V

Table 1 Distribution volumes 10, 50 and 90 of curcumin samples	199
Table 2 Amount released at 120 min and % dissolved of curcumin samples in pH 1.2, 4.5 and 6.8	203
Table 3 Evaluation of mean apparent permeability (P_{app}) of CN, CCD and CPVP across Caco-2 cell monolayers after 2h incubation.	205

CHAPITRE VI

Tableau 1 Proportions des classes des ingrédients nutritionnels dans la base de données.....	226
---	-----

Sommaire

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION ET CONTEXTE	1
CHAPITRE I :.....	9
I. Devenir des substances actives dans l'organisme après une administration orale	11
I.1 La voie orale	11
I 1.1 La phase biopharmaceutique :	11
I 1.2 La phase pharmacocinétique.....	13
I 1.3 La phase pharmacodynamique.....	16
II. Définition de la biodisponibilité orale.....	17
II.1 Biodisponibilité absolue	18
II 1.1 Premier passage intestinal.....	19
II 1.2 Premier passage membranaire	19
II 1.3 Premier passage hépatique.....	20
II.2 Biodisponibilité relative.....	21
II.3 Bioéquivalence	22
II 3.1 Équivalents pharmaceutiques	22
II 3.2 Alternatives pharmaceutiques.....	22
II 3.3 Bioéquivalence et compléments alimentaires	22
III. Facteurs influençant la biodisponibilité.....	23
III.1 Anatomie et physiologie du TGI :	23
III 1.1 Physiologie du tube digestif	24
III 1.2 La bouche et l'œsophage.....	25
III 1.3 L'estomac.....	25
III 1.4 L'intestin grêle.....	29
III 1.5 Les mécanismes de passage	33
III 1.6 Le colon	36
III.2 Les facteurs physiologiques	37
III 2.1 L'absorption au niveau des différentes régions du TD.....	37
III 2.2 L'âge du sujet.....	38
III 2.3 La grossesse	39
III 2.4 L'alimentation.....	39
III.3 Les facteurs physiopathologiques.....	39
III.4 Facteurs liés à la substance active :	40
III 4.1 La solubilité.....	40
III 4.2 Le pH du milieu et l'état d'ionisation de la SA.....	41
III 4.3 La taille des particules.....	42
III 4.4 Les modifications de l'état physique.....	43
III 4.5 Le polymorphisme.....	43
III 4.6 Le coefficient de partage	44
III 4.7 Perméabilité de la SA.....	45
CHAPITRE II :	49
I. Etudes des facteurs influençant la biodisponibilité.....	51
I.1 Dissolution	51
I 1.1 Introduction.....	51
I 1.2 Objectifs de la dissolution.....	53
I 1.3 La théorie de la dissolution	55
I 1.4 Appareils de dissolution.....	57
I 1.5 Les paramètres de dissolution	64

I 1.6 Interprétation et modélisation des cinétiques de dissolution	70
I.2 Perméabilité	76
I 2.1 Introduction.....	76
I 2.2 Modèle cellulaire in vitro « Caco2 ».....	78
I 2.3 Évaluation de l'intégrité de la membrane et de la viabilité des cellules	80
I 2.4 Modèle tissulaire <i>ex vivo</i> « Intestin isolé »	82
II. La classification biopharmaceutique	85
II.1 Biopharmaceutical Classification System (BCS)	85
II 1.1 Les paramètres de la classification BCS.....	88
II 1.2 La description des classes.....	90
II 1.3 Les applications de la classification BCS	91
II.2 Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System (BDDCS)	92
II.3 DCS	93
III. Conclusion :	94
IV. Références.....	95

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III	107
I. Introduction.....	109
II. Produits étudiés	111
II.1 Caféine.....	111
II.2 Glucosamine	113
III. Matériels et méthodes.....	115
III.1 Préparation des milieux de dissolution	115
III.2 Etude de solubilité	115
III.3 Etude de dissolution apparente.....	115
III.4 Etude de perméabilité apparente sur cultures cellulaires Caco-2	118
III 4.1 Culture cellulaire	118
III 4.2 Mode opératoire	119
III 4.3 Validation du test de perméabilité sur les Caco-2	119
III.5 Etude de perméabilité effective <i>Ex vivo</i> (Intestin isolé)	121
III 5.1 Animaux.....	121
III 5.2 Mode opératoire	121
III.6 Dosage des échantillons	123
IV. Résultats et discussion	125
IV.1 Caféine	125
IV 1.1 Solubilité.....	125
IV 1.2 Dissolution apparente.....	125
IV 1.3 Perméabilité apparente sur Caco-2.....	127
IV 1.4 Perméabilité effective <i>ex vivo</i> déterminée sur intestin isolé.....	129
IV.2 Glucosamine.....	131
IV 2.1 Solubilité.....	131
IV 2.2 Dissolution apparente.....	132
IV 2.3 Perméabilité apparente sur Caco-2.....	133
IV 2.4 Perméabilité effective <i>ex vivo</i> déterminée sur intestin isolé.....	136
V. Conclusion	141
VI. Références.....	142
 CHAPITRE IV	 145
I. Introduction.....	147
II. Materials and methods.....	149
II.1 Resveratrol	149
II.1 Reagent	149

II.2 FTIR analysis.....	149
II.3 ¹ H NMR	150
II.4 Powder X-Ray Diffraction.....	150
II.5 Particle size measurement.....	150
II.6 Solubility and dissolution experiments	150
II 6.1 Preparation of dissolution media	150
II 6.2 Solubility study.....	150
II 6.3 Dissolution study	151
II.7 Evaluation of apparent permeability with Caco-2cells	151
II 7.1 Cell culture	151
II 7.2 Caco-2 assay.....	151
II 7.3 Evaluation of the membrane integrity and cells viability	152
II.8 Evaluation of effective permeability.....	154
II 8.1 Animals	154
II 8.2 Preparation of excised jejunum segments.....	154
II 8.3 Intestinal permeability study.....	154
II.9 HPLC analysis	155
II.10 Statistical analysis.....	155
II 10.1 Dissolution analysis.....	155
III. Results and discussion	157
III.1 FTIR analysis	157
III.2 ¹ H NMR.....	159
III.3 Powder X-Ray Diffraction	160
III.4 Particle size determination	161
III.5 Solubility	165
III.6 Dissolution	166
III.7 Evaluation of apparent permeability with Caco-2cells.....	170
III.8 Evaluation of effective permeability	173
III.9 Apparent and effective permeability comparison	176
IV. Conclusion	177
V. References	178
CHAPITRE V :.....	183
I. Introduction.....	185
II. Materials and methods.....	187
II.1 Curcumin	187
II.2 Reagent	187
II.3 FTIR analysis.....	187
II.4 Powder X-Ray Diffraction.....	187
II.5 Particle size measurement.....	188
II.6 Solubility and dissolution experiments	188
II 6.1 Preparation of dissolution media	188
II 6.2 Solubility study.....	188
II 6.3 Dissolution study	188
II.7 Evaluation of apparent permeability with Caco-2cells	189
II 7.1 Cell culture	189
II 7.2 Caco-2 assay.....	189
II 7.3 Evaluation of the membrane integrity and cells viability	190
II.8 Analytical methods	190
II 8.1 High-Performance Liquid Chromatography	190
II 8.2 Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS).....	191
III. Results.....	193
III.1 Rationale of products studied	193
III.2 FTIR analysis	195
III.3 Powder X-Ray Diffraction	198
III.4 Particle size measurement	199

III.5 Solubility study	201
III.6 Dissolution test	202
III.7 Evaluation of apparent permeability with Caco-2cells	205
IV. Conclusion	208
V. References	209
Chapitre VI	213
I. Introduction.....	215
II. Ingrédients autorisés en compléments alimentaires et contexte règlementaire.....	217
II.1 Les nutriments	218
II.2 Les substances à but nutritionnel ou physiologique.....	218
II.3 Les plantes et préparation de plantes	218
II.4 Autres ingrédients ou Novel Food	219
II.5 Additifs, arômes et auxiliaires technologiques	219
II.6 Classification des ingrédients	219
III. Rappel des systèmes de classifications biopharmaceutiques	221
III.1 BCS	221
III.2 The Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme	222
IV. Proposition d'une classification appliquée aux nutraceutiques.....	224
IV.1 FoSStand (Food Supplement Standardized Development).	224
IV 1.1 Adaptation de la classification BCS aux compléments alimentaires	224
IV 1.2 Construction de la base de données.....	225
V. Conclusion	232
VI. Références.....	233
CAPITRE VII.....	235
I. Conclusion générale.....	237
II. Perspectives.....	239
II.1 Etudes de pré-formulation	239
II 1.1 Caractérisations physico chimiques.....	239
II 1.2 Etudes biopharmaceutiques :	239
II 1.3 Classification et sélection du meilleur ingrédient nutritionnel pour les études de développement	239
II.2 Formulation et développement de compléments alimentaires	240
Annexe I	243

INTRODUCTION ET CONTEXTE

Introduction et contexte

Les compléments alimentaires font l'objet d'une attention considérable en raison de leur apparente sécurité, et de leurs perspectives nutritionnelles et thérapeutiques. Créé il y a une vingtaine d'années, pour décrire l'union entre la nutrition et la santé, le terme « nutraceutique » regroupe ainsi ces deux éléments clés qui contribuent au bien-être humain. Les compléments alimentaires sont des ingrédients alimentaires ou provenant de produits alimentaires qui fournissent des avantages supplémentaires pour la santé, en plus de la valeur nutritive de base trouvée dans les aliments. Ils constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances et présentent un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés. Les compléments nutritionnels reprennent les codes et le design des médicaments, ils sont commercialisés sous forme de doses, avec des formes de présentation telles que des solutions, sachets de poudre, des capsules molles, des gélules, des comprimés et autres formes similaires, destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité.

La nutrition est un domaine très concurrentiel où s'affrontent des intérêts économiques et des problématiques scientifiques mais c'est aussi une zone de convergence entre l'agroalimentaire et la pharmacie. En développant des produits nutritionnels, dont les compléments alimentaires, les industriels ont ainsi élargi leur offre dans le domaine nutritionnel aussi bien pour les pays développés que pour les pays émergents. Ce marché, dit nutraceutique, est donc en pleine expansion, de l'ordre de 20 à 25 % par an. La croissance s'est répartie à parts à peu près égales entre les compléments alimentaires, c'est-à-dire les produits « de complément » qui ne sont pas associés à la prise d'aliments, et les aliments fonctionnels, c'est-à-dire l'alimentation directement supplémentée. Le marché des compléments alimentaires a atteint 1,9 milliard d'euros en 2019, les produits de la ruche, les plantes médicinales, les vitamines et minéraux, les omégas 3,6,9, les huiles essentielles, le curcuma et les antioxydants ont réussi à convaincre 80 % des personnes de leur efficacité dans bien des domaines.

L'Union européenne (UE) a introduit des règles harmonisées pour contribuer à garantir que les compléments alimentaires soient sans danger et étiquetés de manière appropriée. Au sein de l'UE, les compléments alimentaires sont réglementés en tant que denrées alimentaires et la législation se focalise sur les vitamines et les minéraux utilisés en tant qu'ingrédients des compléments alimentaires. Si actuellement cette législation fixe des limites maximales afin de garantir la sécurité de l'utilisation de ces substances dans les compléments alimentaires, en ce qui concerne leur biodisponibilité, la guideline actuelle ne propose ni une définition, ni n'indique quels paramètres doivent être mesurés pour démontrer la biodisponibilité des nutriments (ou d'autres ingrédients) à partir de la forme administrée par voie orale.

Dans la lignée du développement des médicaments, appliquée par l'industrie pharmaceutique, des réflexions émergent au niveau des compléments alimentaires aussi bien de la part des autorités que des acteurs du secteur (industriels et chercheurs). Ces points de réflexion majeurs portent sur i) la qualité des sources de matières premières, ii) leurs caractéristiques physico-chimiques et leurs propriétés fonctionnelles, iii) l'impact de la matrice d'administration sur la « bioaccessibilité » des actifs et iv) la biodisponibilité et l'interchangeabilité des compléments alimentaires disponibles sur le marché. Ces pistes de recherche visent à améliorer la qualité et la sécurité des produits pour garantir une efficacité optimale et une innocuité réduite au consommateur.

Pour les médicaments, en reconnaissant que la dissolution et la perméabilité gastro-intestinale d'une molécule chimique sont les paramètres fondamentaux qui contrôlent sa vitesse et sa quantité absorbée, un schéma de classification biopharmaceutique a été mis en place et adopté par l'EMA et la FDA dans des textes similaires. Cette classification biopharmaceutique, qui permet de classer les substances actives en 4 classes (1 à 4) en fonction de leur solubilité et de leur perméabilité, permet d'établir une corrélation entre la dissolution *in vitro* d'une forme pharmaceutique et sa biodisponibilité *in vivo*. L'intérêt premier de cette classification est d'accorder des dispensations d'études de bioéquivalence et d'utiliser seulement des tests *in vitro* suffisamment fiables pour remplacer les études *in vivo* de bioéquivalence chez l'homme. En complément, elle permet d'identifier le facteur limitant qui influence directement la biodisponibilité et d'orienter le développement sur la technologie/galénique la plus appropriée en vue d'offrir au patient, un produit dont la biodisponibilité est contrôlée ou améliorée. Cette approche peut aussi inclure les probiotiques en remplaçant la notion de biodisponibilité par celle de bioaccessibilité et en intégrant la survie dans l'environnement digestif comme critère de classification. Une ébauche de réflexion sur la pertinence d'une classification des ingrédients nutritionnels en prenant comme référence la BCS est actuellement en cours et quelques publications dans ce sens sont disponibles.

Dans le cas des ingrédients nutritionnels et des compléments alimentaires formulés à partir de ces matières premières, les effets potentiels de bon nombre de ces produits peuvent être limités en raison de leur faible et/ou variable biodisponibilité orale. Cette biodisponibilité peut être limitée par divers facteurs physico-chimiques et/ou phénomènes physiologiques comme : la structure du produit, sa solubilité dans les fluides gastro-intestinaux, les interactions avec les composants gastro-intestinaux, la dégradation chimique et la perméabilité à travers les cellules épithéliales. Il est donc important de pouvoir évaluer la biodisponibilité des produits et dans certains cas d'améliorer la biodisponibilité des actifs contenus dans les compléments alimentaires. Pour cela, il est nécessaire de développer des produits sur une base rationnelle et

scientifique et de disposer, en parallèle, de méthodes standardisées permettant de garantir la biodisponibilité des substances actives à partir des matrices d'administrations formulées.

S'il existe actuellement sur le marché des compléments alimentaires des formes revendiquant une libération prolongée (gastro-résistante, libération contrôlée), aucune validation n'a été réellement effectuée par les industriels et n'est réclamée par les autorités. Le règlement (UE) N° 231/2012 du 9 mars 2012 établit les spécifications des additifs alimentaires et permet à des excipients d'enrobage, notamment, ayant fait leurs preuves dans le domaine de la libération contrôlée dans le domaine pharmaceutique, d'être utilisés en alimentaire (1). Ceci ouvre un vaste champ d'investigation concernant le développement de formes à libération ciblée à base d'ingrédients alimentaires permettant d'optimiser la biodisponibilité des ingrédients actifs. Dans ce contexte, le développement de compléments alimentaires permettant d'optimiser la biodisponibilité, incluant i) une réduction potentielle des doses administrées, ii) une libération contrôlée des nutriments à partir de la matrice d'administration iii) une meilleure qualité et sécurité des produits et iv) une réduction significative des risques pour le consommateur, représente un enjeu stratégique et économique de premier plan.

Compte tenu de la complexité des phénomènes mis en jeu *in vivo* après administration orale d'un complément nutritionnel, la modélisation de la biodisponibilité sur la base de l'ensemble des paramètres est impossible ou pratiquement inenvisageable. Pour les compléments alimentaires, il est difficile de comparer les différentes formulations sur le marché ou en développement car il n'existe pas de notions de bioéquivalence et de biodisponibilité liées à une substance ou une forme dû à l'absence de réglementation.

Dans ce contexte, afin de développer des compléments alimentaires « efficaces », il est important : i) d'analyser la physiologie de la voie d'administration exclusive aux compléments alimentaires qui est la voie orale, et connaître les paramètres qui limitent la biodisponibilité des actifs. ii) d'analyser la SA et comprendre sa solubilité, sa perméabilité et sa stabilité dans les milieux biologiques, iii) définir les paramètres majeurs et classer les SA en fonction de ces critères.

Le but de ce travail est de proposer, sur la base de la BCS, une classification permettant de prédire la biodisponibilité et de maîtriser les risques de faible biodisponibilité et bioinéquivalence. La maîtrise de la biodisponibilité nécessite une connaissance approfondie des propriétés de la SA et des caractéristiques de la matrice d'administration. La classification BCS est simple, facile à déterminer et reconnue par les autorités réglementaires et par les industriels du secteur pharmaceutique.

Ce travail est divisé en deux parties :

Une partie bibliographique, chapitre I consacrée à la description de la voie orale, son intérêt et ses contraintes par rapport aux facteurs physiologiques qui influencent le devenir des substances administrées via cette voie chapitre II aux méthodes permettant d'évaluer les différents paramètres physicochimiques et biopharmaceutiques qui influencent la biodisponibilité.

Une partie expérimentale qui pose les bases de la classification des ingrédients nutritionnels et aboutit à un projet de classification, dérivée de la BCS, applicable aux ingrédients nutritionnels.

Le chapitre III présente l'évaluation des critères primaires de la biodisponibilité : solubilité, dissolution et perméabilité de deux produits hydrosolubles la caféine et la glucosamine. Associé à des techniques de caractérisation, les essais effectués permettent de comparer des lots de différentes origines de ces produits et de définir la classe biopharmaceutique de ces ingrédients nutritionnels.

Le chapitre IV s'intéresse à un produit présentant une faible solubilité, le resveratrol et se propose d'étudier l'influence des paramètres critiques de qualité de la matière première sur la biodisponibilité et l'interchangeabilité des produits formulés. Le but de ce chapitre est de mettre en évidence l'intérêt de combiner les méthodes de caractérisation et les méthodes physicochimiques et biopharmaceutiques pour garantir la qualité et la biodisponibilité des matières premières.

Le chapitre V s'interroge sur l'impact des modifications des matières premières, encapsulation, modification chimique, formulation particulière, sur la biodisponibilité et l'interchangeabilité des produits et les apports que peuvent représenter la détermination des critères primaires solubilité, vitesse de dissolution et perméabilité sur la prédiction du comportement *in vivo*. La curcumine a été choisie comme produit pour illustrer cette preuve de concept.

Compte tenu des conclusions des 3 chapitres précédents, mettant en évidence l'intérêt de standardiser l'étude des ingrédients nutritionnels, le chapitre VI propose une classification biopharmaceutique des ingrédients nutritionnels et sur la base de données bibliographique et identifie, pour chaque groupe de produits et pour de nombreux produits, leur classe respective.

Le manuscrit se termine par une conclusion et une discussion sur le bienfondé de cette classification et les perspectives de son utilisation dans le cadre du développement de nouveaux compléments nutritionnels dont la biodisponibilité est maîtrisée et la libération ciblée.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

Revue Bibliographique - le devenir des substances actives
dans l'organisme après une administration orale

I. Devenir des substances actives dans l'organisme après une administration orale

I.1 La voie orale

La voie orale ou *per os*, est le mode d'administration le plus classique et le plus souvent privilégié pour les médicaments. C'est l'unique voie pour les aliments et les compléments alimentaires, ce qui la rend une voie naturelle, facile et habituelle. La connaissance de la voie orale constitue donc une importance majeure dans le domaine du développement des nutraceutiques.

Pour l'administration de substances actives (SA), de nombreuses formes pharmaceutiques différentes, solides (gélules, comprimés), liquides (solutions, suspensions, sirops) et semi-solides (émulsion, gels) sont disponibles par cette voie. La majorité des formes pharmaceutiques développées pour la voie orale sont des formes solides et les comprimés en représentent plus de 80%. Les formes solides sont des formes unidoses unitaires qui présentent une homogénéité et une précision importante du dosage comparativement aux autres formes. Elles permettent une longue conservation du produit et une automatisation de la fabrication. Sur le plan biopharmaceutique, les formes orales solides peuvent être à libération accélérée, immédiate ou ralentie afin de moduler la libération de la SA.

Après administration de la forme pharmaceutique par voie orale, la SA est avalée par le patient grâce au mouvement spécial de la langue, elle passe ensuite dans l'œsophage et arrive directement dans le tractus gastro-intestinal (TGI). Le devenir de la SA est décrit par trois phases du système LADME (Fig.1) (2) la phase biopharmaceutiques, la phase pharmacocinétique et la phase pharmacodynamique (Fig.2).

I 1.1 La phase biopharmaceutique :

Cette phase correspond à la mise à disposition de la SA dans l'organisme (3) . Elle comprend deux étapes : i) la **libération** de la SA à partir de sa forme pharmaceutique qui peut être plus ou moins rapide (formes à libération immédiate, à libération accélérée ou à libération prolongée), ii) la **dissolution** de la SA à l'état moléculaire dans le fluide intestinal au niveau du site d'absorption et qui définit la dissolution.

La phase biopharmaceutique dépend fortement de : i) la formulation galénique, ii) des propriétés physicochimiques de la SA (polymorphisme, structure cristalline, amorphisme, taille

des particules...) en particulier sa solubilité et iii) des caractéristiques physiologiques et biologiques du milieu dans lequel la SA est libérée (estomac, intestin, etc.). La fraction de SA dissoute et non ionisée sera disponible pour la phase pharmacocinétique.

La phase biopharmaceutique est une étape indispensable dans le développement des formes pharmaceutiques par voie orale car elle a une grande influence sur la biodisponibilité de la SA compte tenu de son impact sur l'absorption.

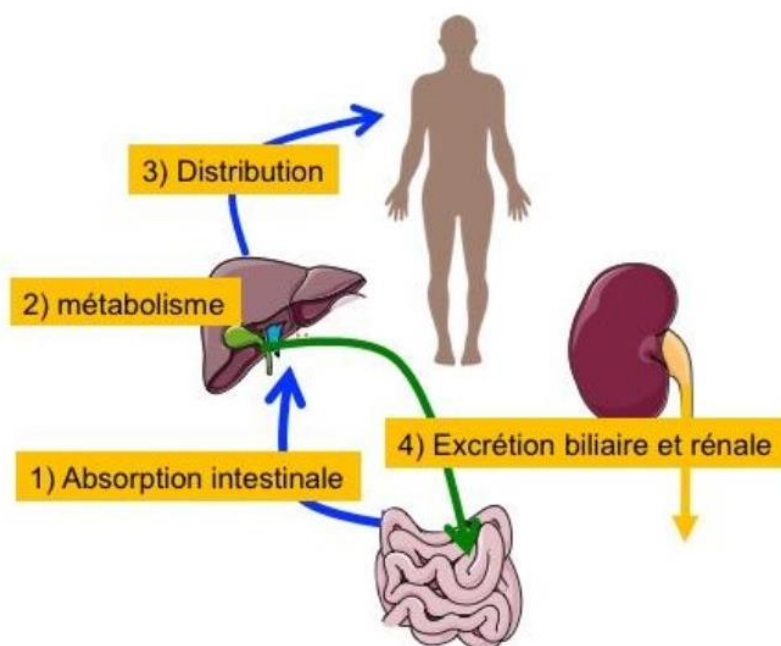


Figure 1 Etapes de mise à disposition de la substance active à partir d'une forme orale solide (Système LADME) (4)

I 1 1 a) Libération de la substance active

Cette étape fait partie de la phase biopharmaceutique. C'est l'étape de mise à disposition de l'organisme de la SA à partir de la formulation pharmaceutique.

En effet, une SA seule ne constitue pas une forme pharmaceutique. Une forme pharmaceutique est l'association de la substance active à son support galénique. La SA ne peut pas être absorbée si elle ne s'est préalablement libérée de son support galénique, puis dissoute dans le milieu biologique du site d'administration. Les vitesses de dissolution et de libération dépendent aussi bien des caractéristiques propres de la molécule (notamment les propriétés physico-chimiques) que celle de la forme galénique. Ces deux facteurs sont pris en compte lors de la formulation pour aboutir à l'objectif de libération recherché : libération accélérée, immédiate ou prolongée par exemple (5). La libération est la première étape de la mise à disposition d'une forme

pharmaceutique administrée par voie orale. Suite à son administration, la forme pharmaceutique solide à libération immédiate subit ainsi une désagrégation primaire et secondaire en des particules de petite taille qui seront par la suite mises en solution. Pour permettre son passage à travers les membranes biologiques, la substance active doit être dispersée à l'état moléculaire en milieu aqueux, au niveau du site d'absorption.

I 1.2 La phase pharmacocinétique

Cette phase peut être considérée comme l'étude du devenir du médicament dans l'organisme ou encore comme l'étude de l'influence de l'organisme sur le médicament. L'organisme peut réagir vis-à-vis de la molécule qui lui a été administrée en limitant son absorption, en l'inactivant et en l'éliminant par voie rénale, digestive ou pulmonaire.

Le but de la pharmacocinétique est de fournir les connaissances nécessaires à l'adaptation de la posologie pour obtenir les concentrations plasmatiques d'un médicament entraînant l'effet optimum, c'est-à-dire la meilleure efficacité avec le minimum d'effets indésirables. Avec des concentrations trop faibles, le médicament est inefficace et avec des concentrations trop élevées, les effets indésirables deviennent trop importants.

Toute la pharmacocinétique repose sur l'étude des variations de cette concentration qui, dans un intervalle de temps considéré, ne peut qu'augmenter, diminuer ou rester inchangée. Les différences pharmacocinétiques entre médicaments proviennent essentiellement de la facilité avec laquelle ils traversent les membranes biologiques et de la vitesse de leurs biotransformations.

La première étape de la phase pharmacocinétique est l'**absorption** de la SA qui est estimée par la biodisponibilité.

I 1 2 a) Absorption

L'absorption est le processus par lequel la SA passe de son site d'administration à la circulation générale. Lors d'une administration orale, la SA doit traverser plusieurs membranes. Une molécule trop lipophile ne franchira pas la membrane cellulaire, mais aura tendance à s'accumuler dans le cœur lipidique de la bicouche de phospholipides constituant la membrane cellulaire. Pour un passage transmembranaire optimal, la molécule doit être à la fois hydrophile et lipophile. Par conséquent, les caractéristiques physicochimiques des SA ont une importance primordiale (6,7).

La SA non ionisée et suffisamment liposoluble pourra traverser les membranes biologiques au niveau du site d'absorption et rejoindre la circulation sanguine. La perméabilité est liée aux propriétés de la SA telles que la taille moléculaire qui doit être inférieure à 500 Da, le caractère lipophile, la charge ionique, etc... L'absorption se fait plus ou moins facilement en fonction de la région du tractus (estomac, intestin) avec une prédilection pour l'intestin grêle. Une fois absorbée, la SA est transportée à la circulation systémique via la veine porte. Toutefois, elle peut faire l'objet d'une élimination pré-systémique au niveau du tractus gastro-intestinal, elle peut également faire l'objet d'un premier passage au niveau des entérocytes et des hépatocytes (8). Ceux-ci peuvent contribuer à la diminution de la biodisponibilité des SA.

I 1 2 b) Distribution dans l'organisme :

La distribution concerne le transfert de SA entre le sang et les différents organes du corps. La SA peut se lier, dans la circulation générale, plus ou moins fortement et de façon réversible à des protéines plasmatiques et diffuser dans certains organes contenant ou non des récepteurs pharmacologiques.

Plusieurs facteurs déterminent la dynamique de distribution des substances. Ces facteurs sont en particulier la taille des organes, la perméabilité des membranes, des tissus ou encore la perfusion des organes (9). L'ampleur et la rapidité de ce processus dépend de la fixation réversible des substances actives aux protéines plasmatiques (plus ou moins spécifique) et de sa répartition dans les différents tissus (contenant ou non des récepteurs pharmacologiques).

Aussi, les caractéristiques physico-chimiques des SA (Log P, degré d'ionisation, taille moléculaire etc.) et des tissus (teneur en eau, pH, etc.) sont à l'origine de différences de répartition dans les divers tissus.

En effet, la distribution tissulaire des SA est proportionnelle à l'intensité du débit sanguin local. Ainsi, elle concerne, en premier lieu, les organes les plus vascularisés à savoir le cerveau, le cœur, les reins, le foie et les poumons. La peau, les muscles et le tissu adipeux sont moins vascularisés, par conséquent, ces tissus représentent un lieu de stockage avec la possibilité d'atteindre des concentrations toxiques si les SA sont utilisées à long terme (10).

I 1 2 c) Métabolisme :

Le métabolisme est la transformation par une réaction enzymatique d'une SA en un ou plusieurs métabolites actifs ou inactifs. De nombreux organes peuvent intervenir dans ces

transformations (rein, poumon, foie...). Le foie est le principal organe impliqué dans le métabolisme des SA.

Le métabolisme, aussi connu sous le terme de « biotransformation », est le processus de conversion chimique d'une SA en une autre entité chimique suite à une ou plusieurs réactions enzymatiques. La réaction de biotransformation entraîne une diminution de la liposolubilité et une augmentation de l'hydrosolubilité de la SA, ce qui peut défavoriser jusqu'à un certain degré sa diffusion, sa fixation au récepteur et son excrétion rénale et/ou biliaire.

Les enzymes de biotransformation se trouvent principalement au niveau hépatique plus particulièrement dans le réticulum endoplasmique lisse et dans le cytoplasme des hépatocytes. Ces enzymes peuvent se trouver également dans les reins, les poumons, le tractus gastro-intestinal, la peau et la barrière hémato encéphalique. Cependant l'arsenal enzymatique des lysosomes, des mitochondries et du noyau peut métaboliser certaines SA plus particulièrement les molécules analogues à des substrats endogènes (11). Les réactions de biotransformations sont subdivisées en deux types : réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse autrefois nommées les réactions de la phase I et les réactions de conjugaison correspondent à la phase II. Le métabolisme constitue donc, la première étape de l'élimination d'une SA de l'organisme.

I 1 2 d) Élimination de l'organisme :

Tous les processus d'élimination aboutissent à une disparition irréversible des SA ou leurs métabolites de l'organisme. La SA est éliminée de l'organisme, soit sous forme inchangée, soit sous forme d'un ou plusieurs métabolites (généralement inactifs) ou sous les deux formes dans des proportions variables. L'élimination peut se faire par différentes voies : urinaire, biliaire, respiratoire (dans l'air expiré), cutanée (par la sueur), salivaire ou dans le lait maternel. Les voies principales sont l'élimination par les reins dans les urines, et l'élimination par le foie dans la bile.

Le rein est donc le principal organe d'excrétion de la SA inchangée et de ses métabolites plus hydrosolubles, alors que le foie est le site principal d'une éventuelle biotransformation. La SA ou ses métabolites excrétés dans la bile peuvent être réabsorbés dans l'intestin.

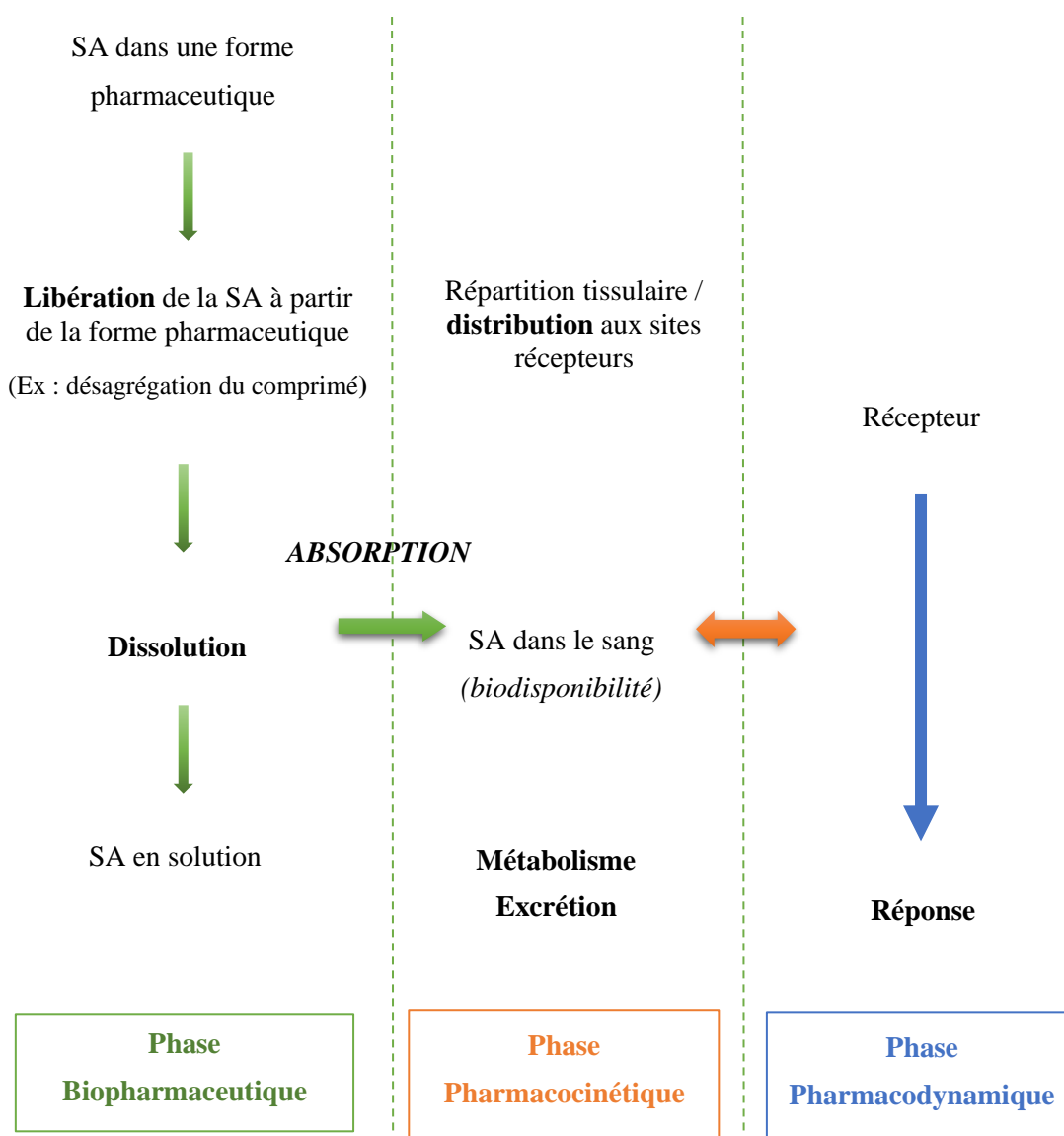


Figure 2 Le devenir du médicament dans l'organisme : de l'ingestion à la réponse pharmacologique (12).

I 1.3 La phase pharmacodynamique

La phase pharmacodynamique correspond à l'étude des effets biologiques et pharmacologique des SA et de leur mécanisme d'action, elle résulte de l'interaction de la SA avec sa cible. La SA diffuse au site d'action dans les organes cibles et se combine avec un récepteur, une enzyme, une structure cellulaire pour provoquer une réponse pharmacodynamique.

II. Définition de la biodisponibilité orale

Dans la majorité des cas, les SA sont censées présenter un effet thérapeutique systémique donc une définition plus pratique peut être donnée, en tenant compte du fait que la SA dans la circulation générale est en échange avec la SA sur le site d'action :

Dans le cas des médicaments, la biodisponibilité est définie comme la quantité de SA ou sa partie active qui atteint la circulation générale intacte ou inchangée et la vitesse à laquelle ce phénomène se produit ; Elle correspond à l'aire sous la courbe ou AUC (Area Under the Curve) de la concentration plasmatique en SA en fonction du temps après administration orale. (Fig.3)

Il peut être utile de faire la distinction entre la "biodisponibilité absolue" d'une forme posologique calculée par rapport à la référence absolue (la biodisponibilité totale) obtenue après une administration intraveineuse (IV) (par exemple : solution buvable vs iv), et la "biodisponibilité relative" par rapport à une autre forme administrée par la même ou une autre voie non iv (par exemple : comprimés vs solution buvable). (Fig. 4 et 6)

Dans le cas des compléments alimentaires, elle est définie légèrement différemment, elle équivaut tout simplement à l'absorbabilité (13) ou bien à la fraction de la dose de nutraceutique administrée pouvant être absorbée et disponible pour l'utilisation et le stockage (14)

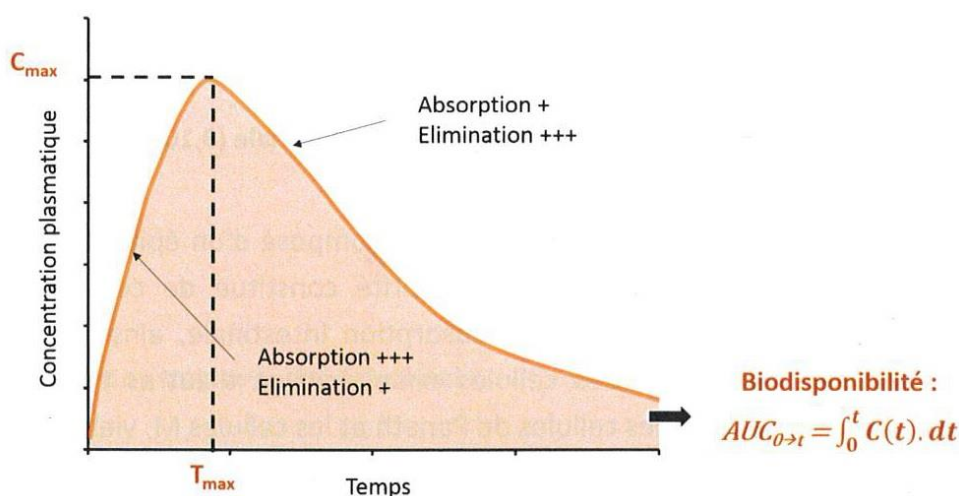


Figure 3 Exemple d'un profil pharmacocinétique montrant la définition de la biodisponibilité orale d'une SA

C_{max} : Concentration maximale ; T_{max} : Temps pour lequel C_{max} est atteinte

Pour une SA administrée par voie orale, cette courbe comporte deux parties :

- Une portion ascendante, où la fraction de SA absorbée est supérieure à la fraction éliminée (avant T_{max}) ;

- Une portion descendante, où la fraction de SA éliminée est supérieure à la fraction absorbée (après T_{max}).

Le point maximum de la courbe permet de déterminer deux paramètres pharmacocinétiques important : la concentration plasmatique maximale (C_{max}) et le temps d'apparition de cette concentration (T_{max}). Le calcul de l'AUC (biodisponibilité), ainsi que ces deux paramètres, permettent de définir le profil pharmacocinétiques de la SA.(15)

II.1 Biodisponibilité absolue

La biodisponibilité absolue (F_{abs}) compare la concentration de SA dans la circulation systémique obtenue après administration orale ou autre voie non parentérale à celle obtenue après une administration parentérale (intraveineuse) où la SA se retrouve directement dans la circulation systémique.

La biodisponibilité absolue (F_{abs}) évalue la fraction de la SA absorbée et l'effet du premier passage hépatique, elle est déterminée au moyen d'un suivi pharmacocinétique, réalisé chez l'homme ou sur un modèle animal et qui permet de tracer l'évolution de la concentration plasmatique de la SA en fonction du temps. F_{abs} est déterminée par le rapport des AUC de la voie orale sur l'AUC de la voie parentérale en tenant compte des doses administrées comme représenté sur la figure 4.

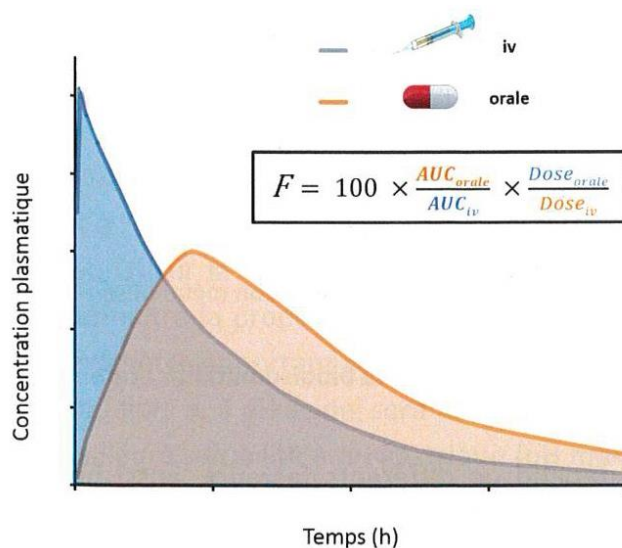


Figure 4 Exemple de profils pharmacocinétiques expliquant la détermination de la biodisponibilité absolue (F_{abs})

La biodisponibilité absolue d'une SA est comprise entre 0 et 1. Par voie orale, il existe de nombreux facteurs relatifs à la SA même et aux facteurs relatifs à la physiologie du TGI

susceptibles de limiter le passage dans la circulation systémique. L'ensemble de ces premiers passages conditionne la quantité de substance active qui sera effectivement disponible pour l'organisme

II 1.1 Premier passage intestinal

Il correspond à la fraction de médicament qui sera dégradé, métabolisé ou non absorbé au niveau du tractus gastro intestinal. Le premier passage intestinal résulte de la dégradation de la SA par le pH gastrique notamment, sa faible solubilité et/ou vitesse de dissolution au niveau du tractus gastrointestinal, l'adsorption ou la complexation de la SA avec des éléments présents dans la lumière intestinale (interaction), l'absence de libération à partir de la forme pharmaceutique. La fraction non absorbée pourra se retrouver intacte dans les fèces.

II 1.2 Premier passage membranaire

Il s'agit de la métabolisation de la SA ou son exportation hors de la cellule, au niveau de la membrane intestinale, limitant ainsi la quantité de SA pouvant atteindre les veines sus-hépatiques.

Les cytochromes P450 (CYP450) qui se trouvent au niveau des entérocytes métabolisent un grand nombre de composés. Parmi les différentes sous famille des CYP450, la plus représentée, le CYP3A4 correspond à plus de 60 % des enzymes CYP situées au niveau des entérocytes. Il est inductible et métabolise un grand nombre de substrats par des réactions d'hydroxylation et de N-déalkylation (16).

Les protéines de la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour exporter de nombreuses molécules hors de la cellule, ces transporteurs sont très abondants au point apical des entérocytes. La P-gp est l'un des plus importants transporteurs ABC. Elle est le produit du gène MDR1 (Multi Drug Résistance 1). Elle joue un rôle protecteur en empêchant le passage dans le sang de molécules potentiellement dangereuses provenant de l'intestin. De très nombreux médicaments sont des substrats de ce transporteur, ce qui limite leur biodisponibilité et réduit l'efficacité du traitement.

La P-gp reconnaît et transporte un grand nombre de composés de structures, propriétés chimiques et pharmacologiques très diverses, comme les alcaloïdes, les taxanes, des agents immunosuppresseurs, des antipaludéens, des antifongiques ou des inhibiteurs des canaux calciques. Son activité ATPasique, sa très large spécificité de reconnaissance des substrats et son rôle dans le phénotype MDR constituent ses caractéristiques essentielles. La P-gp est un transporteur membranaire atypique car ses substrats sont généralement hydrophobes et elle

fonctionne comme un aspirateur plasmique, prélevant les SA de la membrane plasmique plutôt que de la phase aqueuse (17).

II 1.3 Premier passage hépatique

Après passage de la barrière intestinale, les SA sont transportées par la veine porte vers le foie où elles subissent une éventuelle biotransformation. La SA non métabolisée et les métabolites ainsi formés vont se diriger vers le cœur par l'intermédiaire de la veine cave avec éventuellement un passage pulmonaire, puis ils vont être distribués dans les tissus. Ainsi, la fraction de SA non métabolisée atteindra les tissus cibles (Fig. 5).

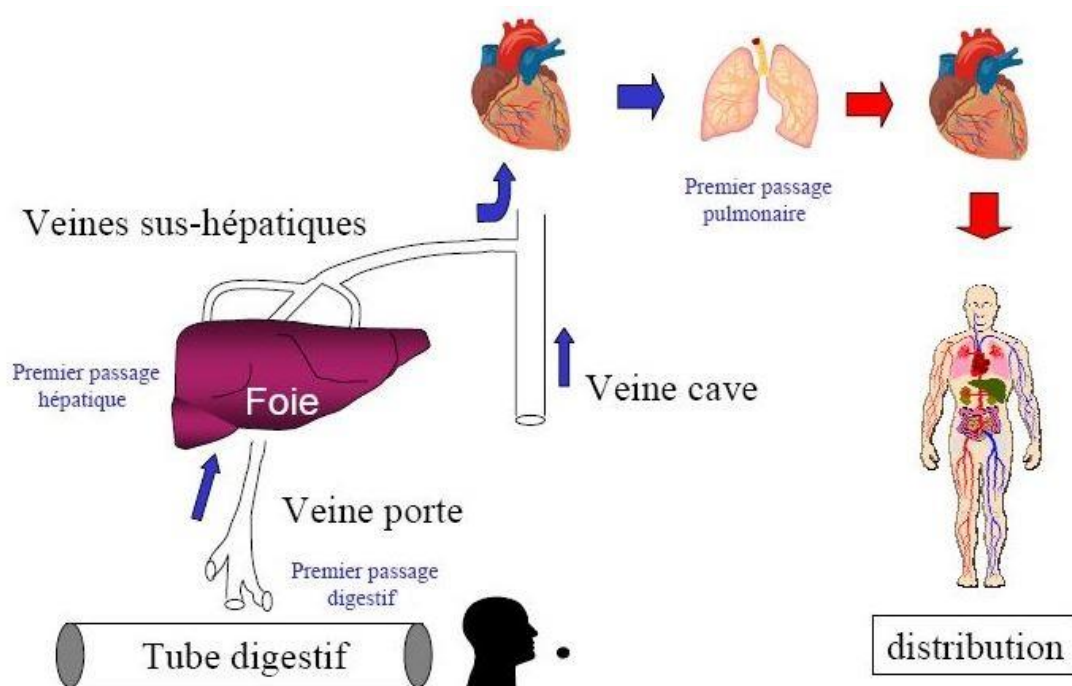


Figure 5 Schéma explicatif de l'effet du premiers passage hépatique (18)

Ce phénomène appelé « effet du premier passage » peut réduire considérablement la biodisponibilité de certaines SA. Selon les familles chimiques et thérapeutiques de SA, cet effet de premier passage est plus ou moins important (19) et il est défini par le coefficient d'extraction hépatique. Ainsi, une SA qui a un coefficient d'extraction hépatique élevé sera métabolisée dans le foie ou éliminée dans la bile avant d'atteindre la circulation générale. Par exemple, la buprénorphine (Temgesic®) qui a un coefficient d'extraction hépatique élevé n'est pas prescrite par voie orale mais par voie sublinguale.

II.2 Biodisponibilité relative

La biodisponibilité relative (F_{rel}) compare une biodisponibilité (calculée par l'AUC) d'une formulation dite « A » mise au point pour une SA avec une deuxième formulation dite « B » généralement considérée comme la référence de l'étude.

Il peut également s'agir de la comparaison de la biodisponibilité d'une même formulation selon deux voies d'administration différentes, hors voie intraveineuse (Fig.6)

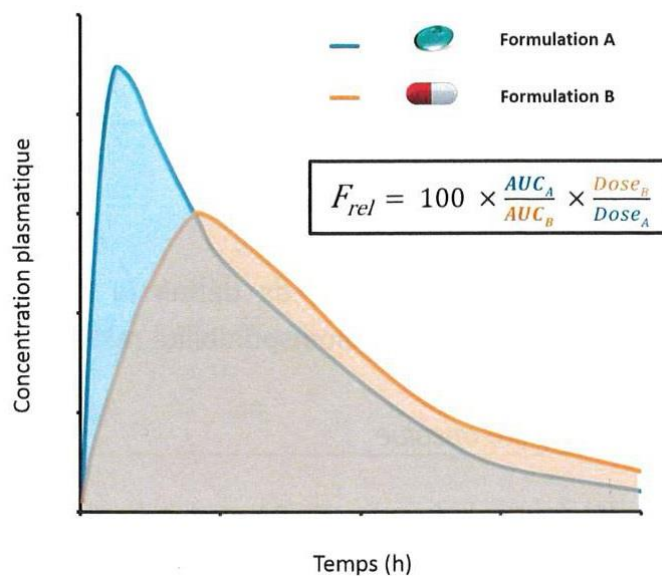


Figure 6 Exemple de profils pharmacocinétique expliquant la détermination de la biodisponibilité relative (F_{rel})

II.3 Bioéquivalence

La bioéquivalence est une notion retrouvée dans le domaine pharmaceutique qui concerne spécifiquement les médicaments génériques. La démonstration de la bioéquivalence entre deux ou plusieurs formulations repose sur l'évaluation des paramètres pharmacocinétiques après administration de produits chez des volontaires sains.

D'après l'EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) la bioéquivalence est définie comme suit :

Deux médicaments sont considérés « bioéquivalents » s'ils sont des équivalents pharmaceutiques ou bien des alternatifs pharmaceutiques, et si leurs biodisponibilités après l'administration de la même dose molaire, sont similaires à un tel degré que leurs effets, avec le respect de l'efficacité et l'innocuité, vont être essentiellement les mêmes. (20)

II 3.1 Équivalents pharmaceutiques

Les médicaments sont équivalents sur le plan pharmaceutique s'ils contiennent la même quantité de la ou les SA, avec les mêmes formes pharmaceutiques qui répondent aux mêmes normes.

L'équivalence pharmaceutique n'implique pas nécessairement la bioéquivalence car les différences dans les excipients et / ou le processus de fabrication peuvent conduire à une dissolution et / ou une absorption plus ou moins rapide ou lente.(20)

II 3.2 Alternatives pharmaceutiques

Les médicaments sont des alternatives pharmaceutiques s'ils contiennent le même groupement actif mais différent par la forme chimique (sel, ester, etc.) de ce groupement ou par la forme posologique ou la concentration.(20)

II 3.3 Bioéquivalence et compléments alimentaires

Dans le cas des compléments alimentaires, cette notion est complètement absente car il n'existe pas de notion de « générique », dû à une différence majeure au niveau réglementation comparant aux médicaments, de plus, le manque de la notion « dose/effet » les dispense des études de bioéquivalence. Si deux compléments alimentaires contiennent les mêmes substances avec les mêmes doses, alors ils peuvent être considérés comme des copies.

III. Facteurs influençant la biodisponibilité

La biodisponibilité orale peut dépendre de différents facteurs, aussi bien physico-chimiques que biologique, quelques exemples sont listés dans le tableau 1

Facteurs liés à la physiologie du TGI	Facteurs liés à la substances active	Facteurs liés à la matrice d'administration
<ul style="list-style-type: none"> • pH du TGI • Temps de transit • Etat de la muqueuse (pathologie, âge) • Métabolisation intestinale • Interaction médicamenteuse ou avec la nourriture • Efflux de la SA (P-gp) ..etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Solubilité dans les fluides du TGI • Vitesse de dissolution • Perméabilité intestinale de la SA • Mécanisme d'absorption • Taille des particules • LogP • pKa • Masse Molaire...etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Composition (excipients). • Type de la forme pharmaceutique. • Vitesse de libération / désagrégation. • Dose

Tableau 1 Exemples de facteurs affectant la biodisponibilité orale

En pratique, la phase d'absorption d'une SA qui dépend essentiellement de sa **solubilité** dans le fluides GI et de sa **perméabilité** intestinale est le facteur principal limitant la biodisponibilité (21).

III.1 Anatomie et physiologie du TGI :

La voie orale est la voie principale des produits pharmaceutiques et exclusive voie d'administration et des compléments alimentaires. Après administration orale, les SA contenues dans la forme pharmaceutique doivent franchir diverses étapes avant de se retrouver dans la circulation générale. Cette partie étudiera essentiellement les facteurs physiologiques voire physiopathologiques qui peuvent influencer l'absorption des SA après administration orale. Les facteurs liés à la SA ou à la matrice d'administration seront étudiés dans la partie suivante.

III 1.1 Physiologie du tube digestif

Le système digestif est composé d'un ensemble d'organes divisé en deux groupes, d'une part le tube digestif (TD) ou tractus gastro intestinal (TGI) et d'autre part les organes annexes. Le TGI est un tube musculéux continu qui traverse la cavité ventrale du corps et s'étend de la bouche à l'anus et est subdivisé en différentes régions (Fig.7). Les aliments restent dans le tube digestif depuis leur ingestion jusqu'à leur absorption et/ou leur élimination. Les contractions musculaires des parois dégradent les aliments en les pétrissant. Ils sont responsables de la préparation physique. Les enzymes sécrétées par différentes cellules le long du TGI assurent la dégradation chimique des aliments (22). Préparation physique et dégradation chimique permettent l'absorption des fragments digérés vers le sang ou la lymphe. Les organes qui composent le TGI sont, la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (divisé en sections appelées duodénum, jéjunum et iléon) et le gros intestin (côlon) qui se termine par l'anus. Les organes annexes sont les dents, la langue, la vésicule biliaire et les glandes digestives (glandes salivaires, foie et pancréas). A l'exception de la langue et des dents qui contribuent à la mastication et à la déglutition, aucun autre organe annexe n'entre en contact avec la nourriture. Ils produisent ou emmagasinent des sécrétions favorisant la transformation chimique des aliments (22). Ces sécrétions sont libérées dans le TGI par l'intermédiaire de canaux.

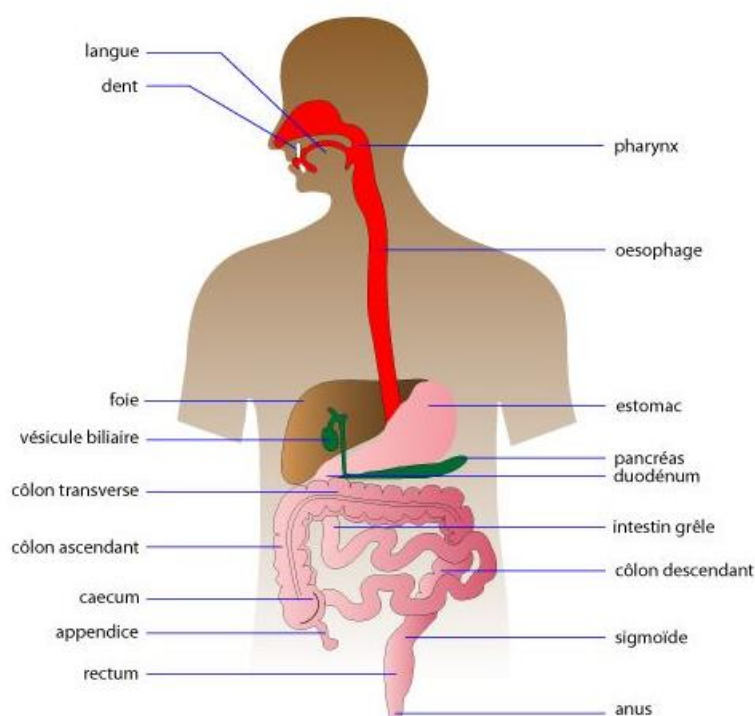


Figure 7 Schéma anatomique du tube digestif (23)

Les activités essentielles du TGI sont l'ingestion, la propulsion (péristaltisme), la dégradation de la nourriture (digestion mécanique et chimique), l'absorption et la défécation. Les différentes sections du TGI possèdent des caractéristiques anatomiques et physiologiques différentes et spécifiques (Tableau 2).

Sections	pH moyen		Longueur (cm)	Surface (m ²)	Volume (ml)		Temps de transit (h)	Temps de résidence moyen (h)	
	A jeun	Après repas			A jeun	Après repas		A jeun	Après repas
Estomac	1,7	3,5	20	0,15	50	1500	0,25	1,5	3,5
Duodénum	6,1	6,5	30	0,1	48		0,26	< 60 s	
Jéjunum	6,6	5,6	240	100	315		2,71	3,5	
Iléon	7,4	7,5	360	100					
Colon	Ascendant	7,1	120	0,75		354	19	11,0	
	Transverse	7,6						12,0	
	Descendant	7,4						11,0	

[*] estimée pour un adulte (poids moyen = 85 kg et à jeun)

Tableau 2 Caractéristiques anatomiques et physiologiques des différentes sections du tractus gastro-intestinal (24,25)

L'intensité de l'absorption est très variable en fonction des différentes sections du tractus digestif. Sont décrits : i) la bouche et l'œsophage, ii) l'estomac, iii) l'intestin grêle, iv) le côlon :

III 1.2 La bouche et l'œsophage.

La mastication est le premier acte mécanique de la digestion qui prépare les aliments à l'action des enzymes salivaires et gastriques en leur facilitant l'accès aux substrats (26). Les glandes salivaires produisent en moyenne 0,5 à 1,5 litres de salive dont le pH est compris entre 6 et 7,4. Leurs rôles majeurs sont la lubrification, l'humidification et la production d'enzymes digestives (α -amylase salivaire, lipase linguale) permettant l'hydrolyse partielle des glucides et des lipides. L'absorption des aliments, et des substances actives administrées par voie orale, au niveau de la bouche est faible à cause du temps de résidence très court et de la faible surface de l'épithélium multicouches buccal (0,02 m²) et du temps de transit qui dure de 15 à 20 secondes pour un liquide et jusqu'à 5 minutes pour un comprimé.

Le pharynx et l'œsophage n'interviennent pas dans la digestion et l'absorption, ils servent simplement de conduits pour acheminer la nourriture de la bouche à l'estomac.

III 1.3 L'estomac

L'estomac est une poche en forme de J constituée du fundus, de l'antrum (ou corps) et du pylore (Fig.8). Il mesure environ 20 cm (26). Le premier tiers antérieur, l'estomac proximal, sert

essentiellement à la réception et au stockage du bol alimentaire (chyme). C'est également à ce niveau qu'est sécrété l'essentiel du suc gastrique. Les deux tiers restants constituent l'estomac distal où va s'effectuer l'essentiel du malaxage du chyme. L'absorption est faible au niveau de l'estomac pour la majorité des produits et dépend en général de l'état de remplissage de l'estomac.

L'estomac possède un épithélium mono lamellaire simple d'une surface approximative de 0,15 m² (Tableau 2). Le débit sanguin est de 0,15 L/min ce qui est faible par rapport à celui de l'intestin (1L/min).

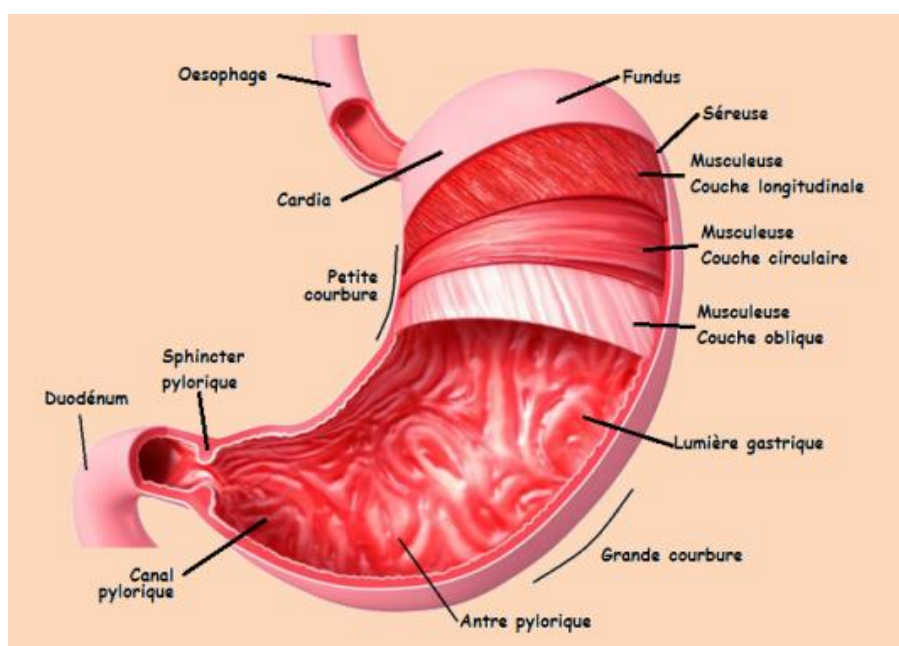


Figure 8 Représentation schématique des différentes parties de l'estomac (27)

Lorsque l'estomac est au repos, le sphincter pylorique est entrouvert et la SA peut le franchir de même que la forme pharmaceutique en fonction de sa taille (forme multiparticulaire). Si l'estomac est vide, l'absorption d'une SA peut être rapide à condition que ses caractéristiques lui permettent de franchir la muqueuse par diffusion passive ou par filtration. Pour les autres substances, leur absorption sera d'autant plus grande que leur degré d'ionisation sera faible et leur forme non ionisée plus liposoluble. Lorsque l'estomac est rempli et en état de digestion, la durée prolongée de séjour dans l'estomac ne parvient pas à compenser le faible gradient de concentration dû à la dilution de SA dans le contenu gastrique.

III 1 3 a) Digestion stomacale chimique

L'épithélium de surface de l'estomac comporte des invaginations régulières où se trouvent les glandes gastriques participant à la digestion chimique des aliments. Les glandes gastriques sont constituées de différents types de cellules :

Les sécrétions, comprises entre 1,5 et 3 litres par jour, se composent ; i) de mucus qui protège les parois de l'estomac contre l'acidité gastrique (cellule à mucus), ii) d'acide chlorhydrique qui détruit les microbes et dénature les protéines alimentaires (cellules pariétales), iii) d'enzymes telles que la pepsine et la lipase qui scindent les triglycérides (cellules principales), iv) d'hormones comme la gastrine (cellules G) qui stimule la sécrétion d'acide chlorhydrique par les cellules pariétales et augmente la motilité de l'estomac.(Fig. 9)

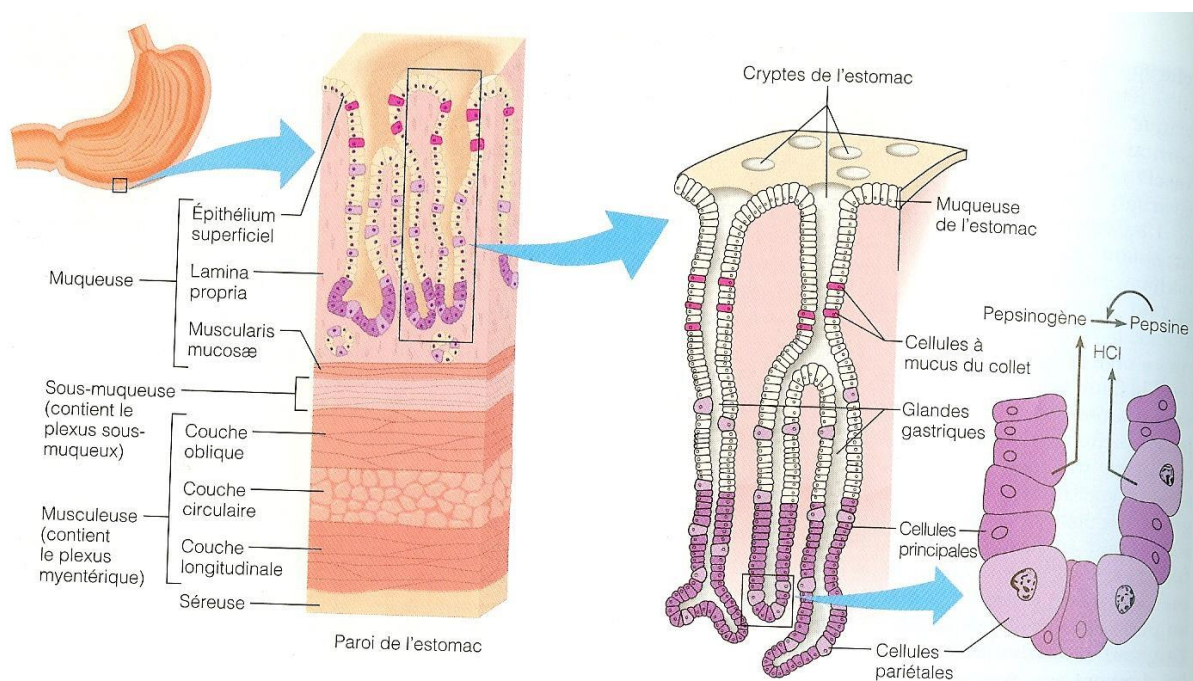


Figure 9 Histologie Microscopique de l'estomac (28)

III 1 3 b) Digestion stomacale mécanique

Elle commence au niveau de l'estomac et fait appel à la motilité gastrique dépendant de l'activité des trois couches de muscles lisses qui sont retrouvés au sein de la paroi. Son objectif est d'induire un brassage très vigoureux du contenu gastrique et d'assurer l'évacuation séquentielle de l'estomac.

Au niveau de l'antrum, le péristaltisme se traduit par des ondes dont l'amplitude est de l'ordre de 2,5 kPa. Ces ondes propulsives sont dites de type II. Elles durent environ 20 secondes, elles se

propagent de plus en plus vite en direction du pylore. Des ondes de type I ont également été identifiées et ont une amplitude faible (de l'ordre de 0,5 kPa) et sont non propulsives. Les ondes de type III correspondent à des contractions toniques qui élèvent durablement (pendant 1 à 6 min) la pression antrale, mais dont l'amplitude est faible (1 à 1,5 kPa). Les ondes de type II sont superposées sur les ondes de type III (26,29).

La région pylorique contient environ 30 mL de chyme, elle agit comme un filtre dynamique qui ne laisse passer que les liquides et les petites particules. A chaque onde, le pylore envoie 3 mL de chyme dans l'intestin grêle, les 27 mL restants sont renvoyés dans l'estomac ou ils sont brassés à nouveau. La fréquence des ondes est d'environ 3 par minutes.

III 1 3 c) Digestion stomacale microbienne

Dans l'estomac, la prolifération microbienne est fortement réduite par la présence d'oxygène apporté par la déglutition et d'une forte acidité. De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acidophiles et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles, streptocoques et les levures.

Selon Isolauri *et al* (30), la flore de l'estomac contient des bactéries qui jouent un rôle de détoxification (élimination des toxines). Elle est capable de dégrader certaines substances toxiques provenant de l'extérieur ou produites durant la digestion. Par exemple, ces bactéries participent à la digestion de substances comme l'urée, le cholestérol et les triglycérides.

III 1 3 d) Vidange gastrique

La vidange gastrique fixe les quantités du bol alimentaire qui passent dans le duodénum. Elle influence donc la vitesse d'absorption de nutriments (29). La vidange gastrique est différente au niveau du mécanisme entre liquide et solide. Les liquides quittent l'estomac sous l'action tonique de l'estomac proximal alors que pour les solides, il est nécessaire que le péristaltisme gastrique soit mis en place. Généralement, la vitesse d'évacuation se fait relativement rapidement. La vidange des liquides a pour origine le gradient de pression généré par les contractions de l'estomac proximal. Le processus d'élimination est de type exponentiel avec un temps de demi-vidange de l'ordre de 30 min. La phase solide digestible sera éliminée beaucoup plus lentement, en environ 2 h. Ce sont les contractions antrales qui seront à l'origine de l'évacuation du chyme (solide en suspension dans les sucs digestifs).

Cette vidange dépend donc de nombreux facteurs (comme par exemple le pH gastrique, le volume, la température, la composition du bol alimentaire...) et peut varier de quelques minutes à quelques heures (Tableau 2) ;

III 1.4 L'intestin grêle.

C'est à ce niveau que les caractéristiques anatomiques et physiologiques sont les plus favorables à l'absorption des nutriments et des SA. L'intestin grêle s'étend du pylore à la valvule iléo-cæcale et mesure environ 6 m de long pour un diamètre moyen de 3 cm. La surface de l'intestin est beaucoup plus considérable que celle de l'estomac. L'intestin se divise en trois parties : i) le duodénum (30 cm) ; ii) le jéjunum (2,4 m) ; iii) l'iléon (3,6 m).

Le duodénum est un carrefour où débouchent toutes les sécrétions bilio-pancréatiques, la sous muqueuse duodénale contient des glandes (appelés glandes de Brunner) dont les cellules sécrètent un mucus alcalin qui contribue à neutraliser le chyme gastrique.

Le débit sanguin intestinal est important (1 L/min) et augmente encore durant les phases de digestion. Le duodénum reçoit les sécrétions biliaires (0,5 à 1 litre à 1 par jour) et pancréatiques (1 litre par jour). Les sécrétions biliaires sont constituées de phospholipides, de bilirubine, d'acide et sel biliaires qui agissent comme émulsifiant tandis que les sécrétions pancréatiques sont alcalines et contiennent des enzymes capables de digérer les protéines (telles que la trypsine, la chymotrypsine, la carboxypeptidase) et les triglycérides (lipase pancréatique). Le pH augmente de 5 à 7 du début à la fin de l'intestin grêle.

L'intestin possède des replis (appelés replis de Kerckring ou valvules conniventes) qui sont plus nombreux et plus profonds que ceux de l'estomac (31). Ils sont délimités par des **villosités** qui sont, elles-mêmes, recouvertes de **microvillosités** ce qui augmente la surface d'échange jusqu'à 200 m² (Fig.10).

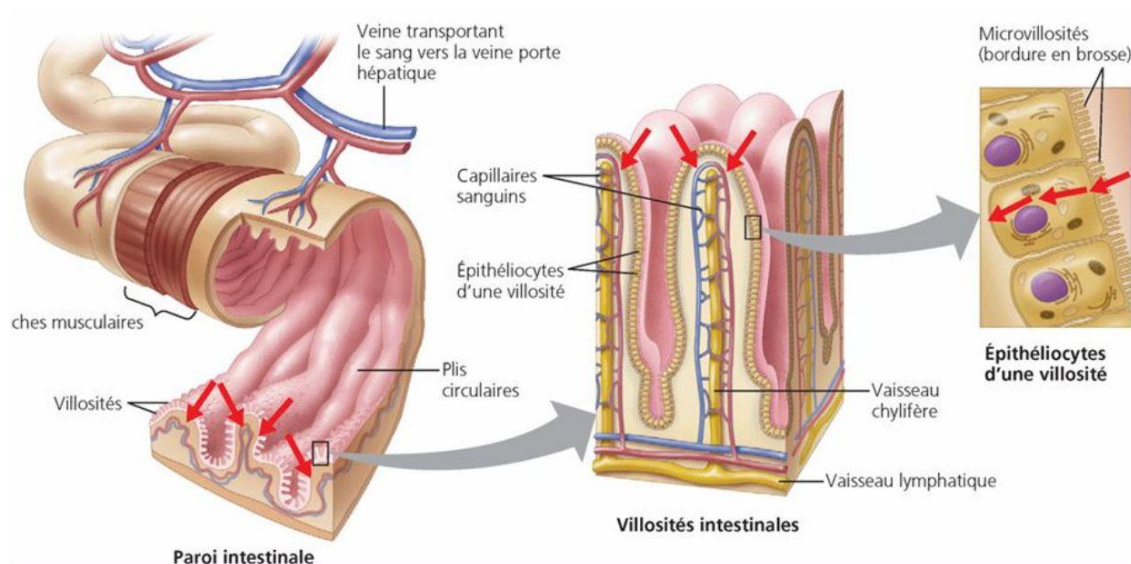


Figure 10 Structure de l'intestin grêle (32)

Les villosités sont recouvertes d'un épithélium simple constitué de: i) de cellules absorbantes (entérocytes) qui absorbent les glucides et les lipides provenant de la dégradation des aliments. Leur pôle apical est constitué de microvillosités, projections digiformes de la membrane plasmique, qui augmentent encore la surface d'échange, ii) de cellules caliciformes qui sécrètent du mucus, iii) des cellules entéro endocrines qui sécrètent différents types d'hormones et régulent la digestion, iv) des cellules de Paneth qui sécrètent la lysosime, enzyme bactéricide qui joue un rôle dans la régulation de la flore bactérienne (Fig.11). Elles sont aussi capables de phagocytose. L'existence dans chacune des villosités d'un réseau de capillaires permet une absorption intestinale importante.

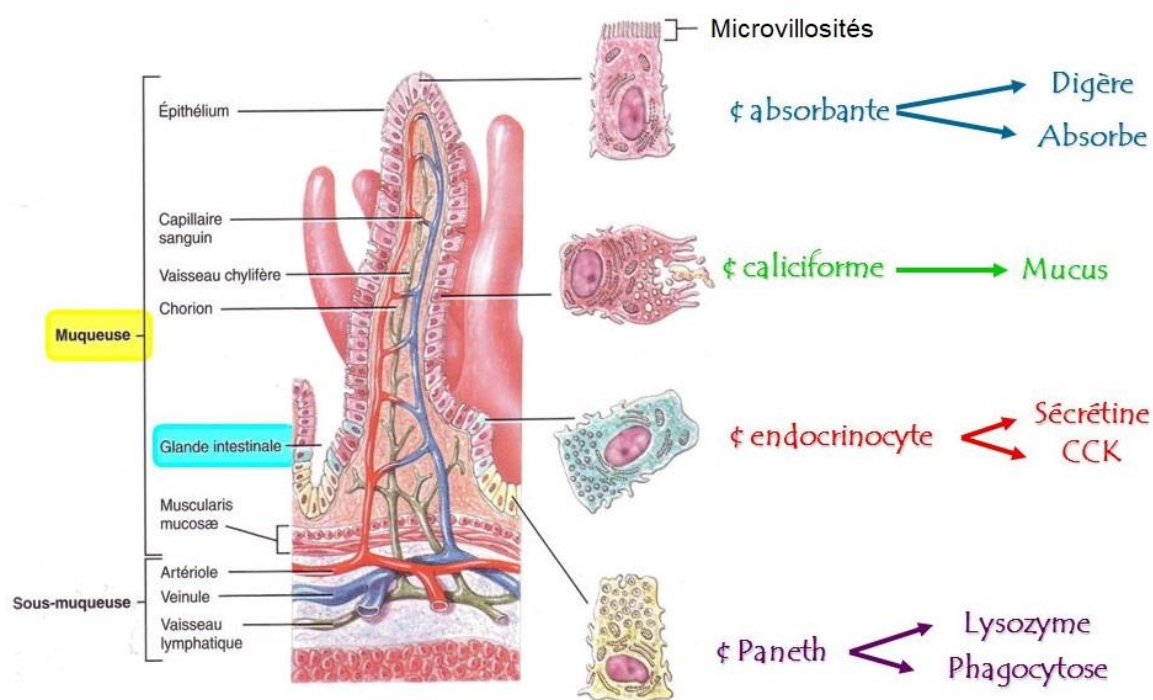


Figure 11 . Représentation des diverses cellules présentes sur les microvillosités intestinales (33)

Tous les mécanismes de transport sont présents dans l'intestin grêle. Le pH étant plus basique que l'estomac, l'absorption des bases faibles sous forme non ionisée et liposoluble sera favorisée et les nombreux composés contenus dans le bol alimentaire joueront des rôles variables dans l'absorption des SA.

III 1 4 a) Digestion intestinale mécanique

L'intestin est animé de différents mouvements qui participent à la digestion intestinale mécanique (Fig.12) :

- (i) Les mouvements de segmentation qui fragmentent le bol alimentaire et contractent localement les fibres circulaires,
- (ii) Les mouvements de balancement qui permettent le mélange des aliments avec les sécrétions pancréatiques et biliaires dont la fréquence est de 10 par minute,
- (iii) Les mouvements péristaltiques qui permettent l'avancée des aliments tout au long du tube digestif et qui font avancer le bol alimentaire de 2 cm jusqu'à 25 cm/min.

L'intestin est doué d'une capacité motrice autonome, contrôlée par des mécanismes musculaires nerveux et hormonaux. Ils sont divisés en mouvements lents (de 1 à 2 cm/min) qui ne parcourent qu'un trajet limité et réapparaissent un peu plus loin et en mouvements rapides (2 à 25 cm/min)

qui sont plus rares et qui transportent le chyme sur une longue distance. Cette double motricité sert à propulser les aliments du pharynx au rectum et permet par son brassage une meilleure absorption des nutriments (26).

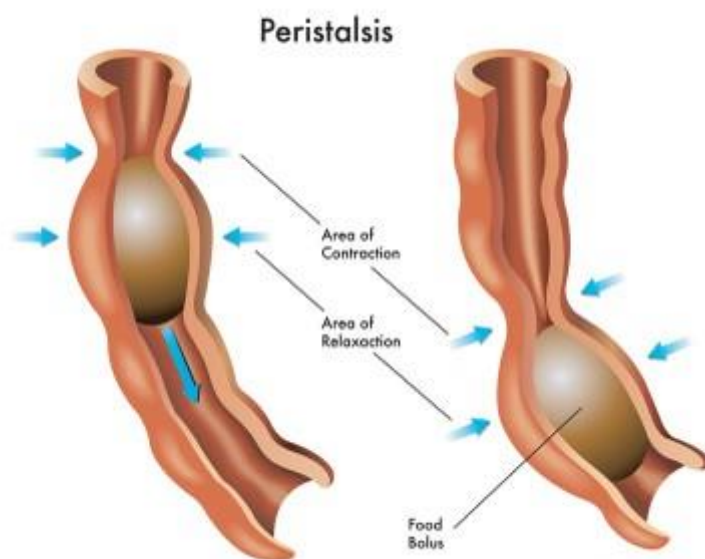


Figure 12 Schéma montrant les mouvements péristaltiques intestinaux (34)

III 1 4 b) Digestion intestinale chimique

Au contraire de la bouche et de l'estomac où les transformations mécaniques sont plus importantes que les transformations chimiques et enzymatiques, ces dernières deviennent prédominantes dans l'intestin grêle, les phénomènes mécaniques étant essentiellement responsables de la progression des aliments. L'intestin grêle assure l'essentiel du processus de digestion par ses propres sécrétions ainsi que par celles des deux glandes qui lui sont associées (pancréas et foie) et l'essentiel des processus d'absorption (35).

C'est surtout dans la première moitié de l'intestin que se fait l'absorption. Le suc pancréatique est produit par le pancréas, puis déversé au niveau du duodénum via le canal de Wirsung. Le suc pancréatique contient, en dissolution dans l'eau, des matières minérales et des composés organiques. La majorité de ces composés organiques sont des enzymes ou précurseurs d'enzymes nécessaires à la digestion des différents nutriments comme :

Les enzymes protéolytiques (produites par le pancréas, elles hydrolysent les liaisons peptidiques des protéines) (36) ; **La lipase pancréatique** (Produite pas le pancréas, elle hydrolyse les triglycérides et libère des monoglycérides et des acides gras libres) (37); ainsi que

d'autres **enzymes glycolytiques** qui hydrolysent les sucres comme les oligosaccharides et les disaccharides en monosaccharide.

La bile, produite par les hépatocytes et stockée dans la vésicule biliaire, elle agit comme un agent émulsifiant des lipides en augmentant la surface en contact avec les enzymes lipolytiques et elle permet la formation des micelles qui favorisent le transport des produits de la digestion des lipides vers la muqueuse.

III 1 4 c) Digestion intestinale microbienne

La flore devient prédominante dans l'intestin Les bactéries de la flore intestinale se nourrissent de dérivés alimentaires inutilisés par l'organisme (molécules de cellulose, cartilages...etc.) et remplissent différentes fonctions importantes. La flore complète la digestion des aliments par le processus de fermentation. Elle participe aussi à la motricité digestive (transit intestinal). Elle permet la synthèse de la vitamine B, de la vitamine K et de certains acides aminés et l'absorption des minéraux. La flore élimine les déchets par captation du cholestérol et par élimination de toxiques comme l'ammoniaque, les indoles, les nitrites et les nitrosamines. Enfin, elle agit comme barrière contre les infections : les bactéries de la flore intestinale stimulent les macrophages et les lymphocytes, ces cellules jouant un rôle majeur dans l'immunité générale de notre organisme (38).

III 1.5 Les mécanismes de passage

La SA doit interagir avec ses récepteurs au niveau des sites d'action ou des cibles thérapeutiques pour exercer ses effets pharmacologiques. L'étape essentielle après l'administration de la SA par toute voie extravasculaire est donc l'absorption pour passer dans la circulation systémique pour être distribuée aux tissus et aux organes.

Les barrières que la SA doit franchir avant d'atteindre le flux sanguin sont intégrées par des membranes cellulaires semi-perméables. Le transport de la SA à travers la barrière cellulaire peut impliquer des transports transcellulaires (à travers la cellule) ou paracellulaires (entre les cellules). Alors que le transport paracellulaire est une diffusion passive limitée par la taille, les mécanismes de transport transcellulaire comprennent la diffusion passive via la membrane, la diffusion active ou facilitée via des transporteurs et l'endocytose (Fig. 13) (Tableau 3)

Mode de transport	Diffusion passive	Transport actif	Transport facilité
Gradient	Dans le sens du gradient Loi de Fick	Contre le sens du gradient	Dans le sens du gradient Loi de Fick
Nécessite de l'énergie	Non	Oui	Non
Nécessite un transporteur	Non	Oui	Oui
Saturable et spécifique	Non	Oui	Oui

Tableau 3 Principales caractéristiques des modes de transport des substances à travers les membranes (39).

III 1 5 a) La diffusion passive

Elle concerne les substances susceptibles de se dissoudre dans les constituants membranaires. Le passage s'effectue selon un gradient de concentration jusqu'à l'état d'équilibre entre les deux pôles de la cellule. Cette diffusion est régie par la première loi de Fick et ne nécessite aucun apport d'énergie. Ce transport est non saturable, il s'effectue principalement au niveau des membranes cellulaires ou des jonctions intercellulaires (Fig.13) ; (40).

III 1 5 b) La diffusion facilitée

C'est une modalité de passage qui nécessite un transporteur spécifique. La molécule se lie de façon réversible au transporteur pour traverser la membrane. Le transport s'effectue dans le sens du gradient de concentration et ne nécessite pas d'énergie. Ce transport est saturable (41,42).

III 1 5 c) Le transport actif

C'est un processus énergivore qui est saturable (limité par le nombre de transporteurs de protéines présents) et pourrait aller à l'encontre du gradient de concentration. Le transport actif est sélectif et peut être perturbé par la présence de inhibiteurs. Il existe deux types de transporteurs actifs. Les principaux transporteurs actifs utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP. Les transporteurs secondaires actifs utilisent l'énergie provenant d'un gradient électrochimique généré par un transporteur primaire, par exemple une différence de concentration en ions H^+ ou Na^+ .

Les deux superfamilles principales des protéines de transport membranaire sont l'ABC (ATP-binding cassette) et les transporteurs SLC (solute carrier).(43).

III 1 5 d) L'endocytose et la phagocytose

Elle est aussi appelée transport médié par vésicule. La membrane cellulaire forme une vésicule qui transporte plus tard le fluide ou les particules à travers la membrane à l'intérieur de la cellule. Ce mécanisme est également un processus nécessitant de l'énergie. La phagocytose est le type d'endocytose où une cellule entière est engloutie. La pinocytose est lorsque le liquide externe est englouti.

L'endocytose médiée par les récepteurs se produit lorsque le matériel à transporter se lie à certaines molécules spécifiques de la membrane. L'endocytose joue probablement un rôle mineur dans l'absorption des médicaments, à l'exception des médicaments protéiques.(43).

III 1 5 e) La filtration

C'est un mécanisme passif concernant le passage à travers des pores de la membrane. Il concerne de très petites molécules ou des molécules ionisées (charge inverse de celle du pore).

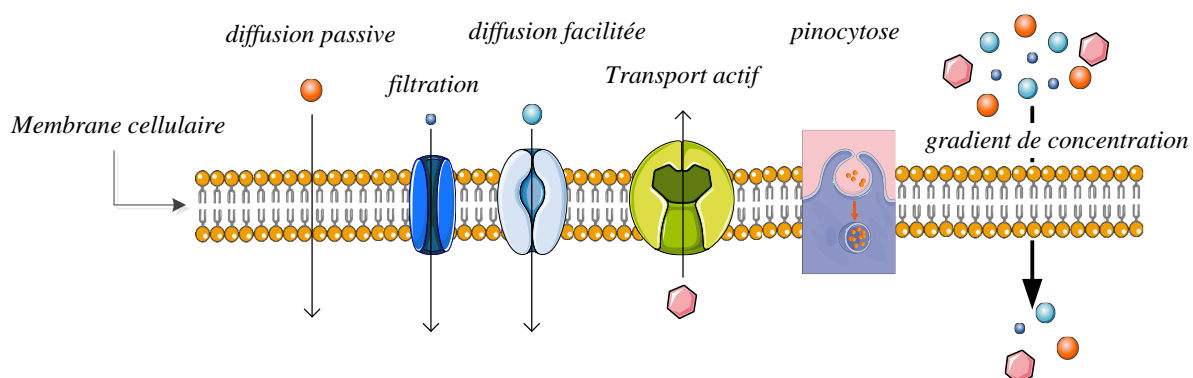


Figure 13 Les mécanismes de transport des substances actives (44)

III 1.6 Le colon

Il s'agit d'un organe d'environ 1,5 mètre de long divisé en trois zones anatomiques et fonctionnelles respectivement le cæcum, le colon transverse et le rectum. La paroi du colon ne contient pas de villosité mais seulement des plissures ce qui explique sa faible surface (entre 0,5 et 1 m²) par rapport à l'intestin grêle. Il sécrète un abondant mucus qui facilite le glissement des matières mais n'intervient pas dans la digestion des aliments. A ce niveau, le chyme alimentaire (bol fécal compris entre 0,5 et 1 litre) ne contient pratiquement plus d'éléments susceptibles d'être digérés. Le pH varie de 6 à 7,5 suivant la localisation et les individus. La viscosité du bol augmente progressivement tout au long du trajet ileo-cæcal jusqu'au rectum. Ceci est dû à de nombreux phénomènes d'échanges d'eau et d'électrolytes se produisant dans cet organe (22).

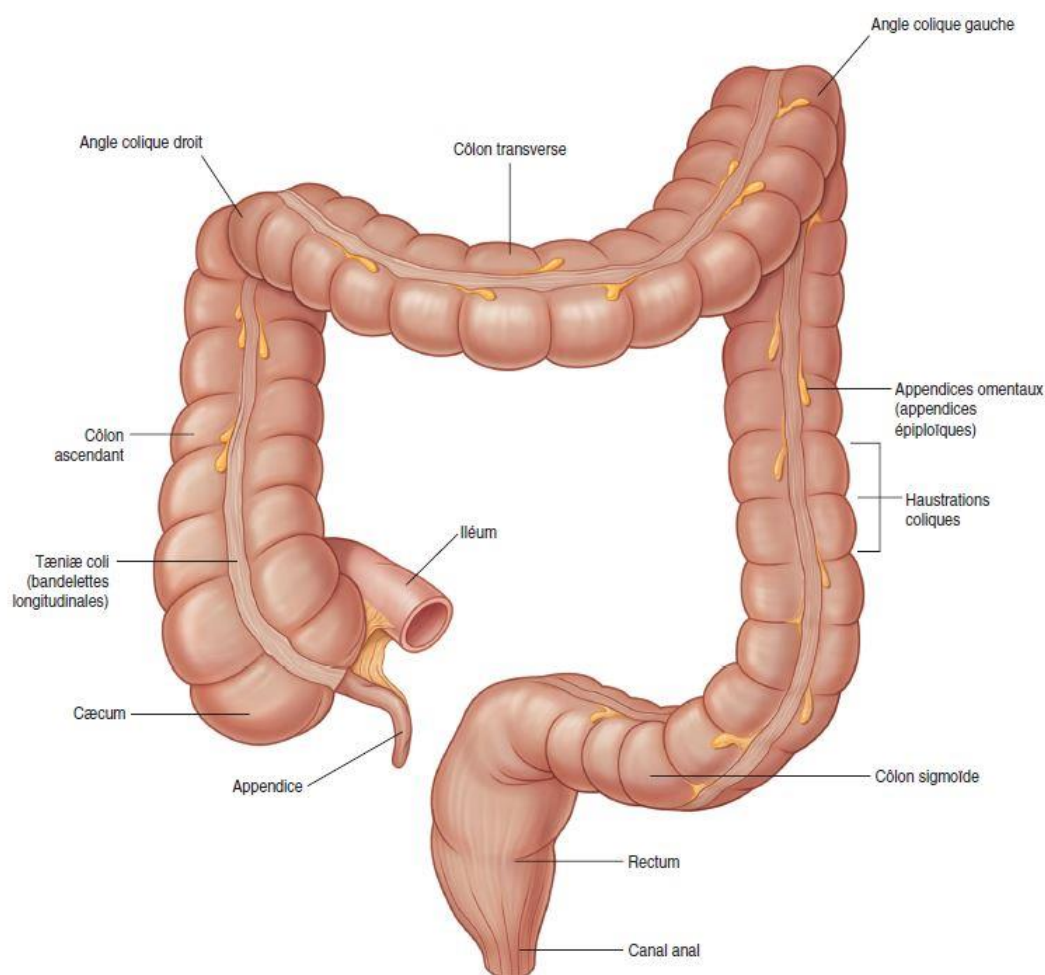


Figure 14 Organisation anatomique du côlon (45)

La structure cellulaire du côlon, bien que similaire à celle de l'intestin grêle, se différencie principalement par une importante diminution du nombre de villosités et de microvillosités

(46). L'absorption y est plus lente que dans l'intestin grêle car la surface absorbante y est plus faible. L'absorption au niveau du colon est principalement passive et varie de façon très importante d'un individu à l'autre. De manière générale, les conditions présentes au niveau du colon (peu de liquide, viscosité croissante du bol, pH élevé) ne favorisent pas une absorption rapide, complète et régulière des SA. De plus les bactéries présentes peuvent dégrader certains médicaments (2).

III.2 Les facteurs physiologiques

La cinétique d'absorption et la biodisponibilité varient selon i) la physiologie des différentes régions du tractus digestif en termes de pH, de temps de transit, de premier passage. Elles dépendent par ailleurs d'autres facteurs tels que ii) l'âge iii), la grossesse iv) et l'alimentation :

III 2.1 L'absorption au niveau des différentes régions du TD.

III 2 1 a) Au niveau de l'estomac,

Certaines SA sont instables (en milieu acide) et peuvent se décomposer (héparine, insuline, etc.) par dégradation chimique essentiellement pH dépendante. De plus, les enzymes contenues dans le suc gastrique et l'équipement enzymatique de la flore bactérienne peuvent conduire à une dégradation des SA. Dans des conditions normales, la vidange gastrique est rapide. La majorité des molécules est absorbée au niveau de l'intestin grêle et toute modification du temps de résidence gastrique d'une forme pharmaceutique peut avoir des conséquences sur la dissolution et l'absorption. La vidange gastrique résulte des contractions péristaltiques dont la force et l'amplitude dépendent de la quantité et de la composition du bol alimentaire. La prise d'un repas entraîne une augmentation du débit sanguin et un ralentissement de la vidange gastrique. En conséquence, les médicaments restent plus longtemps dans l'estomac ce qui peut aider à la dissolution des SA peu solubles.

III 2 1 b) Au niveau de l'intestin grêle,

Sa fonction première est l'absorption des nutriments. Il s'agit du site le plus important d'absorption de tous les organes du TGI. Les SA ionisées au niveau gastrique deviennent non ionisées (base faibles) et vont pouvoir être absorbées à ce niveau. La forme non ionisée des SA est préférentiellement absorbée en tout point du tractus digestif. Cependant, l'absorption de la SA au niveau de l'intestin grêle sera la plus importante même pour des SA ionisées. En effet, l'influence défavorable du pH intestinal est amplement compensée par des facteurs encore plus

importants, tels que : (a) le débit sanguin élevé au niveau du sang péri-intestinal qui favorise un gradient de concentration élevé, (b) la présence de sels biliaires qui forment des micelles et qui permettent la solubilisation des molécules liposolubles. Ces dernières sont ensuite libérées à proximité de la paroi intestinale où elles pourront être absorbées. Cependant, la viscosité et les propriétés gélifiantes du mucus qui tapisse les parois intestinales constituent un obstacle physique et peuvent ralentir la diffusion des SA. Le mucus favorise par ailleurs leur agrégation et par conséquent une diminution de la vitesse de diffusion. L'intestin grêle contient différents enzymes qui servent à la digestion et sont capables de dégrader les SA. Les microorganismes peuvent aussi métaboliser certains SA avant leur absorption. Les sels biliaires et certains phospholipides présents dans la bile se comportant comme des agents tensio-actifs, ils permettent de solubiliser certaines SA peu hydrosolubles et non solubilisées au niveau de l'estomac.

III 2 1 c) Au niveau du côlon

L'absorption est plus faible que dans l'intestin grêle du fait de la diminution de la surface absorbante. Les SA susceptibles d'être absorbées à ce niveau sont celles qui ne se dissolvent que très lentement dans le tube digestif ou qui sont administrées sous des formes pharmaceutiques à libération colique. Par ailleurs, certaines SA peuvent être dégradés par les enzymes sécrétées par des bactéries à ce niveau ;

III 2.2 L'âge du sujet

La biodisponibilité varie en fonction de l'âge. À la naissance, le pH gastrique varie de 6 à 8 et atteint les valeurs adultes à partir de trois ans. De plus, le jeune enfant a une immaturité hépatique qui peut avoir une incidence sur l'effet de premier passage. Chez la personne âgée, les formes pharmaceutiques orales peuvent poser des problèmes car le délitement et la dissolution de la forme sont plus long et incomplet et limitent, de ce fait l'absorption. Les mécanismes d'absorption sont tous présents, cependant, le nombre de transporteurs nécessaires à la diffusion facilitée et au transport actif est moindre ce qui peut entraîner une diminution qualitative et quantitative de l'absorption des SA transportées par ces deux mécanismes. Concernant la diffusion passive, cette dernière est modifiée et dépend ; (a) du pH gastrique qui est plus élevée car la sécrétion gastrique diminue de 25% à 30% ; (b) du débit sanguin intestinal qui baisse de 45 à 60% entre 25 et 75 ans, (c) de l'épithélium digestif qui subit une involution lente et progressive, (d) de la vidange gastrique qui diminue et de la motilité intestinale amoindrie qui provoque l'allongement du temps de transit. (47)

III 2.3 La grossesse.

Chez la femme enceinte, la sécrétion acide est diminuée d'environ 40% pendant les deux premiers trimestres de la grossesse alors que la sécrétion de mucus est augmentée. Le temps de vidange gastrique et le temps de transit intestinal sont majorés de 30% à 50% et la motilité est réduite en raison d'un taux plasmatique élevée en progestérone. Cependant, l'augmentation du débit sanguin peut entraîner une accélération de la diffusion de certaines SA.(47)r

III 2.4 L'alimentation.

La prise d'un repas entraîne une augmentation du débit sanguin, un ralentissement de la vidange gastrique et une augmentation des sécrétions biliaires. L'administration concomitante d'un médicament à une prise de repas à un effet variable sur l'absorption des SA. Elle peut entraîner : i) une diminution de la quantité absorbée (d'où une biodisponibilité réduite), ii) une quantité équivalente absorbée mais retardée ou ralentie ou iii) une augmentation de la quantité absorbée (d'où une biodisponibilité accrue). La diminution de la quantité absorbée peut provenir : i) de la formation de complexes entre nutriments et SA qui empêche toute absorption, ii) de la compétition entre nutriments et SA au niveau de certains transporteurs, iii) de l'augmentation du temps de résidence dans l'estomac qui risque de détruire certaines SA pH dépendantes. La prise de repas entraîne une décharge de sécrétions biliaires et intestinales qui agissent comme des surfactants et favorisent la dissolution des molécules peu solubles. Elles permettent de solubiliser les graisses et les SA liposolubles et donc d'en augmenter la quantité absorbée.(47)

III.3 Les facteurs physiopathologiques

Toute maladie qui affecte le système digestif aura une répercussion sur l'absorption. Les facteurs physiopathologiques peuvent intervenir sur les sécrétions, le transit, les muqueuses, le foie et interfèrent entre elles pour modifier l'absorption.

Les sécrétions gastriques peuvent être augmentées dans le cas d'ulcères duodénaux qui peuvent nuire à l'activité des enzymes pancréatiques. Ces sécrétions sont par contre diminuées dans les ulcères gastriques. Les gastrites chroniques, le diabète et entraînent une augmentation de pH. L'insuffisance de sécrétion biliaire par obstruction du canal cholédoque va diminuer l'absorption des graisses et des SA liposolubles. Les affections pancréatiques vont entraîner un défaut d'absorption. Les troubles du transit modifient le temps de séjour gastrique. Une augmentation peut être due par exemple à une sténose du pylore, à des œdèmes, au diabète. Le temps de séjour diminue par contre dans le cas d'ulcère gastrique. La motricité intestinale est

sous la dépendance du système sympathique et toute altération de ce dernier aura des répercussions sur le transit. (47)

La majorité des pathologies de la muqueuse intestinale modifient aussi l'absorption en la diminuant comme par exemple les atrophies des villosités qui entraînent des diarrhées et des stéatorrhées. Une modification de la flore intestinale consécutive, par exemple, à une prolifération d'agents infectieux d'origine microbienne ou parasitaire peut dégrader les SA. Par ailleurs certains antibiotiques peuvent dégrader la flore intestinale et modifier l'absorption.

L'insuffisance hépatique affecte aussi le processus d'absorption. Elle résulte de différents états pathologiques tels que les cirrhoses, les hépatites. Deux facteurs sont principalement modifiés, d'une part le flux sanguin hépatique et d'autre part l'activité enzymatique en raison de la variation de la masse hépatocellulaire et de la fonction hépatocytaire, les impacts en terme.(47)

III.4 Facteurs liés à la substance active :

La SA doit nécessairement être dissoute dans les fluides GI afin qu'elle soit absorbée, si sa solubilité ou bien sa vitesse de dissolution sont faibles, une grande partie de la SA sera excrétée dans les fèces sans avoir eu la possibilité d'être absorbée et assimilée dans la circulation générale, limitant considérablement sa biodisponibilité. En conséquence, tous les paramètres susceptibles de modifier la cinétique de dissolution vont conditionner le phénomène d'absorption. C'est le cas notamment du coefficient d'ionisation de la SA dans le milieu GI (pKa), de la diffusivité, du coefficient de partage (LogP), de l'état cristallin ou du polymorphisme.

III 4.1 La solubilité

La solubilité est un paramètre thermodynamique qui définit la quantité de SA dissoute dans un solvant donné à l'équilibre. C'est l'un des attributs physico-chimiques les plus critiques et couramment étudié pour une SA donnée. La solubilité d'un composé vient influencer sa formulation, sa voie d'administration et son absorption (48)

La solubilité peut être distinguée par plusieurs mécanismes, la solubilité par **ionisation** (dissociation en ions dans le cas des sels par exemple) dans ce cas le pH du milieu est très important ; et la solubilité par **polarité** liée à des affinités entre groupements fonctionnels du solvant et ceux du corps à dissoudre (par exemple : la présence des groupements hydroxyles ou des fonctions amines favorisent la solvatation par les molécules d'eau). Les substances riches en groupements **hydrophiles** se dissolvent surtout dans les solvants **polaires** (eau, acide

acétique, éthanol, méthanol, isopropanol, acide formique...etc.), et les substances **hydrophobes** dans les solvants **apolaires** (chloroforme acétate d'éthyle hexane, benzène, toluène...etc.).

III 4.2 Le pH du milieu et l'état d'ionisation de la SA.

Dans un milieu aqueux la solubilité d'un composé est en fonction de sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau. Généralement la solubilité aqueuse est directement proportionnelle au nombre de liaisons hydrogènes qui peuvent être formées avec les molécules d'eau. Les composés ionisables présentent une plus grande solubilité dans un milieu aqueux que les composés non ionisables. L'absorption des SA est souvent régie par des phénomènes passifs à travers la membrane lipidique, la vitesse de dissolution conditionnera la vitesse d'absorption.

L'état d'ionisation d'une SA est caractérisé par sa constante d'ionisation (pK_a), elle est estimée par la loi d'Henderson Hasselbach (équations 1 et 2)

$$\text{Pour les acides faibles : } pH = pK_a + \log \left(\frac{I}{NI} \right) \rightarrow \left(\frac{I}{NI} \right) = 10^{(pH-pK_a)} \quad \text{Équation 1}$$

$$\text{Pour les bases faibles : } pH = pK_a + \log \left(\frac{NI}{I} \right) \rightarrow \left(\frac{NI}{I} \right) = 10^{(pH-pK_a)} \quad \text{Équation 2}$$

Avec :

I : concentration de la fraction ionisée ;

NI : concentration de la fraction non-ionisée.

Ces équations permettent de calculer les fractions non ionisées en fonction du pH environnant. La figure 15 illustre l'influence du pH gastro intestinal sur l'absorption des molécules en fonction des pK_a pour des acides et bases faibles. Le tableau fournit les variations de pH le long du tractus digestif (tableau 2).

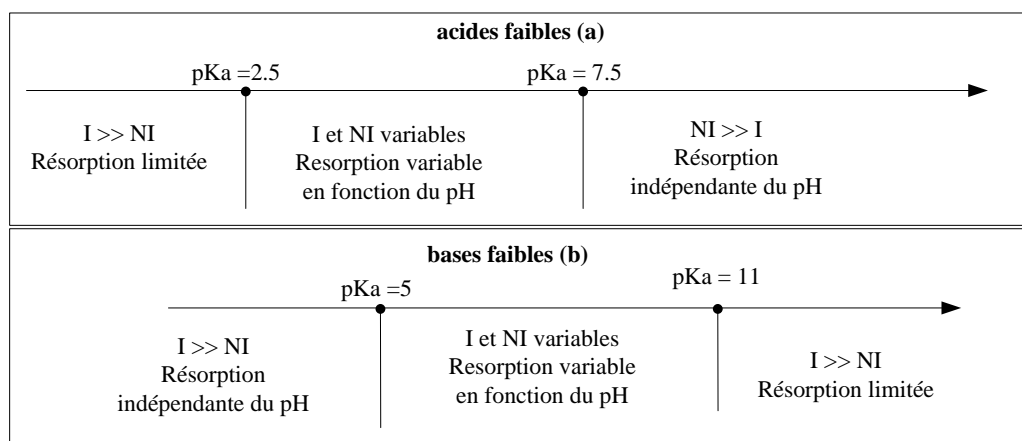


Figure 15 Influence des pH GI sur la résorption des acides faibles (a) et bases faibles (b) (47)

La valeur du pKa permet donc, de connaître la proportion de molécules dissociées (état ionisé) à un pH donné. Le pKa est un paramètre important compte tenu de la gamme de pH étendue du TGI.

Au niveau gastrique ($1,7 < \text{pH} < 3,5$), les acides faibles ($\text{pKa} > 7,5$) sont principalement sous forme non ionisée et pourront donc traverser la membrane. Une fois dans le plasma, l'acide est sous sa forme ionisée et sera incapable de retraverser la membrane. Une base faible aura le comportement inverse. Au niveau intestinal, le pH ($6,1 < \text{pH} < 7,5$) moins acide, favorise le passage des bases faibles ($\text{pKa} < 5$). Cependant, concernant les acides faibles, l'influence défavorable du pH intestinal est compensée par d'autres facteurs tels que l'importance du débit sanguin notamment, qui favorise une augmentation du gradient de concentration (tube digestif /sang).

III 4.3 La taille des particules.

L'équation de Nernst et Brunner montre que la vitesse de dissolution est directement proportionnelle à la surface effective de SA en contact avec le solvant. La diminution de la taille des particules de SA augmente la surface de contact avec le solvant et par conséquent la vitesse de dissolution (Fig. 16). L'addition d'agents tensioactifs permet d'améliorer la mouillabilité de la SA par diminution de la tension de surface. La résultante est une augmentation de la surface de contact SA/liquide et une accélération de la dissolution des molécules. Cependant, une diminution trop importante des tailles des particules (poudres micronisées ou ultrafines) peut entraîner la formation d'agrégats des particules et une diminution de la mouillabilité qui ralentit la vitesse de dissolution (49). De plus, les poudres fines auront tendance à flotter à la surface du contenu stomacal, les particules s'entourant alors d'une mince couche d'air hydrophobe qui

va empêcher la dissolution. Il est important de noter que si la vitesse d'absorption d'une SA n'est pas ou peu conditionnée par sa vitesse de dissolution, (la cinétique de dissolution n'est pas l'étape limitante du phénomène d'absorption) alors la taille des particules n'aura qu'une faible influence.

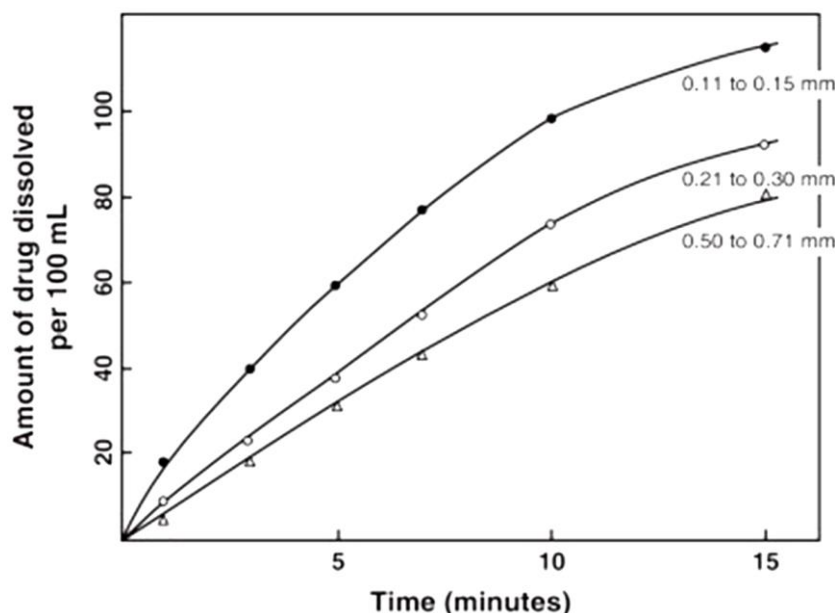


Figure 16 Exemple de l'influence de la taille des particules sur la vitesse de dissolution (cas de la phénacétine) dans un milieu gastrique 0.1 N : ● particules de 0.11 à 0.15 mm, ○ particules de 0.21 à 0.30 mm, △ particules de 0.50 à 0.71 mm (49).

III 4.4 Les modifications de l'état physique.

Les particules de SA se présentent sous forme cristallines ou amorphes. Il est important de connaître la structure des SA car des différences de propriétés physiques entre ces deux types peuvent se répercuter sur l'activité pharmacologique aussi bien que sur la stabilité chimique. De manière générale, les substances amorphes sont plus solubles que les cristaux car il faut moins d'énergie pour arracher une molécule à un réseau cristallin. Selon la nature polymorphique de la SA, les caractéristiques de dissolution peuvent être modifiées et l'absorption susceptible de varier considérablement ;

III 4.5 Le polymorphisme.

Une substance présente un phénomène de polymorphisme lorsqu'elle peut se cristalliser selon plusieurs états différents en fonction de la température, de la pression et des conditions de conservation. Ces états d'une même SA entraînent des propriétés physicochimiques différentes.

Les caractéristiques de dissolution peuvent être modifiées (50) et l'absorption susceptible de varier considérablement (Fig.17);

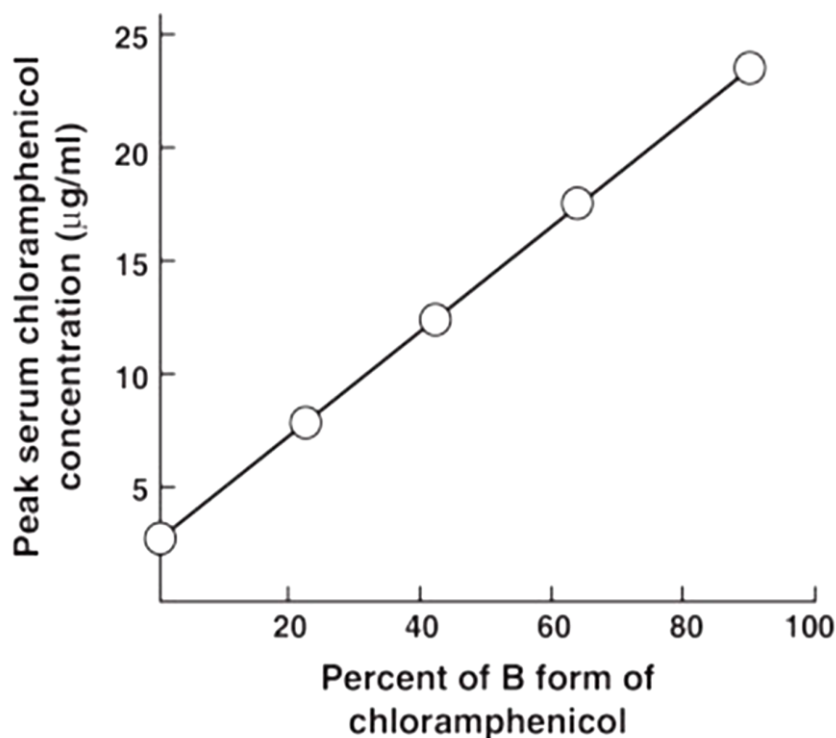


Figure 17 Pic plasmatique (C_{max}) observé en fonction du pourcentage de la forme polymorphe B du chloramphénicol (50).

III 4.6 Le coefficient de partage

L'une des premières propriétés qui peut être déterminée pour une molécule est son coefficient de partage entre une phase aqueuse et organique LogP. Ceci donne une mesure de la lipophilie de la molécule et aide à prédire son comportement à travers une membrane biologique. Le solvant utilisé pour la phase organique est souvent l'octanol puisqu'il possède des propriétés similaires à celle de la membrane biologique. Ce coefficient de partage est mesuré à l'aide d'une méthode par agitation de flacon (51). La concentration dans chaque phase est calculée et le coefficient de partage est déterminé selon l'équation 3.

Le LogP est égal à l'expression logarithmique du rapport « P » des concentrations du soluté dans les deux phases [solvant polaire (eau) / solvant apolaire (octanol)].

$$P = \left(\frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{eau}}} \right) \quad \text{Équation 3}$$

Avec :

C_{octanol} : Concentration de la substance à l'équilibre dans l'octanol ;

C_{eau} : Concentration de la substance à l'équilibre dans l'eau.

Si $C_{\text{octanol}} > C_{\text{eau}} \Rightarrow P > 1 \Rightarrow \text{Log } P > 0$: le soluté est considéré lipophile.

Si $C_{\text{octanol}} < C_{\text{eau}} \Rightarrow P < 1 \Rightarrow \text{Log } P < 0$: le soluté est considéré hydrophile.

Le caractère lipidique des membranes favorise le passage des substances liposolubles c'est-à-dire celles dont le coefficient de partage est supérieur à 1, alors ces substances auront une affinité pour les membranes et pour les tissus à dominantes lipidiques.

III 4.7 Perméabilité de la SA

Si l'absorption de la SA est majoritairement gouvernée par la diffusion passive à travers la membrane intestinale (passage transcellulaire), il existe d'autres voies d'absorption tel que l'absorption via les transporteurs membranaires (transport actif) ou encore à travers les jonctions serrées (passage paracellulaire).

III 4 7 a) Passage transcellulaire

Le transport transcellulaire, c'est-à-dire l'absorption par les entérocytes, peut avoir lieu au niveau de l'épithélium intestinal (52). Lorsque les cellules sont serrées entre elles, la SA doit traverser les cellules elles-mêmes, et donc la membrane cytoplasmique, pour passer d'un compartiment à l'autre.

Ce phénomène peut se produire par un mécanisme actif (protéines membranaires) ou un mécanisme passif (diffusivité) qui intervient directement dans la loi de Fick par l'intermédiaire du coefficient de diffusion. Il peut être influencé par différents paramètres (53) tels que la viscosité du milieu, la solubilité de la SA et la formation de micelles (Fig.13 et 18).

III 4 7 b) Passage paracellulaire :

Il s'agit du passage entre deux cellules épithéliales adjacentes (54). Ce phénomène se produit lorsque les cellules épithéliales sont séparées entre elles par des jonctions plus ou moins ouvertes, les SA peuvent traverser l'épithélium via ces jonctions appelées « jonctions serrées ».

Le transport paracellulaire d'une molécule dépend essentiellement de son poids moléculaire et de sa charge. (55).

Les jonctions serrées scellent les cellules épithéliales et endothéliales entre elles grâce à la présence de plusieurs protéines. Elles jouent un rôle très important dans la régulation de la perméabilité membranaire. Toutefois, l'étanchéité n'est pas totale et certaines molécules peuvent emprunter l'espace intercellulaire qui existe entre deux cellules contiguës afin de passer d'un côté ou de l'autre de la membrane.

Cette voie de passage constitue la voie paracellulaire (Fig.19). Les jonctions serrées régulent de manière sélective le passage paracellulaire des molécules extracellulaires.

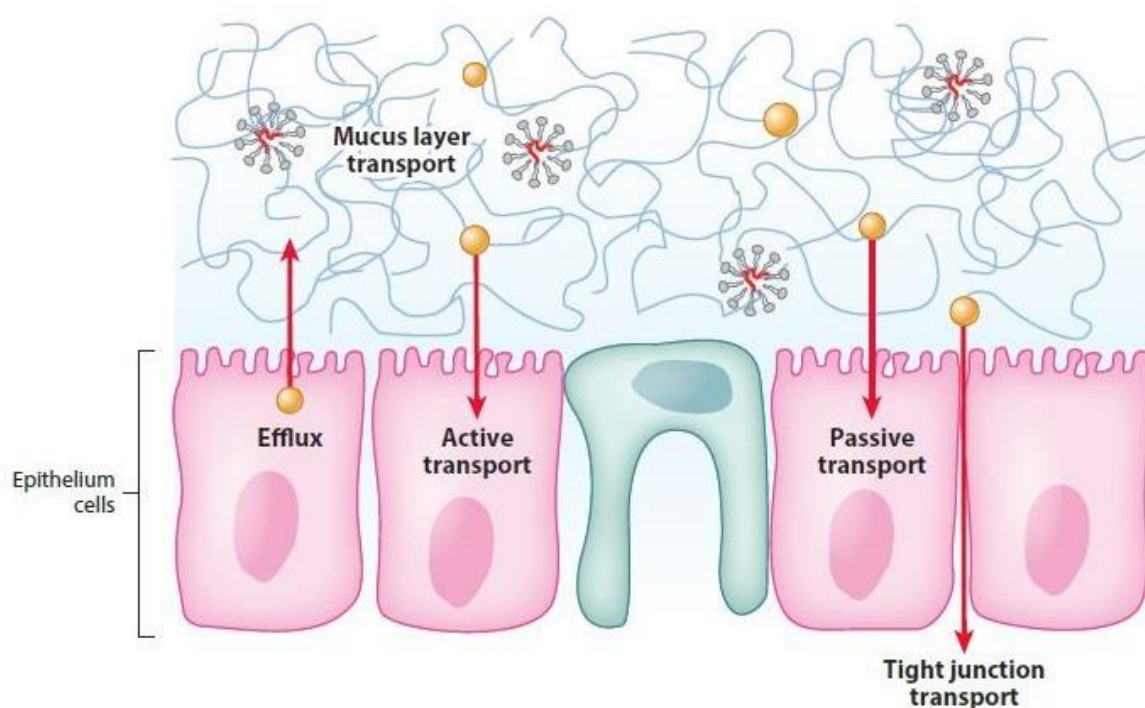


Figure 18 Schéma explicatif des mécanismes et des voies d'absorption (56)

En situation physiologique, le passage des molécules par la voie paracellulaire est limité par leur masse moléculaire et leur degré de lipophilie, mais en situation pathologique, l'ouverture des espaces intercellulaires, due à un affaiblissement des jonctions serrées peut permettre le passage de molécules de masse molaire élevée (40 kDa), voire la translocation bactérienne.

Plusieurs études ont cherché à préciser les bases moléculaires de l'augmentation de la perméabilité épithéliale dans des situations pathologiques par exemple ou bien en présence de certaines molécules exogènes et ont permis de montrer que l'affaiblissement et la fragilisation des jonctions serrées étaient en cause (57).

III 4 7 c) Facteurs limitant la perméabilité

La perméabilité d'une SA est donc un facteur majeur affectant sa biodisponibilité. Elle conditionne l'absorption à partir des fluides gastro-intestinaux, c'est-à-dire la fraction qui se passe à travers la couche de mucus, à travers les cellules épithéliales, et atteindra la circulation systémique.

Il est cependant difficile d'estimer la contribution des voies d'absorption pour expliquer la biodisponibilité orale d'un composé donné (58). Les SA ayant une bonne perméabilité intestinale sont très largement absorbés par diffusion passive (59).

C'est un mécanisme d'absorption qui dépend très fortement des propriétés physicochimiques de la molécule, sa masse moléculaire, son pKa et en particulier son LogP. Les molécules à caractère lipophile (LogP > 1), non ionisés et de masse moléculaire inférieure à 500 g/mol sont favorisées pour l'absorption passive.

La perméabilité peut donc être limitée par plusieurs facteurs spécifiques affectant la biodisponibilité, alors la SA peut faire face à plusieurs challenges tels que (56) :

- La **couche de mucine** peut limiter le passage par des interactions électrostatiques ou par la taille de la molécule.
- La **nature phospholipidique de la membrane** peut limiter le passage des molécules polaires.
- Les **jonctions serrées** peuvent limiter le passage des molécules larges.
- Le **transport actif** est spécifique uniquement à certaines molécules (substrats), de plus il nécessite de l'énergie (ATP)
- L'**efflux** peut limiter la perméabilité de certaines molécules qui peuvent être expulsées dans la lumière intestinale par les transporteurs d'efflux (PgP)

CHAPITRE II :

Etudes des principaux facteurs influençant la
biodisponibilité et relation avec la classification
biopharmaceutique

I. Etudes des facteurs influençant la biodisponibilité

I.1 Dissolution

I 1.1 Introduction

La première étape de la phase biopharmaceutique, après administration de la forme pharmaceutique, est la mise à disposition de la SA à partir de la forme pharmaceutique (Fig.19). Elle peut être plus ou moins rapide en fonction de la forme galénique et varier de quelques minutes pour des formes à libération immédiate (IR) à plusieurs heures pour des formes à libération modifiée (MR). Par la suite, la SA libérée se dissout dans les fluides du TGI puis traverse les différentes membranes biologiques pour atteindre la circulation générale

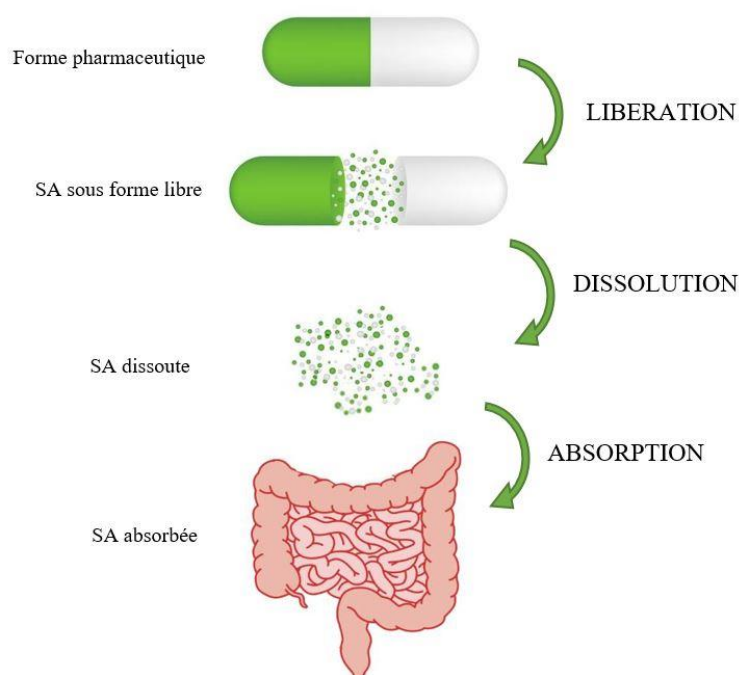


Figure 19 Les étapes de la mise à disposition de la SA dans l'organisme

La phase biopharmaceutique (libération/dissolution) est donc essentielle car elle influence directement la biodisponibilité de la SA et par conséquent la durée et l'intensité de l'effet thérapeutique. L'étude de la phase biopharmaceutique par des méthodes *in vitro*, c'est-à-dire la détermination de la dissolution *in vitro*, est donc un facteur important dans le développement et le contrôle des formes pharmaceutiques.

Les stratégies galéniques appliquées dans le contexte du développement pharmaceutique ont pour objectif d'élaborer une forme pharmaceutique à partir d'une SA présentant des caractéristiques optimales pour la production d'une forme orale solide. Cette formulation doit garantir une biodisponibilité et un effet thérapeutique constant au cours du temps de manière aussi indépendante que possible des processus de fabrication. Dans ce contexte, les tests de dissolution se sont révélés comme les meilleures méthodes pour évaluer le potentiel de développement de nouvelles substances et de nouvelles formulations. La cinétique de dissolution joue donc un grand rôle dans le développement des formes pharmaceutiques.

Le test dissolution est aussi le seul essai qui quantifie la libération du médicament *in vitro* en fonction du temps. Il mesure l'effet dynamique de propriétés statiques à l'état solide et peut être considéré : i) comme un indicateur des performances qui conduisent à la libération de la SA à partir de sa forme pharmaceutique, ii) comme marqueur de la stabilité et de la reproductibilité des processus de fabrication.

La dissolution est le procédé de dispersion moléculaire d'un corps solide, liquide ou gazeux dans un solvant de façon à former un mélange homogène appelé solution. Depuis les premiers travaux de Noyes et Withney sur « *la vitesse de dissolution de substances solides dans leur propre solution* », (60), de nombreuses études ont été effectuées pour relier la vitesse de dissolution avec les composants de la formulation et les étapes du procédé de fabrication. Dans les années 1960, Wagner-Nelson propose un modèle de lien entre la désagrégation *in vitro* de la SA et les données des profils plasmatiques *in vivo* (61).

Les conditions des essais de dissolution, de qualification des appareils de dissolution, et les étapes de validation doivent être conformes aux lignes directrices sur les essais de dissolution publiées par les différentes instances réglementaires en Europe et à l'international.

I 1.2 Objectifs de la dissolution

Les essais de dissolution ont pour objectif de déterminer la quantité de SA libérée à partir des formes solides en fonction du temps dans des conditions opératoires déterminées. Malgré leur apparente simplicité, ils demandent, pour être efficaces et pertinents, une approche multidisciplinaire impliquant les domaines biopharmaceutiques, physico-chimiques, analytiques et galéniques. La cinétique de dissolution de la SA est estimée par dosage successif de prélèvements effectués dans le milieu de dissolution à intervalles de temps définis. Les essais nécessitent :

- Un appareillage défini et spécifique maintenu à température constante (37°C) pour simuler la température corporelle ;
- Un milieu de dissolution approprié ;
- Une méthode analytique de dosage validée ;
- Un temps d'analyse suffisant pour observer l'intégralité de la dissolution ;
- Un nombre d'essais suffisant pour apprécier la variabilité intra-individuelle (minimum 6).

Les essais de dissolution sont utilisés pour : i) assurer la qualité pharmaceutique en termes de reproductibilité de manière à ce que la forme galénique conserve ses propriétés de libération tout au long du cycle de vie du produit, ii) évaluer de manière fiable la capacité de la forme pharmaceutique à libérer la SA en termes de vitesse et quantité, iii) évaluer les performances *in vivo* de la forme pharmaceutique dans le cadre des corrélations *in vitro* / *in vivo* (IVIVC) des études de bioéquivalence.

Les essais de dissolution fournissent une mesure de la libération de la substance active sous forme dissoute et sont utilisés à tous les stades de développement :

- Pour la pré-formulation, en complément des autres propriétés physico-chimiques de la SA, ils constituent un facteur clé car ils conditionnent, le choix de la SA (granulométrie, polymorphisme...) et/ou des opérations galéniques conduisant à la fabrication du médicament. Ils revêtent un aspect particulièrement important pour le développement des formes à libération modifiée dans le cas notamment de SA peu solubles. Ils permettent par ailleurs de valider la transposition d'échelle de la synthèse chimique et de contrôler la qualité des matières premières ;
- Pour la recherche des mécanismes de libération des SA en fonction de la forme galénique et plus particulièrement dans le cas des formes à libération modifiée ;

Les essais de dissolution constituent un élément essentiel au contrôle qualité d'une forme pharmaceutique et sont définis au sein de directives réglementaires :

- Pour la validation des procédés de fabrication. Dans ce cas, ils servent à démontrer la reproductibilité du procédé de fabrication et du produit fini ;
- Pour les études et le contrôle qualité des lots de fabrication et de la reproductibilité inter lots. Ils servent aussi à démontrer la reproductibilité du procédé de fabrication et du produit fini.

Les essais de dissolution peuvent par ailleurs être utilisés comme substitut dans les études de bioéquivalence. Dans ce cas, l'intérêt consiste à utiliser les tests de dissolution comme prédiction des performances *in vivo* de la forme pharmaceutique dans le cadre des corrélations *in vitro/ in vivo* (IVIVC).

Les tests de dissolution pour la vie orale peuvent être conduits selon deux approches :

- La mise au point d'essais *in vitro* fondés sur le modèle physiologique qui tente de reproduire les conditions physiologiques du TGI (simulation des gradients de pH le long du TD, mouvements péristaltiques, temps de transit...). Cette approche est souvent utilisée lors du développement de formulation pour mettre en évidence les paramètres physiologiques à prendre en considération dans le but d'optimiser la délivrance de la SA. Compte tenu de la complexité du tractus digestif ces modèles peuvent se révéler inappropriés pour refléter les conditions physiologiques dans l'objectif d'une IVIVC ;
- La mise au point d'essais se rapprochant au mieux des données observées *in vivo* indépendamment des conditions physiologiques. Cette approche permet le développement de formes pharmaceutiques dont la libération de SA est indépendante des facteurs physiologiques. Ces essais peuvent être conditionnés par des normes et revêtir un aspect réglementaire dans le cas notamment des études de bioéquivalence, de biodisponibilité et de IVIVC.

I 1.3 La théorie de la dissolution

La première loi décrivant la dissolution a été établie par Noyes et Witney (60). Elle constitue l'équation de base pour expliquer la solubilisation de la SA et décrire les tests de dissolution (62). Elle repose sur le fait que la vitesse de dissolution peut être considérée comme un processus de diffusion. Autrement dit, la SA dans le milieu de dissolution peut être représentée par des particules solides entourées d'un film de solvant dans lequel la concentration à son interface est à saturation (C_s) et qui se diffuse de manière homogène dans toutes les directions. Conformément à la loi de diffusion, la vitesse de dissolution est proportionnelle à la variation de la concentration de la solution saturée (à l'interface) et la concentration au sein du solvant au moment du prélèvement (C_t). L'hypothèse de Noyes et Witney considère donc que la vitesse de diffusion de la matière à travers le film constitue l'étape limitante de la dissolution (Fig.20). Pour la quantifier, ils appliquent la première loi de diffusion de Fick pour décrire la variation de la quantité de substance dissoute à partir d'une molécule en fonction du temps : (équation 4)

$$\frac{dM}{dt} = KS(C_s - C_t) \quad \text{Équation 4}$$

Avec :

M : la quantité de produit dissous ;

K : la constante de dissolution ;

S : la surface d'échange ;

C_s : la concentration à saturation ;

C_t : la concentration à l'instant t .

La dissolution est liée aux paramètres physiques comme la surface, la forme du solide, les caractéristiques de l'interface solide / liquide et la solubilité de la substance dans le liquide.

En 1904, Nernst et Bruner ont proposé la théorie de la couche de diffusion pour laquelle l'hypothèse est qu'il se forme, à la surface du solide immergé, un film d'épaisseur h dont la concentration passe de la saturation C_s à la surface du solide à la concentration moyenne au sein du liquide C_t . Dans ces conditions, la force d'entraînement pour la dissolution est le gradient de concentration entre C_s et C_t (Fig.20). En appliquant la loi de diffusion de Fick, ils ont introduit le facteur de diffusion D , l'épaisseur de la couche de diffusion h et le volume de solvant V (équation 5):

$$\frac{dM}{dt} = \frac{KSD}{Vh} (C_s - C_t) \quad \text{Équation 5}$$

Avec :

K : la constante de dissolution ;

S : la surface d'échange ;

D : le coefficient de diffusion ;

V : le volume de solvant ;

h : l'épaisseur de la couche de diffusion ;

C_s : la concentration à saturation ;

C_t : la concentration à l'instant t .

Cette théorie s'applique à l'ensemble des phénomènes de dissolution *in vitro* et *in vivo* et permet de mieux comprendre l'importance relative des différents paramètres de la dissolution. Cette équation montre que la SA se dissout instantanément dans une couche très fine du solvant, située autour de la particule, jusqu'à l'obtention d'une solution saturée. La diffusion de la SA au sein du liquide permet la poursuite de la dissolution. Celle-ci pourra avoir lieu tant que le milieu liquide ambiant ne sera pas lui-même saturé

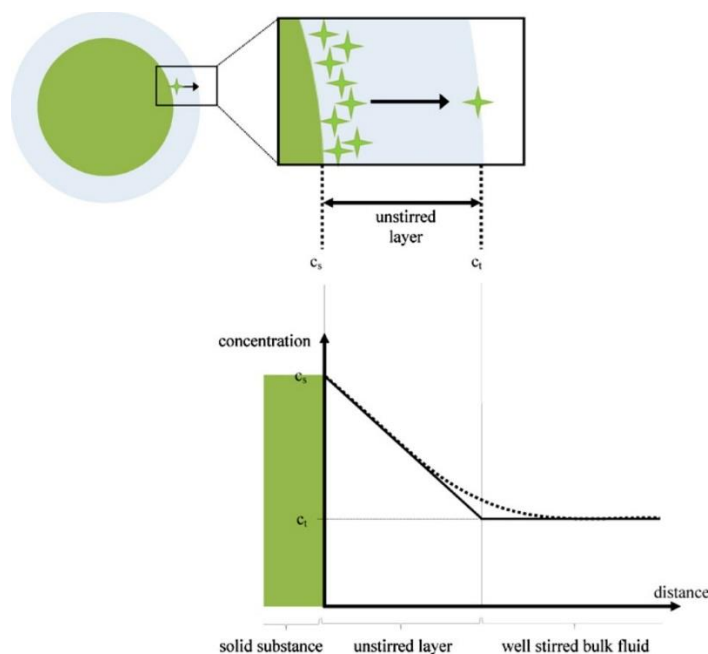


Figure 20 Schéma illustrant la dissolution d'une particule selon la théorie de la couche de diffusion (63)

Il est important de signaler que la dimension des particules (en particulier la surface spécifique S) a une influence sur la vitesse de dissolution. Pour que la dissolution se poursuive, il faut que le gradient de concentration soit positif, cela signifie que la concentration C_t soit inférieure à C_s . Pour obtenir une dissolution totale, il faut que la concentration au niveau de la solution soit faible par rapport à la concentration de saturation, la dissolution est effectuée dans les conditions d'excès de solvant dites : conditions *sink*. Il est important que les méthodes d'étude *in vitro* permettent de maintenir les conditions *sink*. Pour ce faire, il faut que la concentration C_t au sein du liquide reste largement en dessous de la concentration à saturation C_s . Arbitrairement, les conditions « *sink* » ont été définies lorsque C_t est inférieure à 30% de C_s .

Par ailleurs, l'épaisseur h sera dépendante de la vitesse d'agitation ou du débit et le coefficient de diffusion D sera dépendant de la température. Il est important de définir et de contrôler *in vitro* la vitesse d'agitation, la température du milieu de dissolution et sa viscosité (fonction de la température). De plus, la présence d'électrolytes et les variations du pH peuvent influencer la diffusion des molécules en modifiant leur ionisation. Ainsi, pour limiter ce phénomène, le milieu de dissolution *in vitro* devrait être aussi simple que possible.

Ces équations de dissolution s'appliquent pour des particules généralement de formes sphériques et de surface homogène. Dans ces conditions, il est possible de simplifier les équations et même de définir une constante de dissolution caractéristique de la substance. Ces principes sont mis à profit dans la détermination de la vitesse de dissolution intrinsèque des SA. Pour les formes pharmaceutiques, la dissolution mesurée est une dissolution apparente puisque des phénomènes supplémentaires entrent en jeu dont la désagrégation primaire et secondaire, la taille des particules qui change au cours du temps et l'influence des excipients qui peuvent favoriser la mouillabilité de la substance et sa dissolution.

I 1.4 Appareils de dissolution

Compte tenu de la diversité des formes pharmaceutiques solides orales et des propriétés physico-chimiques des substances actives, il n'est pas possible de concevoir un appareil unique utilisable pour toutes les formes. Il existe plus de 200 appareils décrits dans la littérature dont certains sont dédiés à une seule et unique forme pharmaceutique. Compte tenu de la nécessité de disposer d'un contrôle qualité fiable et reproductible, les autorités d'enregistrement ont progressivement standardisé quatre appareils décrits dans les Pharmacopées (Américaines, Européennes et Japonaises) pour les essais de dissolution des formes orales :

- L'appareil à panier tournant (USP 1); (Fig.21)
- L'appareil à palettes tournantes (USP 2); (Fig.22)
- L'appareil à cylindres réciproques (USP 3); (Fig.23)
- La cellule à flux continu (USP 4) (Fig.24).

L'exploitation des résultats des essais de dissolution dépend des conditions opératoires et de l'appareillage utilisé. Dans tous les cas, un appareil standardisé, soumis à une qualification réglementaire devra être utilisé. Le choix d'appareillage est déterminé par les caractéristiques physico-chimiques de la substance active et de la forme pharmaceutique, les propriétés biopharmaceutiques de la forme pharmaceutique et les caractéristiques de la forme. En règle générale, pour les formes solides à libération immédiate (IR), l'appareil à palettes tournantes est le plus souvent utilisé. Simple d'utilisation et facilement automatisable, il permet de transposer facilement les méthodes au niveau du contrôle qualité. Une alternative à l'appareil à palettes est l'appareil à paniers tournants qui est souvent utilisé pour les capsules à enveloppe dure. L'emploi de l'appareil à flux continu est recommandé lorsqu'un volume important du milieu de dissolution est requis (produit peu soluble), lorsqu'un changement de pH est nécessaire ou pour tester des poudres de substances actives. Enfin l'appareil à cylindres réciproques est en général réservé à l'étude des formes multiparticulaires à libération modifiée (micro granules) dont la libération est dépendante du pH.

I 1 4 a) L'appareil à paniers tournants (USP 1)

Dénoté USP1 par la Pharmacopée Américaine et Japonaise et décrit de manière identique dans la Pharmacopée Européenne, cet appareil se compose des éléments suivants (Fig.21) :

- Un récipient cylindrique à fond hémisphérique, d'une capacité pouvant contenir jusqu'à 1000 ml de solvant, en verre ou autre matériau transparent approprié. Le récipient est muni d'un couvercle servant à limiter l'évaporation et comporte un orifice central destiné au passage de la tige de l'agitateur ainsi que plusieurs autres orifices permettant l'introduction du thermomètre et des dispositifs de prélèvement ;
- Un agitateur constitué par une tige verticale à l'extrémité inférieure de laquelle est fixé un panier cylindrique. La distance entre la base du panier et le fond intérieur du récipient est de 25 ± 2 mm. L'extrémité supérieure de la tige est reliée à un moteur muni d'un régulateur de vitesse. La rotation de l'agitateur est uniforme, sans oscillation importante et ayant des côtes établies ;

- Un bain d'eau thermostaté permettant de maintenir la température du milieu de dissolution à $37 \pm 0,5$ °C.

La forme pharmaceutique, comprimé ou gélule, est placée dans le panier standard présentant une ouverture de maille bien définie. La tige et le panier sont immergés dans le récipient contenant le milieu de dissolution thermostaté. La forme est mise en mouvement par la rotation du panier à l'intérieur du milieu de dissolution.

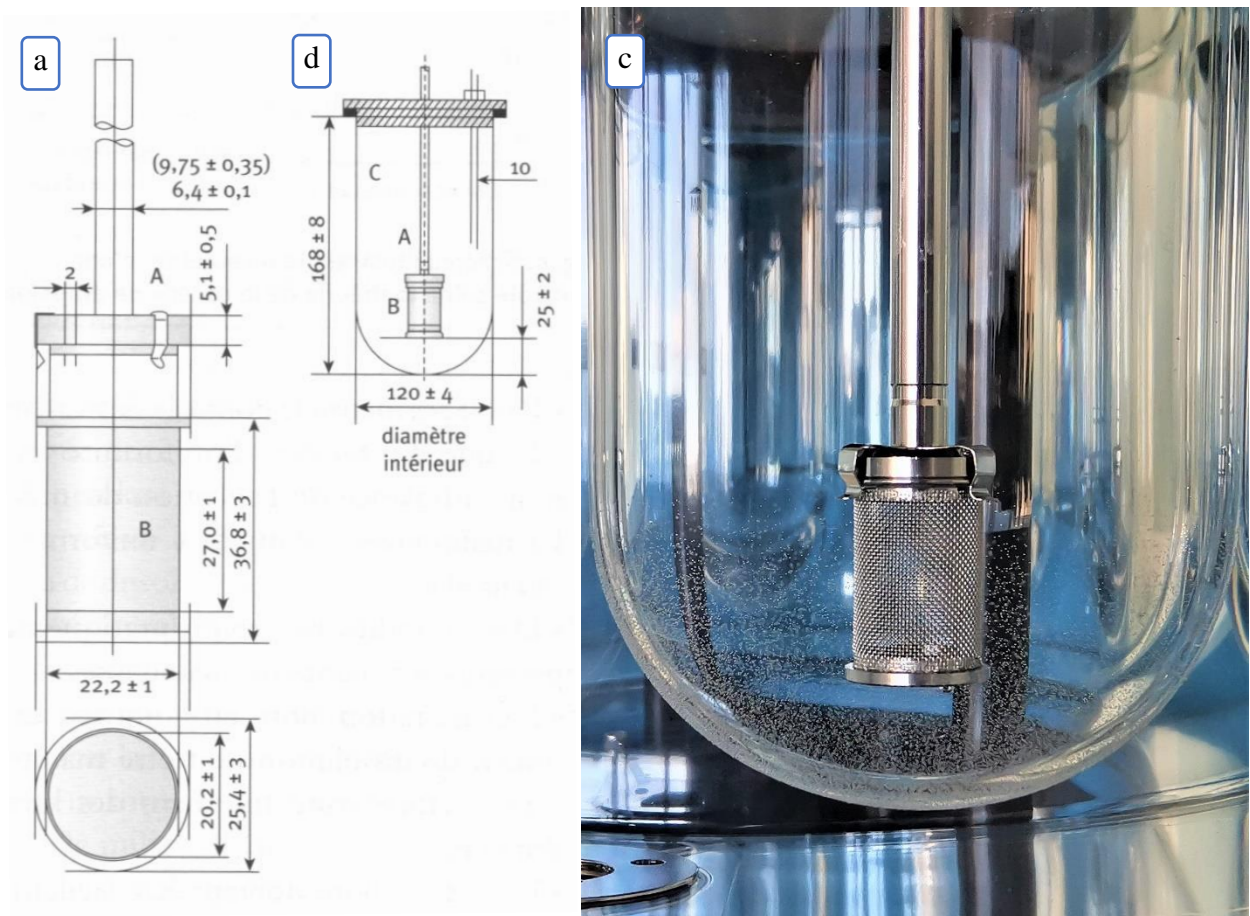


Figure 21 Appareil à paniers tournant (d'après EurPh 10.0) (a) schéma du panier, (b) schéma du réacteur (c) photographie de l'ensemble (panier + réacteur).

I 1 4 b) L'appareil à palettes tournantes (USP 2)

Décrit de manière identique dans les Pharmacopée Américaine et Européenne, dénommé également USP2, il se compose des éléments suivants :

- Un récipient identique à celui décrit pour l'appareil à paniers tournants (Fig.22.b) ;

- Un agitateur constitué par une tige verticale à l'extrémité inférieure de laquelle est fixée une palette ayant la forme d'une portion de cercle limitée par 2 plans parallèles. La distance entre la base de la palette et le fond du récipient est de 25 ± 2 mm. L'extrémité supérieure de la tige est reliée à un moteur muni d'un régulateur de vitesse. La rotation de l'agitateur est uniforme, sans oscillation importante (Fig.22a) ;
- Un bain d'eau thermostaté, permettant de maintenir la température du milieu de dissolution à $37 \pm 0,5$ °C.

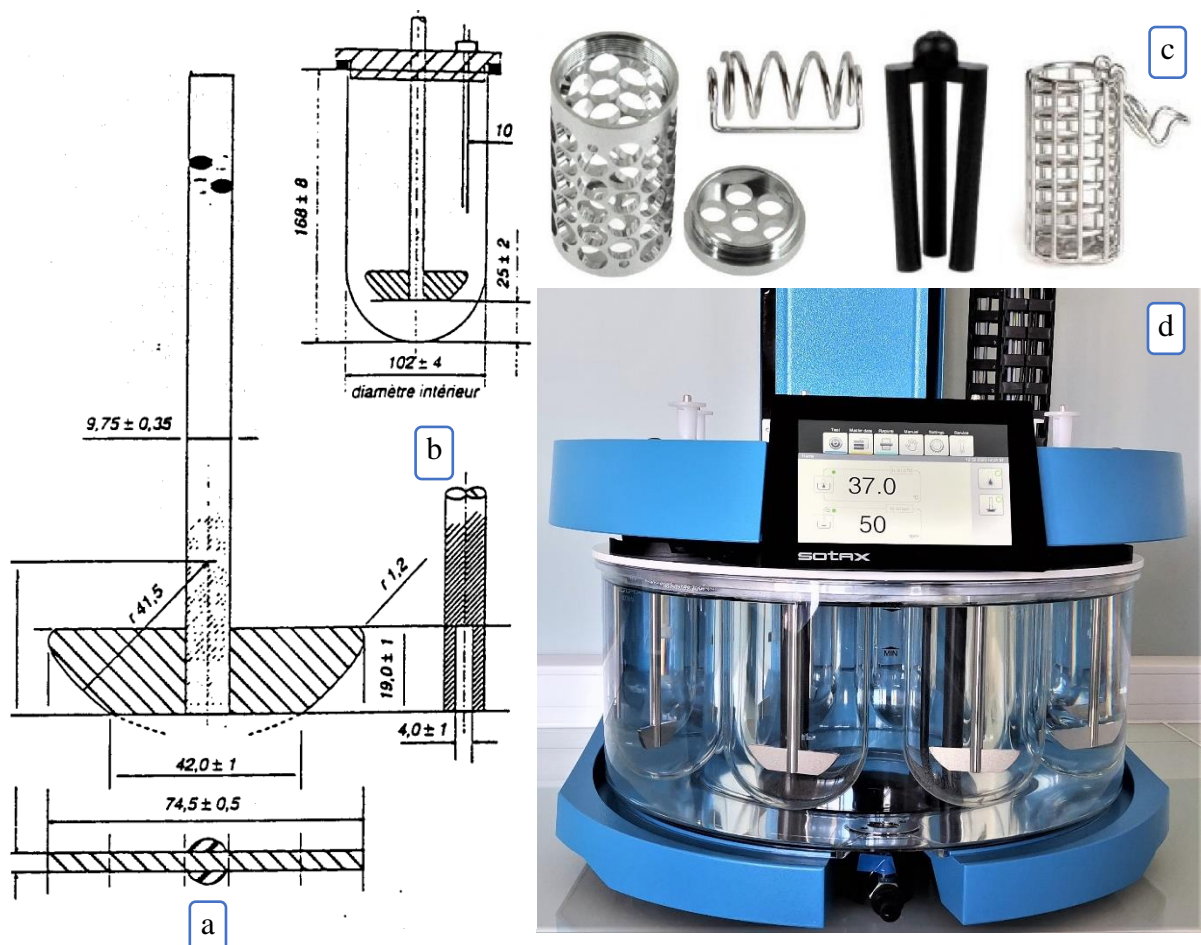


Figure 22 Appareil à palettes tournantes selon EurPh 10.0: (a) schéma des palettes, (b) schéma du réacteur, (c) dispositif de lestage. (d) photographie de l'appareil

Le récipient est rempli de milieu de dissolution et la forme pharmaceutique est introduite dans le réacteur en début d'expérimentation. La dissolution est assurée par l'agitation de la palette.

Le produit en cours d'étude doit rester au fond du réacteur à distance de la palette. Il est prévu, pour des formes qui flottent dans le milieu (par exemple capsules à enveloppe dure), un dispositif de lestage (Fig.22c) utilisé pour maintenir la forme en place.

Certaines études montrent qu'à partir d'une vitesse de rotation de 50 tours par minute (Rpm) il peut se former un cône de matière au fond du récipient qui est le résultat d'un écoulement radial de fluide dans le réacteur. Par conséquent, tout facteur susceptible de modifier ce cône (changement de vitesse, de pH...) peut avoir des répercussions importantes sur la vitesse de dissolution (64–66).

I 1 4 c) L'appareil à cylindres réciproques (USP 3)

Dénoté USP3 dans la Pharmacopée Américaine et connu sous le nom de « *Biodis* », cet appareil correspond à une amélioration de l'appareil de désagrégation, il se compose des éléments suivants (Fig.23a) :

- Une série de tubes en verre (tubes extérieurs) de forme cylindrique, alignés et une série de tubes cylindriques réciproques en verre (tubes intérieurs) fixés à la partie haute de l'appareil, en position verticale, à l'aide d'une tige de métal. Chaque extrémité des tubes intérieurs est munie d'un filtre amovible ;
- Un moteur permettant de faire plonger les tubes intérieurs dans les tubes extérieurs avec une amplitude et une vitesse définie et si nécessaire, de faire avancer la rangée de tubes intérieurs dans une nouvelle rangée de tubes extérieurs ;
- Un bain d'eau thermostaté permettant de maintenir la température du milieu de dissolution à $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Le produit à tester est introduit dans les tubes intérieurs, les tubes extérieurs sont remplis de milieu de dissolution. Les tubes intérieurs subissent un mouvement de bas en haut et de haut en bas dans les tubes extérieurs. L'amplitude des mouvements et la profondeur de l'immersion sont telles que la forme à étudier reste entièrement immergée dans le milieu de dissolution durant le cycle d'agitation. A la fin du cycle d'agitation, les tubes intérieurs sont amenés en position haute puis sont déplacés jusqu'à une nouvelle rangée de tubes prêts à entamer un nouveau cycle.

Cet appareil a été développé pour permettre d'étudier les formes à libération modifiée et notamment les formes micro-particulaires dans des pH successifs reproduisant les variations de pH TGI. Il permet ainsi de fournir un profil physiologique. Il est particulièrement adapté à des formes micro-particulaires à libération prolongée (67) (micro-granules par exemple). Les tamis (« *mesh* ») ont des tailles inférieures au diamètre des formes multiparticulaires.

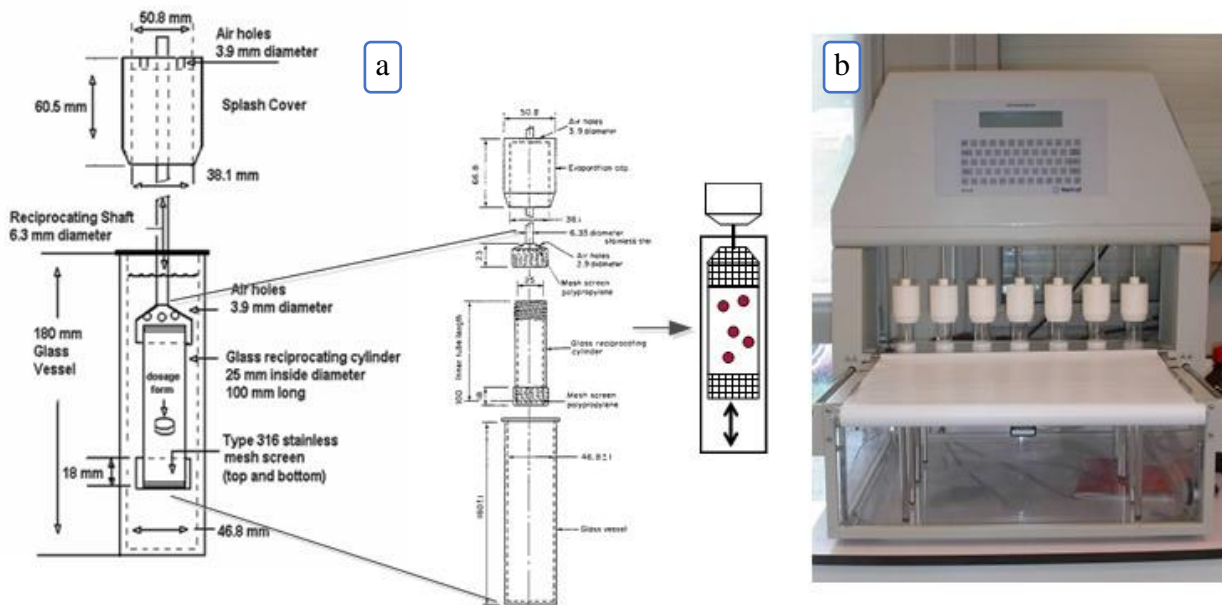


Figure 23 Appareil à cylindre réciproque selon EurPh 10.0; (a) schéma et mode de fonctionnement, (b) photographie de l'appareil.

I 1 4 d) La cellule à flux continu (USP 4)

Dénommée USP4 dans la Pharmacopée américaine, la forme galénique à contrôler est maintenue au sein d'une cellule cylindrique et verticale que le milieu de dissolution parcourt de façon continue de bas en haut, la cellule étant immergée dans un bain thermostaté. Elle se compose des éléments suivants (Fig.24) :

- Un réservoir pour le milieu de dissolution ;
- Une pompe à débit réglable servant à faire remonter le milieu de dissolution à travers la cellule à flux continu ;
- Une cellule à flux continu, constituée d'un matériau transparent, montée verticalement et munie d'un filtre permettant la rétention des particules non dissoutes ;
- Un bain d'eau thermostaté permettant de maintenir la température du milieu de dissolution à $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

La cellule à flux continu peut fonctionner soit en circuit fermé, soit en circuit ouvert. Le milieu de dissolution provenant d'un réservoir traverse la cellule dans laquelle est déposée une forme pharmaceutique. La dissolution est assurée par le passage du milieu de dissolution et par le renouvellement permanent de l'interface solide liquide qui, une fois chargé en substance active, retourne dans le récipient de départ s'il s'agit d'un circuit fermé, ou est récupéré dans un collecteur pour un circuit ouvert. Afin d'assurer un flux constant laminaire au niveau de la

cellule, une bille anti-reflux en rubis est déposée au fond du cône puis est recouverte d'un lit de billes de verre de 1 millimètre de diamètre.

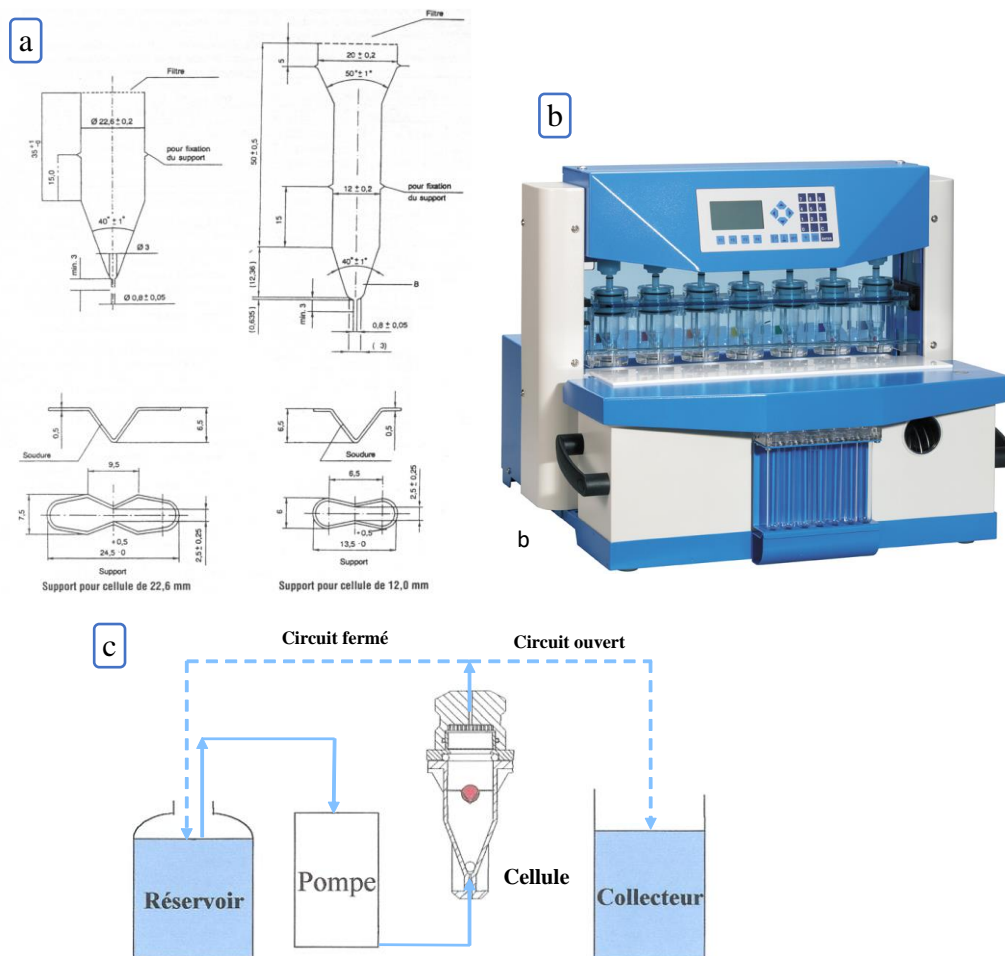


Figure 24 Cellule à flux continu selon EurPh 10.0; (a) description d'une cellule, (b) photographie de l'appareil, (c) schéma de fonctionnement en circuit ouvert et circuit fermé.

La cellule à flux continu est plus particulièrement destinée à étudier les formes à libération modifiée et les formes multiparticulaires (68,69). Elle permet de simuler les différents milieux du tractus et le renouvellement permanent du solvant assure le respect des conditions *sink* pour les substances actives très peu solubles (70,71). Il existe différents types de cellules, de tailles différentes spécifiques pour les comprimés, les gélules et les poudres et une cellule spécifique pour les formes semi solides lipophiles.



Figure 25 Les types de cellules à flux pour les différentes formes pharmaceutiques (72)

La cellule à flux continu présente certains avantages par rapport aux autres techniques, c'est une technique qui possède un système de filtration in situ, permet de maintenir des conditions *sink* pour des SA présentant une très faible solubilité et qui conduiraient normalement à des solutions saturées avec des appareils à panier ou à palettes tournantes, permet le changement de pH durant l'étude de la dissolution, permet de travailler aussi bien en circuit ouvert qu'en circuit fermé.

I 1.5 Les paramètres de dissolution

Lors de la détermination de la vitesse de dissolution des SA d'une forme pharmaceutique solide, il faut tenir compte de :

- L'appareil à utiliser, s'il s'agit de l'appareil à flux continu, le type de cellules et le mode d'utilisation (circuit ouvert ou fermé),
- La composition, le volume, la température du milieu de dissolution,

- La vitesse de rotation ou le débit du milieu de dissolution,
- Le mode de prélèvement des échantillons,
- La méthode d'analyse,
- Les critères d'acceptation.

I 1 5 a) Choix de l'appareil

Un grand nombre d'éléments de l'appareil ou des conditions opératoires liées à la méthode peuvent influencer les résultats. Dans tous les cas, un appareil standardisé, soumis à une qualification réglementaire devra être utilisé afin de garantir que la variabilité des résultats due à la méthode de dissolution est plus faible que celle provenant de la forme pharmaceutique elle-même. Le choix d'appareillage est déterminé par les caractéristiques physico-chimiques de la SA, les propriétés biopharmaceutiques de la forme pharmaceutique et les caractéristiques de la forme : SA soluble ou insoluble dans l'eau et les tampons, forme à libération immédiate, forme gastro-résistante, forme à libération modifiée, poudre, suspension...etc.

En règle générale, pour les formes solides à libération immédiate, l'appareil à palettes tournantes est le plus souvent utilisé. Simple d'utilisation et facilement automatisable, il permet de transposer facilement les méthodes au niveau du contrôle qualité. Une alternative à l'appareil à palettes est l'appareil à paniers tournants qui est souvent utilisé pour les capsules à enveloppe dure.

L'emploi de l'appareil à flux continu est recommandé lorsqu'un volume important du milieu de dissolution est requis (produit peu soluble) ou lorsqu'un changement de pH est nécessaire. Enfin l'appareil à cylindres réciproques est en général réservé à l'étude des formes multiparticulaires à libération modifiée (micro-granules) dont la libération est dépendante du pH.

Les paramètres de dissolution liés aux conditions opératoires et spécifiques du produit à étudier devront être définis et contrôlés :

I 1 5 b) Volume de dissolution

Pour les appareils à palettes et à paniers, les volumes les plus couramment utilisés sont 500, 900 et 1000 mL. L'emploi de volumes supérieurs à 1 L tels que 2 et 4 L devront être justifiés. Ces gros volumes permettent notamment de répondre à des problèmes de concentration et de *sink* conditions mais nécessitent des adaptations ou modifications des appareils qui ne sont pas

« conformes » aux textes décrits dans les Pharmacopées. L'emploi de volumes inférieurs à 500 mL devra être également justifié.

Pour l'appareil à cylindres réciproques le volume de milieu est déterminé par la capacité des cylindres extérieurs (125 ou 250 mL), le renouvellement du milieu est assuré par le mouvement des cylindres intérieurs vers la ligne de cylindres suivante. Dans le cas de la cellule à flux continu en circuit ouvert, le volume du milieu de dissolution est fonction du débit et de la durée de l'expérimentation. Dans le cas d'une utilisation en circuit fermé des volumes de 100 mL et jusqu'à plus de 5000 mL peuvent être utilisés.

I 1 5 c) 6.3. Vitesse d'agitation

La vitesse d'agitation utilisée doit permettre de développer une méthode discriminante capable de différencier des lots présentant des différences réelles. Selon la guideline de la Fédération Internationale Pharmaceutique (FIP, 1981), l'agitation doit être relativement douce. En effet, il ne faut pas perturber la couche de diffusion qui se trouve autour de la forme pharmaceutique et qui contient en saturation la substance active dissoute. De même, il faut s'assurer de l'absence de vibrations au niveau de la tige pour la palette et le panier tournant.

Des vitesses supérieures à 100 Rpm pour l'appareil à panier et 75 Rpm pour l'appareil à palettes et inférieures à 50 Rpm devront être justifiées. Des vitesses inférieures à 25 Rpm et supérieures à 150 Rpm sont généralement inacceptables du fait de la non reproductibilité des courants hydrodynamiques au-dessous de 25 Rpm et de la non reproductibilité des turbulences au-dessus de 150 Rpm.

Pour l'appareil à cylindres réciproques les mouvements des cylindres sont en général compris entre 15 et 30 « dip per minute ».

Pour l'appareil à flux continu, le débit est normalement réglé entre 4 et 30 mL/min. Les débits standards sont 4, 8, 16 mL/min.

I 1 5 d) 6.4. Température

La température du milieu de dissolution est fixée à $37 \pm 0,5$ °C pour la voie orale, elle correspond à la température corporelle et elle doit être contrôlée avant le lancement du test et durant l'expérimentation.

I 1 5 e) 6.5. Milieu de dissolution

En règle générale, le milieu de dissolution utilisé est un milieu aqueux. La composition du milieu est choisie en fonction des caractéristiques physico-chimiques de la (ou des) substances(s) active(s) et excipient(s), en restant dans les limites des conditions auxquelles un médicament ou une forme pharmaceutique est susceptible d'être exposé après son administration. Ceci s'applique notamment au pH et à la force ionique du milieu de dissolution. Le pH du milieu de dissolution est habituellement compris entre 1 et 7,6.

La présence de gaz dissous dans le milieu de dissolution peut affecter les résultats de l'essai, en particulier dans le cas de la cellule à flux continu, où une désaération du milieu est nécessaire pour éviter la formation de bulles dans la cellule.

L'eau distillée n'est pas recommandée car elle présente des propriétés dissolvantes qui peuvent être très différentes de celles des liquides physiologiques vis-à-vis d'un certain nombre de substances, en particulier des composés ioniques, pour lesquels l'influence du pH est prédominante. L'eau peut être utilisée comme milieu de dissolution à condition d'avoir montré que la solubilisation de la SA et des excipients n'entraîne pas d'importantes variations de pH et s'il a été démontré que la solubilisation de la substance active n'est pas sensible aux variations de pH.

Les solutions tampons sont largement utilisées depuis les solutions acides (pH 1,2) préparées au moyen d'acide chlorhydrique dilué additionné de chlorure de sodium pour simuler le milieu gastrique, jusqu'aux solutions alcalines (pH compris entre 6,5 et 8) utilisées pour simuler le pH intestinal, en passant par des solutions tampons de pH intermédiaires (entre 4 et 6) qui correspondent au pH duodénal. Les différents milieux utilisables et leur composition détaillée sont décrits dans les Pharmacopées.

Le tableau 4 présente quelques exemples de milieu de dissolution.

pH	Milieu de dissolution
pH 1,0	HCl
pH 1,2	NaCl, HCl
pH 1,5	NaCl, HCl
pH 4,5	Tampon phosphate ou acétate
pH 5,5 et 5,8	Tampon phosphate ou acétate
pH 6,8	Tampon phosphate
pH 7,2 et 7,5	Tampon phosphate
pH 3-6,2	Tampon citrate

Tableau 4 Exemples de milieux de dissolution.

Au niveau physiologique, le milieu présent au niveau luminal est constitué de différents éléments et varie selon la région du tractus gastrointestinal considéré et en fonction de la présence ou non d'aliments. Divers liquides sont sécrétés tels que l'acide chlorhydrique, du bicarbonate, des enzymes, des surfactants, des électrolytes, du mucus et de l'eau. Tous ces éléments ont un impact sur la solubilité et le taux de dissolution de la substance active après son administration dans une forme pharmaceutique donnée. Pour un sujet à jeun, le pH peut varier de 1 à 7. De manière générale, chez un individu en bonne santé, de race caucasienne, le pH en période de jeun dans l'estomac n'excède pas 3 avec un écart-type allant de 1,4 à 2,1. Au cours d'un repas, le pH acide est tamponné avec un milieu moins acide qui dépend de la composition du repas. Les valeurs du pH peuvent, alors, varier de 3 à 7.

Le pH intestinal est supérieur au pH gastrique en raison de la neutralisation de l'acide par les ions carbonates sécrétés par le pancréas. Dans le petit intestin, il existe un gradient de pH entre le duodénum et l'iléum. Par ailleurs, il est possible de constater qu'au niveau du colon, les valeurs du pH sont profondément influencées par des réactions bactériennes exo-enzymatiques. En effet, les carbohydrates non digérés sont convertis en petites chaînes d'acides gras qui abaissent le pH local aux alentours de 5. Le tableau 2 résume les pH physiologiques moyen du TGI.

Pour se rapprocher des conditions physiologiques et évaluer l'impact des enzymes sur la forme pharmaceutique, certaines enzymes peuvent être introduites dans le milieu de dissolution. Les milieux gastrique et intestinal artificiels désignent des solutions (acide et alcaline) qui sont plus conformes aux sucs physiologiques par addition d'enzymes et éventuellement de sels biliaires. Ces enzymes influencent cependant rarement la dissolution *in vitro* de la substance active, par contre, elles peuvent modifier le comportement de la forme pharmaceutique.

Ces milieux sont ainsi utilisés lorsque la forme pharmaceutique présente des excipients sensibles aux enzymes (gélatine des capsules à enveloppe dure, excipients lipidiques dans les formes à libération modifiée).

Ainsi le suc gastrique artificiel contient du chlorure de sodium, de l'acide chlorhydrique et de la poudre de pepsine. Le suc intestinal artificiel de pH 6,8 contient du phosphate monopotassique, de la soude et de la pancréatine.

Tout au long de la cinétique de dissolution *in vitro*, la quantité dissoute doit être inférieure si possible à 30% à celle obtenue à saturation pour rester dans la définition des conditions *sink*. Afin de pallier le manque de solubilité de la substance active, il est possible d'ajouter des tensio-actifs dans le milieu de dissolution. La tension superficielle des fluides digestifs est variable

selon la présence ou non de sels biliaires, elle est voisine de 30 à 50 dynes/cm. Les tensio-actifs seront utilisés soit à une concentration submicellaire, soit à une concentration micellaire critique (CMC). A la concentration submicellaire, les tensio-actifs vont favoriser essentiellement la mouillabilité de la forme pharmaceutique ou de la substance active et ainsi, améliorer la dissolution dans le cas où il y a des excipients hydrophobes dans la formulation. Il est recommandé d'utiliser des tensio-actifs à faible concentration si ceux-ci provoquent une nette accélération du processus de dissolution. Ils ne doivent en aucun cas modifier la solubilité de la substance active. Pour des concentrations supérieures à la CMC, l'addition des tensio-actifs améliore la solubilité. Les principaux tensioactifs utilisés sont le lauryl sulfate de sodium (SDS), le polysorbate 80, l'hexadecyltriméthylammonium bromide (CTAB). Ils se différencient par leur balance hydrophile lipophile (HLB), leur comportement tensioactif en fonction du pH et leur pouvoir solubilisant.

Dans le but de simuler les conditions digestives à jeun et en présence d'une alimentation, et afin d'évaluer les interactions potentielles « aliment/médicament », des milieux de dissolution complexes ont été proposés (73,74).

Ces milieux biorelevant permettent de simuler les conditions stomacales et intestinales en condition à jeun ou avec une alimentation. Leurs compositions reflètent mieux la réalité car ils contiennent des sels biliaires, des tensioactifs (lécithine), leurs pH sont maintenus à des valeurs physiologiques et leurs osmolalités à des valeurs proches de celles rencontrées au niveau du tractus gastro-intestinal. Ces milieux permettent l'estimation *in vitro* de l'influence d'une alimentation sur la libération/dissolution d'une forme galénique. Des études *in vitro* ont mis en évidence que ces milieux pouvaient être utilisés comme outils de prédiction du comportement *in vivo* des formes pharmaceutiques. En dehors de la qualité des composants qui est primordiale, la préparation des milieux FaSSGF, FeSSGF, FaSSIF et FeSSIF doit être standardisée pour qu'ils gardent leur caractère prédictif (73,75). Le tableau 5 présente la composition de ces différents milieux.

L'utilisation de ces milieux très spécifiques est réservée à la pré-formulation, au développement. Cependant, leurs coûts de préparation étant importants, leur utilisation en routine est limitée.

Fast state simulated gastric fluid (FaSSGF)		Fed state simulated gastric fluid (FeSSGF)	
pH	1,6	pH	5
osmolalité	120,7±2,5 mOsmol	osmolalité	400 mOsmol
Taurocholate de sodium	0,08 mM	NaCl	237,02 mM
lécithine	0,02 mM	Acide acétique	17,12 mM
NaCl	34,2 mM	Acétate de sodium	29,75 mM
Pepsine	0,1 g/L		
NaOH / HCl	qs pH 1,6	NaOH / HCl	qs pH 5
eau désionisée	qs 1L	eau désionisée	qs 1L

Fast state simulated intestinal fluid (FaSSIF)		Fed state simulated intestinal fluid (FeSSIF)	
pH	6,5	pH	5
osmolalité	270±10 mOsmol	osmolalité	635±10 mOsmol
Taurocholate de sodium	3 mM	Taurocholate de sodium	15 mM
lécithine	0,75 mM	lécithine	3,75 mM
NaH ₂ PO ₄	28,66 mM	Acide acétique	144 mM
NaOH	13,8 mM	NaOH	101 mM
NaCl	106 mM	NaCl	173 mM
NaOH / HCl	qs pH 6,5	NaOH / HCl	qs pH 5
eau désionisée	qs 1L	eau désionisée	qs 1L

Tableau 5 Composition des milieux de dissolution simulant les conditions à jeun (FaSSGF), en période post-prandiale (FeSSGF) dans l'estomac, à jeun (FaSSIF) et en période post-prandiale (FeSSIF) dans la partie proximale de l'intestin grêle (74)

I 1.6 Interprétation et modélisation des cinétiques de dissolution

Les résultats expérimentaux obtenus à l'aide des essais *in vitro* permettent d'évaluer les quantités de SA libérés en fonction du temps. Les essais sont réalisés sur au moins 6 unités du même lot et en parallèle. Des échantillons sont prélevés à des temps prédéfinis et la quantité de SA dissoute dans le milieu de dissolution est dosée, en général par une méthode de spectroscopie UV ou en HPLC. Les résultats obtenus sont des pourcentages ou des quantités dissoutes en fonction du temps et ils sont généralement exprimés en pourcentage cumulés.

I 1 6 a) Modélisation (modèles dépendants)

La diversité des profils obtenus rend souvent la comparaison des résultats de dissolution et leur interprétation difficile. L'application de modèles mathématiques (76) rend cette comparaison plus aisée. Il existe d'une part, des modèles dépendants qui sont liés par leurs paramètres aux processus physique mis en jeu lors de la mise à disposition de la SA à partir de sa forme

pharmaceutique (74,77) et d'autre part, des modèles descriptifs qui ont pour objectif de décrire au mieux les profils de dissolution sans présupposer d'un modèle explicatif. Seuls les principaux modèles les plus utilisés seront cités, tel que : le modèle d'ordre zéro, dit linéaire ($y=ax+b$) et les modèles non linéaires tel que le modèle d'ordre 1, le modèle d'Higuchi et le modèle de Weibull (Fig.26)

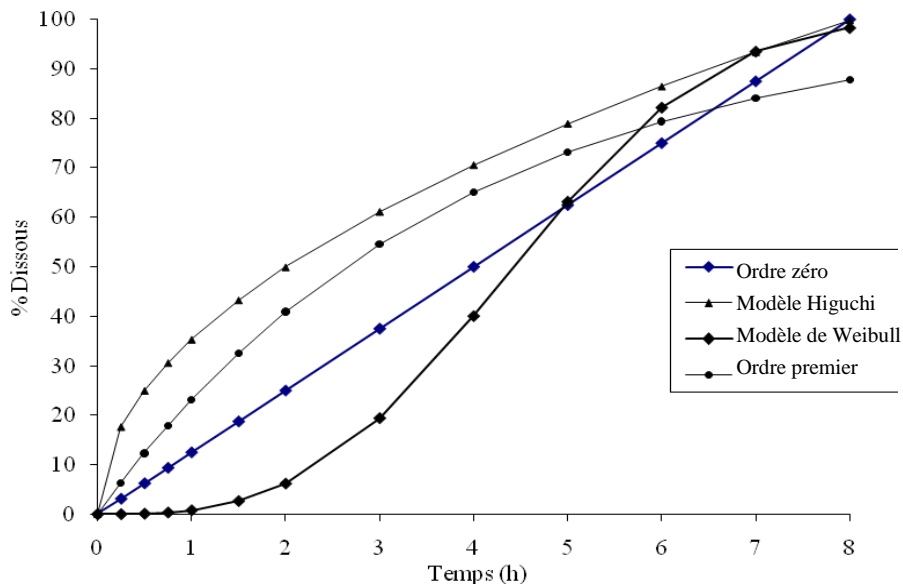


Figure 26 Les principaux modèles des courbes de dissolution in vitro (78).

1. Le modèle d'ordre 0.

Ce modèle s'applique à des formes qui ne se désagrègent pas et dont la libération de la SA est très lente et s'opère sur une grande période de temps. Les conditions d'application du modèle imposent que la surface d'échange reste constante et que les conditions d'équilibre ne soient pas atteintes. Il s'applique pour des formes à libération modifiée de type matrice avec des SA peu soluble, des formes enrobées et des systèmes osmotique (79). Le modèle est le suivant :

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad \text{Équation 6}$$

Avec :

Q_t la quantité dissoute de SA au temps t ;

Q_0 la quantité totale de SA ;

K_0 la constante de dissolution d'ordre zéros.

2. Le modèle d'ordre 1 (ou modèle homogène).

Ce modèle, introduit par Noyes et Witney, est aussi utilisé pour décrire les phénomènes d'absorption et d'élimination *in vivo*. Cette relation peut être utilisée pour décrire, par exemple, la dissolution de SA au sein de matrices poreuses (80) (matrice inertes). L'équation différentielle du modèle est la suivante :

$$Q_t = Q_0(1 - \exp^{-\alpha t}) \quad \text{Équation 7}$$

Avec :

Q_t la quantité dissoute à l'instant t ;

Q_0 la quantité totale ;

α la constante de vitesse.

3. Le modèle d'Higuchi

Il s'agit du premier modèle (81) proposée pour décrire la libération de SA solubilisée libérée à partir d'un système matriciel (82). Initialement conçu pour des surfaces planes, il a été étendu et adapté à différentes formes géométriques et aux systèmes poreux. La quantité de SA libérée à partir d'une matrice homogène s'exprime par la relation :

$$Q_t = \sqrt{D(2C_0 - C_s)C_s t} \quad \text{Équation 8}$$

Avec :

Q_t la quantité libérée au temps t ;

C_0 la concentration initiale de SA ;

C_s la concentration de SA à saturation ;

D la constante de diffusion au sein du système matriciel.

Ce modèle est fondé sur les hypothèses suivantes : i) la concentration initiale au sein de la matrice est très supérieure à la solubilité de la SA (maintien d'un gradient de concentration), ii) la diffusion ne s'effectue que dans une seule dimension, iii) les particules de SA sont plus petites que le système matriciel, iv) la diffusion de SA est constante, v) la condition « *sink* » est toujours remplie. La formule simplifiée du modèle d'Higuchi est donnée par l'expression suivante :

$$Q_t = K_d \sqrt{t - t_0} \quad \text{Équation 9}$$

Avec :

K_d la constante de dissolution d'Higuchi.

4. Le modèle de Weibull.

Ce modèle repose sur une analyse globale du processus de dissolution sans aucune hypothèse préalable relative aux mécanismes mis en jeu lors de la libération de la SA, il permet de décrire la plupart des profils de dissolution (76)

$$Q_t = Q_\infty \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{TDM}\right)^\beta \right] \quad \text{Équation 10}$$

Avec :

Q_t la quantité de SA dissoute au temps t ;

Q_∞ est la quantité de SA libérée à l'infini (totale) ;

t le temps de latence ;

TDM est une constante de temps appelée « temps de dissolution moyen » et qui correspond au temps nécessaire à la dissolution de 63.2% de la SA à partir de t_0 ;

B est un paramètre de forme dont la valeur dépend de l'évolution de la cinétique de dissolution : i) $\beta < 1$ le profil de dissolution correspond à une courbe monotone parabolique, ii) $\beta = 1$; le profil est une exponentielle qui équivaut à un modèle du premier ordre, iii) $\beta > 1$ le profil est une courbe sigmoïdale présentant un point d'inflexion ;

I 1 6 b) Comparaison de profils de dissolution (modèles indépendants)

En dehors de la modélisation des profils de dissolution, il est possible d'évaluer directement certaines valeurs remarquables telles que les temps de dissolution par exemple 20, 50 et 90% de SA libérée. Ces valeurs permettent d'apprécier (approximativement) respectivement la fraction libérée au temps précoce, au point d'inflexion du profil, et la quantité maximale libérée. Ces points sont estimés par interpolation entre deux points expérimentaux :

1. L'efficacité de dissolution (ED).

L'efficacité de dissolution est aussi utilisée pour caractériser les cinétiques de dissolution (83). Elle correspond au rapport exprimé en pourcentage entre l'aire sous la courbe (AUC) de dissolution mesurée à un temps t donné et l'aire du rectangle délimitée par l'ordonnée à 100% du produit dissous et l'abscisse t :

$$DE\% = \frac{AUC_0^t}{AUC_{100.t}} \times 100 \quad \text{Équation 11}$$

2. Analyse de variance

Cette approche intègre dans l'estimation statistique de la similarité, les différentes sources de variabilité inter et intra profils (modèles à effets mixtes)

Elle est réalisée par des analyses uni ou multivariées. L'analyse statistique univariée (méthode du *t*-test, ANOVA à un ou deux facteurs) est effectuée directement sur les profils par comparaison de un ou plusieurs points de prélèvements (84) ou sur des ratio en calculant, par exemple, le rapport des temps de dissolution moyen (TDM) entre la forme à tester et la forme de référence.

L'analyse statistique multivariée procède par comparaison des moyennes des profils (test et référence) entre différents temps de prélèvement.

3. Tests f_1 et f_2

L'analyse par appariement procède par comparaison de différence de pourcentage moyen de SA dissoute entre deux formulations pour une même unité de temps. Ces tests développés par Moore et Flanner en 1996 (85) décrivent respectivement deux facteurs : i) le facteur de différence (f_1), ii) le facteur de similarité (f_2). Ces derniers ont été adoptés par la FDA et l'EMA comme test de référence pour évaluer la similarité entre deux profils de dissolution Ils sont inclus dans les différentes directives publiées par les autorités. Ces tests s'effectuent par comparaison point par point :

- (i) La fonction f_1 appelée aussi facteur de différence mesure le pourcentage d'erreur entre deux courbes en prenant en considération l'ensemble des points expérimentaux :

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100 \quad \text{Équation 12}$$

Avec :

n le nombre de points de prélèvement ;

R_t et T_t sont les pourcentages dissous au temps t respectivement de la formulation de référence et de la formulation test ;

Ce facteur varie de 0% pour des profils en tout point identiques à 100% pour des profils complètement différents.

- (ii) La fonction f_2 appelée aussi facteur de similarité est la transformation logarithmique de la somme des carrés des différences entre R_t et T_t :

$$f_2 = 50 \log \left[\frac{100}{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [\bar{R}(t) - \bar{T}(t)]^2}{n}} \right] \quad \text{Équation 13}$$

Avec :

n le nombre de points de prélèvement ;

R_t et T_t les pourcentages dissous au temps t respectivement de la formulation de référence et de la formulation test ;

Ce facteur varie de 0% si les profils sont totalement différents à 100% pour des profils totalement similaires.

Pour que deux profils soient considérés comme similaires aucune valeur du facteur de différence f_1 ne doit être supérieure à 15% et la valeur du facteur de similarité f_2 doit être supérieure à 50%.

Les conditions d'application du test f_1 et f_2 sont strictes et sont indiquées dans les lignes directrices. Le nombre d'unités testées est de 12 pour chaque formulation et les moyennes des 12 unités sont prises en compte. Afin que le résultat ne soit pas influencé par trop de points non représentatifs, les points de prélèvements pour les deux profils doivent être identiques, avec trois points minimums en plus de celui du temps zéro, la variabilité doit être égale ou inférieure à 20 % pour le premier temps de dissolution puis inférieure à 10 % pour le reste et un seul point de prélèvement après la libération 85 % doit être utilisé.

I.2 Perméabilité

I 2.1 Introduction

La prédiction de l'absorption humaine d'un médicament est un objectif majeur dans la conception, l'optimisation et sélection des actifs ou les excipients destinés à une administration orale. Actuellement il existe diverses techniques utilisées pour évaluer l'ampleur de l'absorption dans les différentes phases de la découverte et du développement de médicaments. Les protocoles pour évaluer l'absorption des SA comprend une gamme de méthodologies diversifiées *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* et *in vivo* (86). (Fig.27)

Les tests sur les animaux sont très utilisés dans les études précliniques pour évaluer l'absorption des SA dans l'industrie des médicaments, bien qu'ils prennent du temps et soient chers et qu'ils ne prédisent pas le comportement chez l'homme. Les techniques *in vitro* d'évaluation de la perméabilité des médicaments sont moins laborieuses, moins chères et plus conformes aux politiques éthiques des « trois R » (87)

La perméabilité est la capacité d'une SA à traverser les barrières membranaires pour rejoindre la circulation générale (88). Elle est quantifiée par la perméabilité apparente (P_{app}) qui est une vitesse correspondant au déplacement des molécules par unité de temps. Elle peut être déterminée par :

- Des études de biodisponibilité chez l'homme ;
- Des études de perfusion utilisant des techniques d'intubation chez l'homme. Le nombre de substances étudiées par cette méthode est cependant limité. Elle est réalisée chez l'animal où des corrélations sont possibles avec l'homme via des modèles *in situ*. Les perfusions s'effectuent au niveau de l'intestin grêle principalement dans le duodénum et le jéjunum ;
- Des études *in vitro* de perméabilité sur des fragments de tissus intestinaux d'origine animale ;
- Des études *in vitro* de perméabilité sur des cultures cellulaires ;
- Des études analytiques portant sur le caractère lipophile des drogues par détermination des coefficients de partage.

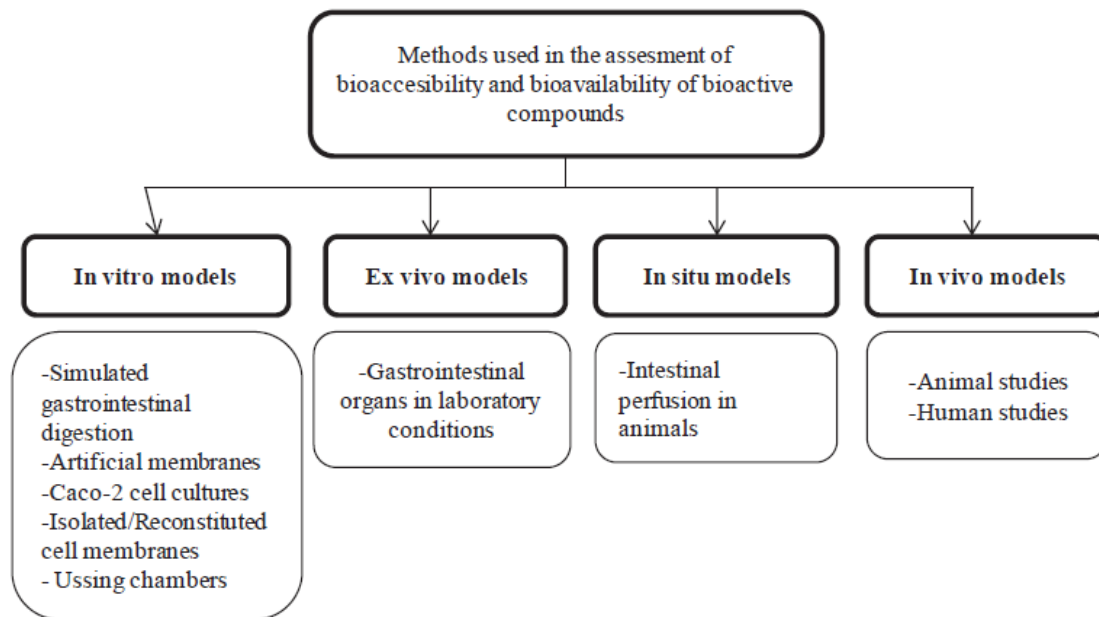


Figure 27 Méthodologies fréquemment utilisées dans l'évaluation de la perméabilité (86)

En outre, des modèles *in vitro* qui simulent de manière approfondie les conditions dans la muqueuse humaine renvoient des données d'absorption qui peuvent aider à sélectionner les composés entrant dans la phase clinique développement. L'impact de ces modèles repose sur leur potentiel de développement rapide, rentable, et une prévisibilité adéquate du potentiel d'absorption chez l'homme (43). Dans certains cas, les données conviennent pour appuyer le dépôt réglementaire d'une nouvelle demande de médicament.

Les modèles de culture cellulaire offrent l'avantage d'un outil hautement défini dans lequel les paramètres et les conditions peuvent être facilement modifiées. De plus, l'utilisation de lignées cellulaires humaines évite le genre de problèmes qui surviennent lors de l'utilisation de tissus animaux pour des expériences *in vitro* (89)

Les méthodes *in vitro* actuelles écartent souvent l'état de l'intégrité des muqueuses simulées, elles sont basées essentiellement sur la confluence de monocouches cellulaires et ne prennent pas en compte les interactions intra et-extracellule sur les mécanismes d'absorption. Les modèles cellulaires *in vitro* ont été optimisés, devenant de plus en plus complexes et incorporant plus d'un type de cellule afin de ressembler plus étroitement aux tissus *in vivo*.(43)

Les expériences tissulaires *ex vivo*, en revanche, peuvent représenter une approche alternative pour suivre le devenir des SA dans les tissus épithéliaux, de plus, la viabilité des tissus et l'intégrité sont maintenues. En fait, ils représenteraient les conditions les plus proches de la condition humaine.

Compte tenu de toutes les méthodologies, l'utilisation de méthodes *in vitro* ou *ex vivo* intrinsèquement pose des questions sur la validité de l'extrapolation à la situation *in vivo* (90). La IVIVC doit permettre la prédiction de la pharmacocinétique *in vivo* d'une SA basée sur son profil de perméabilité *in vitro*.

Dans cette partie, l'accent sera mis sur les deux modèles (cellulaire et tissulaire) permettant de calculer la perméabilité des substances actives en soulignant les techniques et le principe.

I 2.2 Modèle cellulaire *in vitro* « Caco2 »

Les modèles cellulaires sont un compromis entre un niveau intermédiaire de complexité, avec de multiples systèmes d'absorption qui reflètent l'organe *in vivo*, et ce qu'il est possible de reproduire en laboratoire (91). Depuis leur isolement d'un carcinome colorectal humain (**Cancer Coli-2**) (92), les cellules Caco-2 ont été considérées comme le test standard pour prédire l'absorption intestinale (93). Les cellules Caco-2 subissent spontanément une différenciation entérocytaire typique, un processus lié à la croissance. Aux premiers stades de la culture (3 à 4 jours), les cellules Caco-2 restent indifférenciées, ne présentant que peu de microvillosités apicales et n'expriment pas la réactivité immunitaire de la sucrase (un indicateur des microvillosités).

À la confluence (Fig.29 milieu), ils forment des monocouches polarisées jointes par des jonctions serrées (JS) et présentent des microvillosités apicales (94). Malgré leur origine colique, les cellules Caco-2 expriment la majorité des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules intestinales absorbantes, y compris des enzymes telles que les disaccharidases et les peptidases généralement exprimées par les entérocytes. De plus, les cellules Caco-2 ne constituent pas une membrane passive, confirmée par l'identification de multiples transporteurs d'absorption et d'efflux (95). Cependant, l'enzyme métabolisante la plus importante dans l'intestin humain (CYP3A4), est faible ou absente dans les cellules Caco-2, surestimant la fraction absorbée des substrats 3A4 (96).

Les cellules Caco-2 sont cultivées sur une membrane microporeuse d'insert placée dans des inserts de culture individuelles comme le système Transwell® (Fig.28).

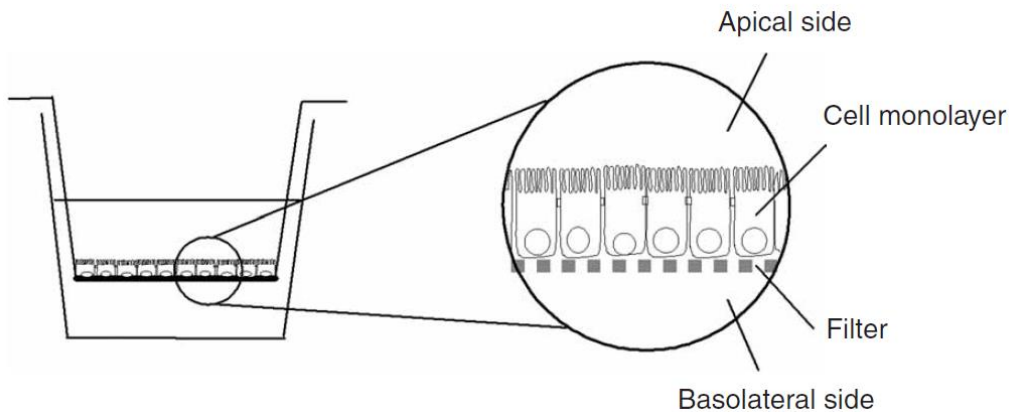


Figure 28 Représentation schématique du système Transwell® (97)

Dans certaines conditions de culture, généralement après une période de culture de 21 jours, les cellules se différencient spontanément en cellules intestinales polarisées pour former un épithélium mimant une barrière intestinale fonctionnelle (Fig.29) (présence de microvillosités, jonctions serrées, transporteurs spécifiques, enzymes du processus de métabolisation...), les cellules forment donc, une monocouche différenciée isolant les compartiments supérieurs et inférieurs de la chambre de culture.

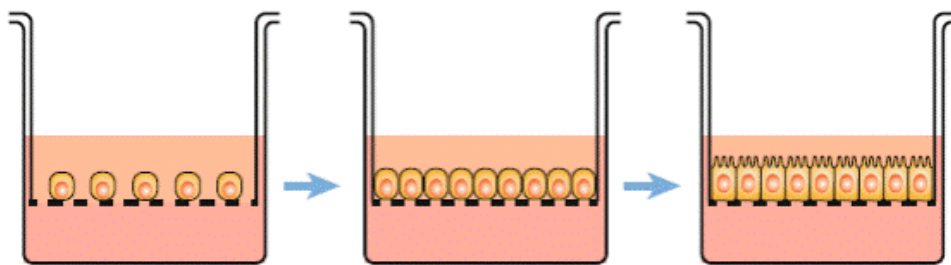


Figure 29 Schéma représentant des étapes de la maturation des cellules Caco-2 (confluence au milieu puis différenciation au bout de 21 jours environ) (98)

Le produit à tester est déposé sur la monocouche cellulaire (compartiment apical) et il est dosé au cours du temps dans le compartiment basolatéral. L'essai sur cellules Caco-2 permet d'évaluer la perméabilité intestinale d'une SA, c'est à dire sa capacité à traverser la paroi intestinale pour rejoindre la circulation sanguine et se distribuer dans l'organisme. La perméabilité d'une SA sur les Caco-2 est appelée « perméabilité apparente (P_{app}) ». Elle est calculée selon l'équation 14. La P_{app} permet de prédire la biodisponibilité attendue chez l'homme en utilisant une corrélation avec des SA de références dont l'absorption chez l'homme et la P_{app} sont connues (Propranolol et Atenolol par exemple)

$$P_{app} (cm. s^{-1}) = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{AC_0} \quad \text{Équation 14}$$

Avec :

dQ/dt : le flux de produit testé à travers la monocouche ($mg.sec^{-1}$) ;

C_0 : la concentration initiale dans le compartiment apical ($mg.mL^{-1}$) ;

A : est la surface de la monocouche (cm^2)

L'utilisation d'un tel système permet d'avoir un accès direct et aisé aux cotés apical (lumière intestinale) et basolatéral (milieu intérieur) de l'épithélium intestinal (Fig.29), permettant ainsi l'évaluation des échanges entre les 2 compartiments.

D'après Verhoeckx et al (99), l'essai de perméabilité sur cellules Caco-2 permet:

- Le screening et la sélection de composés d'intérêts.
- La comparaison de différentes formulations galéniques (efficacité de l'absorption orale).
- La détermination des paramètres cinétiques d'absorption.
- D'élucider les voies de transport de médicaments (par exemple, mécanismes paracellulaires contre transcellulaires ou passifs contre porteurs) à travers l'épithélium intestinal (100).
- De réaliser l'étude des effets toxiques potentiels des médicaments candidats ou des métabolites alimentaires sur la muqueuse intestinale (101).
- De déterminer comment les composants d'une formulation (par exemple, les adjuvants ou les matrices alimentaires) peuvent influencer sur le transport épithélial intestinal des molécules bioactives (102).
- D'étudier et déterminer les interactions entre les molécules bioactives pendant le transport à travers l'épithélium intestinal (103).

I 2.3 Évaluation de l'intégrité de la membrane et de la viabilité des cellules

I 2 3 a) Test de la viabilité cellulaire

L'évaluation de la viabilité cellulaire est fondamentale dans tous les travaux de culture cellulaire. La viabilité cellulaire fournit des informations sur les conditions de culture en général, et peut également représenter le système de lecture final pour une expérience de cytotoxicité. Un grand nombre d'essais de viabilité sont rapportés dans la littérature, allant du simple test d'exclusion au bleu trypan à l'analyse de cytométrie en flux voir des analyses complexes de cellules individuelles par spectroscopie Raman.

Les tests de viabilité cellulaire chevaucheront souvent les tests de prolifération cellulaire. Ils sont divisés en analyses qui surveillent la viabilité au niveau de la cellule unique et celles qui analysent la viabilité au niveau de la population. Le test de viabilité le plus simple et le moins cher est la teinture vitale au bleu trypan. Le bleu trypan est exclu à l'extérieur des cellules et des tissus dont les membranes sont intactes, et la coloration des cellules mortes est facile à détecter au microscope optique standard. Les cellules qui ont un cytoplasme clair sont donc considérées comme des cellules viables et celles qui ont un cytoplasme coloré en bleu sont considérées comme des cellules mortes (104).

I 2 3 b) Mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER)

Les tissus épithéliaux se distinguent des autres tissus par la polarisation des cellules qui les constituent. Cette asymétrie est due à une différence de répartition des protéines à la face apicale et basolatérale des cellules qui constituent la membrane, et par le fait que les cellules sont fortement liées entre elles par les jonctions serrées intercellulaires qui assurent une grande étanchéité du tissu.

La diminution de l'étanchéité membranaire due à l'ouverture des jonctions serrées peut causer la diminution de la polarisation et donc de la résistance membranaire. Cette résistance membranaire appelée la résistance électrique transépithéliale ou TEER (TransEpithelial Electrical Resistance) peut être directement mesurée sur les Caco-2 (Fig.30.a)

La détermination du TEER est une technique simple et pratique qui fournit des informations sur l'uniformité de la monocouche de cellules Caco-2 sur le support de filtre et l'intégrité des jonctions serrées formées entre les cellules. Ainsi, les mesures du TEER sont souvent utilisées pour étudier la fonction de barrière épithéliale. L'électrode est placée dans le milieu de la chambre supérieure qui permet de mesurer directement la résistance par un voltmètre portable comme le voltmètre MilliporeSigma™ Millicell-ERS2 ® (Fig.30.b).

Les valeurs du TEER peuvent dépendre de nombreux paramètres tels que le clone Caco-2 utilisé, le nombre de passages, la durée et les conditions d'incubation (97). Dans notre laboratoire, les monocouches de cellules avec des valeurs de TEER inférieures à 800 Ωcm^2 sont éliminées.

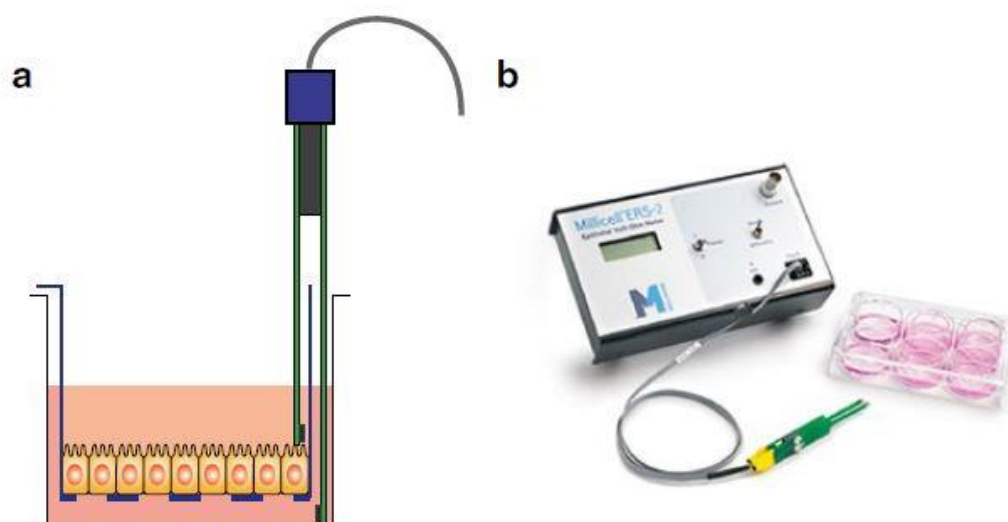


Figure 30 a) Schéma représentatif de l'électrode placée dans l'insert de culture cellulaire Transwell®. NB : l'électrode courte ne doit pas être en contact avec la couche cellulaire, tandis que l'électrode longue doit simplement toucher le fond de l'insert b) image de l'appareil de mesure MilliporeSigma™ Millicell-ERS2® (98)

I 2.4 Modèle tissulaire *ex vivo* « Intestin isolé »

Pour plusieurs raisons, mais en particulier pour des raisons financières et éthiques, les approches *in vitro* restent pertinentes et prédominantes car il existe un bon accord entre les résultats de perméabilité intestinale chez des animaux spécifiques et des sujets humains (105). De plus, ces techniques d'évaluation de la perméabilité sont moins laborieuses, moins coûteuses et offrent des avantages au niveau des considérations éthiques par rapport aux études animales *in vivo* (106).

Le but de tout modèle *in vitro* est d'effectuer diverses études dans des conditions bien contrôlées et facilement accessibles sans utiliser d'animaux. L'application réussie de modèles *in vitro* pour prédire l'absorption des SA à travers la muqueuse intestinale dépend de comment ils imitent les caractéristiques de l'épithélium intestinal *in vivo*. Toutefois il est difficile de développer un seul système *in vitro* capable de simuler toutes les conditions existant dans l'intestin humain et les modèles Caco2, précédemment décrits peuvent être complétés ou supplésés par des études sur d'autres lignées cellulaires (HT29, TC7, MDCK) (107,108)

À l'heure actuelle, les modèles *in vitro* ne reflètent pas exactement les situations *in vivo*, mais ils sont utiles pour répondre à des questions plus spécifiques dans des études dans lesquelles les conditions peuvent être plus facilement contrôlées qu'*in vivo*, et sont couramment utilisés comme outils de prise de décision dans la découverte précoce de médicaments (105).

Pour de nombreuses autres études visant à élucider les mécanismes d'absorptions, le modèle cellulaire peut être précis, par contre, lorsqu'une extrapolation des données *in vitro* à la situation *in vivo* est requise, le modèle doit refléter la complexité des questions posées. Dans ce contexte, les organes ou tissus fonctionnels *ex vivo* présentent une corrélation étendue avec de nombreux types de cellules différentes (109).

I 2 4 a) Principe de la méthode et attentes

La technique peut être utilisée pour étudier les propriétés d'absorption des composés pharmaceutiques, en mesurant la quantité qui se retrouve du côté extérieur (basolatéral) et dans les cellules épithéliales, à condition que l'analyse utilisée soit suffisamment sensible.

Dans des conditions optimales (température, équilibre ionique, pression osmotique, nutrition, oxygénation), le tissu est viable jusqu'à 2 h hors de l'organisme et le système est principalement utilisé pour étudier les mécanismes d'absorption, le métabolisme intestinal, les rôles du transporteur dans l'absorption et le rôle des enzymes intestinaux pendant le transport des SA à travers l'intestin (110).

L'ensemble de l'expérience se pratique sur un segment duodéal de 10 cm d'un rat à jeun depuis la veille afin d'augmenter la sensibilité et de réduire le plus possible la quantité de résidus dans l'intestin. Le segment intestinal est transféré dans une boîte de pétri contenant du tampon Krebs-Henseleit (Tableau 6), lavé puis ligaturé à une extrémité pour former un sac intestinal. Cette section intestinale est remplie par le produit d'intérêt (coté apical) et l'autre extrémité est attachée. Le sac intestinal obtenu est ensuite incubé dans le tampon de Krebs (milieu sérosal) qui est composée de sucre et d'ions permettant de maintenir en vie les tissus de l'organe isolé pendant la durée de l'expérience (111).

Composant	Concentration (g/L)
D-Glucose	2.0
Sulfate de Magnesium [Anhydre]	0.141
Phosphate de Potassium Monobasique	0.16
Chloride de Potassium	0.35
Chloride de Sodium	6.9
Chloride de Calcium dihydrate	0.373
Bicarbonate de Sodium	2.1

Tableau 6 Composition du tampon de Krebs-Henseleit (112)

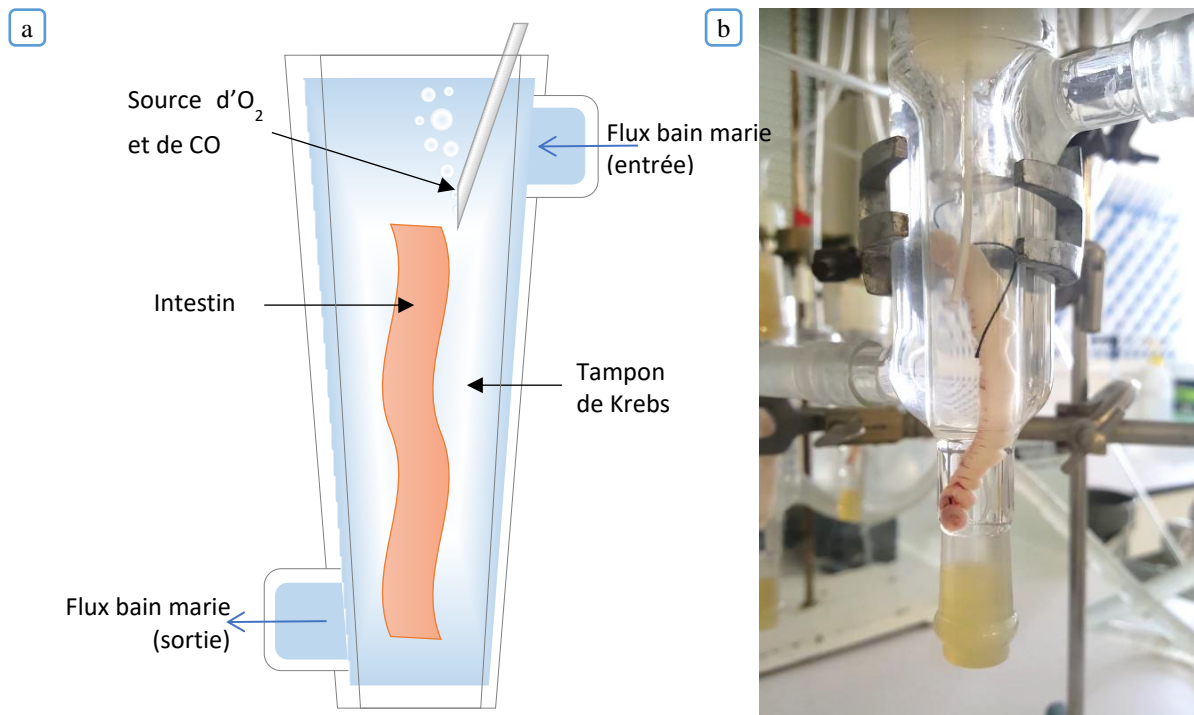


Figure 31 a) Représentation schématique du système de l'intestin isolé ; b) Photographie du système

Une variante de la méthode consiste à exciser un segment à partir d'intestins de rats, noué d'un bord et soigneusement éversé de l'autre en le plaçant sur une tige en verre. Ce segment est ensuite rempli d'une solution saline et fermé pour former un sac intestinal. Au temps zéro le sac intestinal inversé est incubé dans un volume défini de solution de milieu expérimental contenant la substance active à étudier, sous agitation, aération et à 37°C. Cette technique permet de travailler avec des SA peu solubles en augmentant le volume de la solution à tester.

Quelle que soit la configuration, à des temps prédéfinis, des prélèvements sont effectués dans le milieu sérosal pour déterminer la quantité de SA absorbée.

I 2 4 b) Résultats attendus

À partir des données de la cinétique, le flux de SA ($\text{mg}\cdot\text{sec}^{-1}$), déterminé par la pente correspondant à la partie linéaire de la quantité transportée en fonction du temps, est calculé. La perméabilité apparente (P_{app}) à partir de la méthode de l'intestin isolé est calculée selon l'équation 14, la même utilisée dans le modèle *in vitro*.

$$P_{\text{app}} (\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}) = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{AC_0} \quad \text{Équation 14}$$

Avec :

dQ/dt : La quantité cumulée de SA (Q) apparaissant dans le compartiment accepteur en fonction du temps

C_0 : la concentration initiale dans le compartiment donneur ($mg.mL^{-1}$) ;

A : est la surface de l'intestin (cm^2) (rayon de 0,18 cm)

L'avantage de ce test est qu'il est relativement simple et rapide à mettre en place. Plusieurs segments peuvent être générés à partir d'un seul animal, ce qui permet à chaque animal d'être son propre contrôle. L'inconvénient de ce test est qu'il s'agit d'un test biologique, il faut s'assurer de la viabilité du tissu au cours de l'expérience.

II. La classification biopharmaceutique

Comme cela a été démontré dans ce chapitre, la biodisponibilité orale des SA repose sur la connaissance des événements physiques et physiologiques survenant dans le TGI. En pratique la solubilité et la perméabilité des SA sont deux paramètres importants qui influencent la biodisponibilité d'une molécule (58).

Proposé par G.Amidon en 1995 (21) comme outil de prédiction de l'absorption orale des substances actives, la classification biopharmaceutique des médicaments, Biopharmaceutical Classification System (BCS), est définie par les instances réglementaires FDA, EMA et ICH (20,113,114).

II.1 Biopharmaceutical Classification System (BCS)

La classification biopharmaceutique des médicaments (BCS) est un outil qui permet d'évaluer les performances *in vivo* des médicaments administrés par voie orale. Elle propose une classification des SA fondée sur la solubilité aqueuse et la perméabilité intestinale (21). Combinée avec les caractéristiques de dissolution *in vitro*, la classification BCS prend en compte les trois facteurs principaux qui conditionnent la vitesse et l'étendue de l'absorption *in vivo* des formes orales solides : i) la solubilité, ii) la perméabilité intestinale, iii) la vitesse de dissolution. La classification BCS s'applique aux SA et au développement des formes à libération immédiate.

Elle a été adoptée comme critère de décision et de classification par différentes agences FDA (113) EMEA (20) qui concernent : i) les modifications de procédés survenant après

l'approbation, ii) les transpositions d'échelle, iii) les règles de substitution c'est-à-dire d'exemption de bioéquivalence. Dans ce contexte, la classification BCS permet l'amélioration des processus de développement.

La classification BCS est représentée sous forme d'un tableau croisé entre la solubilité et la perméabilité et dont les facteurs définissent, pour ces paramètres un niveau faible ou élevé (Fig.32).

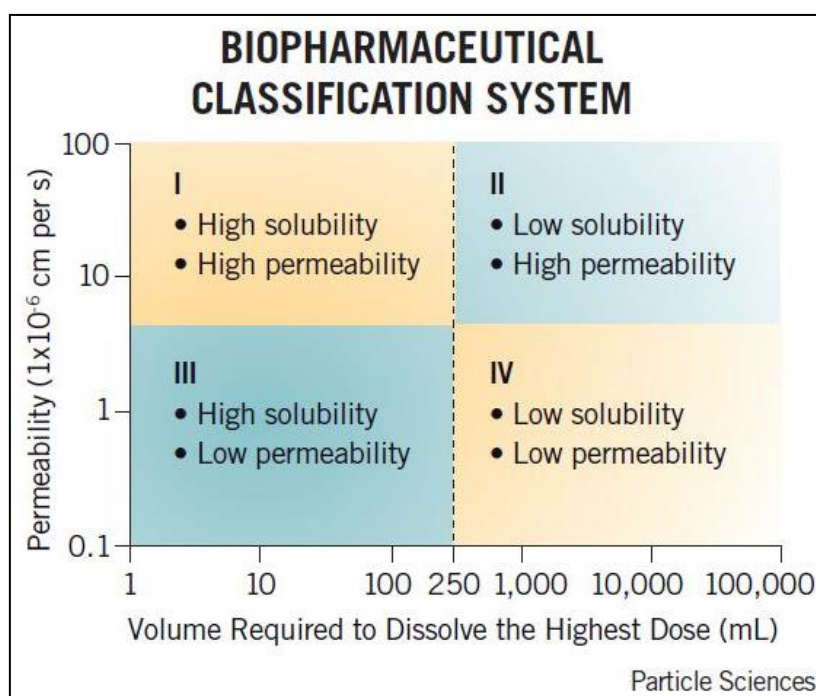


Figure 32 Biopharmaceutical Classification System (115)

La solubilité est la quantité maximale d'une SA sous forme solide pouvant être dissoute dans un volume de solvant défini et à température définie. Elle est déterminée en calculant le volume de solvant à différents niveaux de pH (de 1 à 7.5) nécessaire à la dissolution de la plus haute dose unitaire (forme pharmaceutique ou SA) à température fixée (37±1°). La fraction entre la dose et la solubilité permet d'obtenir une estimation de la capacité de dissolution d'une substance active.

Si le volume de liquide nécessaire à dissoudre entièrement la quantité de SA (plus haute dose unitaire) est inférieur ou égal à 250 ml, la SA est considérée comme ayant une **solubilité élevée** sinon elle est considérée comme ayant une **solubilité faible**. Ce volume, fondé sur le protocole des études de bioéquivalence, caractérise la quantité d'eau absorbée avec la SA lors de

l'administration du médicament chez un patient à jeun. De plus, la dissolution est considérée comme rapide si, au moins 85% de la dose unitaire est dissoute en 30 minutes (116).

La perméabilité est la capacité d'une SA à traverser les barrières membranaires pour rejoindre la circulation générale (88). Elle est quantifiée par la perméabilité apparente (P_{app}) qui est une vitesse correspondant au déplacement des molécules par unité de temps. Elle peut être déterminée par plusieurs techniques (Fig.27), à savoir :

- Des études de biodisponibilité chez l'homme ;
- Des études de perfusion utilisant des techniques d'intubation chez l'homme. Le nombre de substances étudié par cette méthode est cependant limité. Elle est réalisée chez l'animal où des corrélations sont possibles avec l'homme via des modèles *in situ*. Les perfusions s'effectuent au niveau de l'intestin grêle principalement dans le duodénum et le jéjunum ;
- Des études *in vitro* de perméabilité sur des fragments de tissus intestinaux d'origine animale ;
- Des études *in vitro* de perméabilité sur des cultures cellulaires ;
- Des études analytiques portant sur le caractère lipophile des drogues par détermination des coefficients de partage.

La figure 33 montre la relation existante entre la perméabilité apparente obtenue chez l'homme et la biodisponibilité absolue pour différentes molécules (117). Comme le montre cette figure, les molécules ont été divisées en deux classes, celles ayant une $P_{app} < 4.10^{-4}$ cm/s ont une perméabilité faible tandis que les molécules ayant une $P_{app} > 4.10^{-4}$ (plateau) ont une perméabilité élevée.

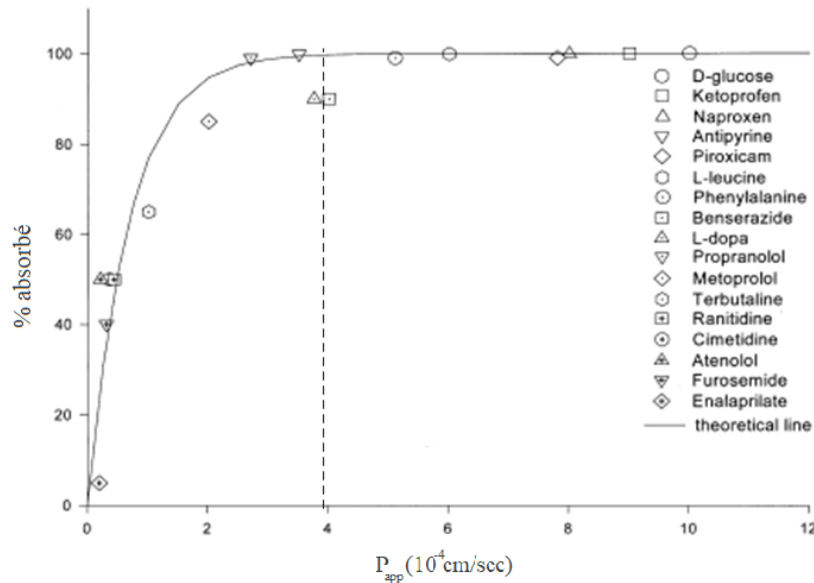


Figure 33 Relation entre la perméabilité apparente et la biodisponibilité absolue (117)

Une approche complémentaire a été développée par Lipinski (118) en effectuant une étude sur 2250 molécules. Il observe que la perméabilité sera d'autant meilleure si : i) le poids moléculaire de la SA est inférieur à 500 (idéalement = 350), ii) le nombre de liaisons H acceptrices est inférieure à 10 (idéalement = 5), iii) le nombre de liaisons H donneuses < 5 (idéalement = 2), iv) le LogP est compris entre 2 et 5 (idéalement = 3), v) le nombre d'angles de rotation de la molécule est inférieure à 5.

II 1.1 Les paramètres de la classification BCS

La classification BCS définit trois paramètres importants qui contrôlent la solubilité et la perméabilité qui sont ; i) le paramètre d'absorption A_n (*Absorption number*), ii) le paramètres de dissolution D_n (*Dissolution number*), iii) le paramètre de dose D_o (*Dose number*) (117):

II 1 1 a) Le paramètre d'absorption A_n :

$$A_n = \frac{T_{res}}{T_{abs}} \quad \text{Équation 15}$$

Avec :

T_{res} : le temps moyen de transit au niveau de l'intestin qui varie entre 2 et 5 heures.

T_{abs} : le temps d'absorption moyen, il est défini par la relation :

$$T_{abs} = \frac{R}{P_{app}} \quad \text{Équation 16}$$

Il vient :

$$A_n = \frac{P_{app} T_{res}}{R} \quad \text{Équation 17}$$

Avec :

P_{app} : la perméabilité apparente,

R : le diamètre du tube digestif à un endroit définit.

Lorsque $A_n = 1$, la biodisponibilité absolue est approximativement de 85%. Dès que $A_n > 1$, le temps de résidence moyen dans l'intestin est supérieur au temps de d'absorption moyen et la biodisponibilité est complète (119).

II 1 1 b) Le paramètre de dissolution D_n

IL est déterminé à partir d'une forme multi-particulaire en considérant que le phénomène de diffusion contrôle la dissolution selon le modèle d'Higuchi (120).

Le modèle est le suivant :

$$D_n = \frac{T_{res}}{T_{dis}} \quad \text{Équation 18}$$

Avec :

T_{dis} : le temps de dissolution moyen, il est défini par la relation suivante :

$$T_{dis} = \frac{r^2 \rho}{3DC_s} \quad \text{Équation 19}$$

Avec :

r : le diamètre moyen des particules de SA ;

ρ : la densité des particules au sein du système matriciel ;

D : la constante de diffusion ;

C_s : la solubilité.

Il vient :

$$D_n = \frac{3DC_s}{r^2\rho} T_{res} \quad \text{Équation 20}$$

D_n correspond au rapport du temps de résidence moyen au niveau de l'intestin sur le temps de dissolution moyen de la SA. Les composés peu solubles ont des valeurs de $D_n < 1$;

II 1 1 c) Le paramètre de dose D_0

Il est défini comme le ratio de la dose M_0 au volume d'eau pris lors de l'administration V_0 (250 ml) et de la solubilité C_s .

$$D_0 = \frac{M_0}{C_s V_0} \quad \text{Équation 21}$$

II 1.2 La description des classes.

II 1 2 a) La classe I

Intègre les produits à haute perméabilité (A_n élevée) et haute solubilités (D_n élevée). Le seul facteur limitant est le temps de vidange gastrique. D'un point de vue pharmacocinétique, leur vitesse d'absorption est supérieure à leur vitesse d'élimination.

Cependant, lorsque la dissolution est très rapide (85 % de dissolution en 15 minutes), il est difficile de déterminer un profil de dissolution *in vitro* sur plusieurs points. Ce type de produit est un bon candidat pour des formulations à libération immédiate ou modifiée,

II 1 2 b) La classe II

Cette classe est caractérisée par des substances à faible solubilité (D_n faible) et haute perméabilité (A_n élevée). La solubilité étant le facteur limitant du processus d'absorption, la vitesse d'absorption est plus lente et se déroule pendant une période de temps plus importante que les substances de la classe I. Le développement de formulations adaptées peut être plus complexe par rapport à la classe I, des techniques sont utilisées pour augmenter la solubilité (nanoparticules, microémulsions, formulations lipidiques) (121).

Dans certains cas, par exemple la griséofulvine, le volume du fluide gastrique et intestinal n'est pas suffisant pour la dissoudre, sachant que le volume de fluide entrant dans le TD est de 5 à 10 litres par 24 heures, et 500 mg de cette substance nécessite 33 litres pour se dissoudre (47), le volume nécessaire à la dissolution de la griséofulvine dans l'intestin sera donc insuffisant et en conséquence, la biodisponibilité sera faible. Cette dernière peut être grandement améliorée

en diminuant la dose ou en augmentant sa solubilité par la diminution de taille des particules qui a pour objectif d'augmenter la surface de contact particule/solvant.

Pour ces molécules, il a été décrit une forte corrélation entre les cinétiques de dissolution *in vitro* et l'absorption *in vivo* qui peuvent être définies sur un temps relativement long et permettent d'obtenir plusieurs points de prélèvements ;

II 1 2 c) La classe III

Cette classe regroupe des SA dont la solubilité est élevée (D_n élevée) et la perméabilité faible (A_n faible). L'absorption est très variable en vitesse et en quantité. Cette variabilité est attribuée i) au temps de vidange gastrique, ii) à la vitesse de transit au sein du TD et à son contenu, ii) à la perméabilité membranaire. La perméabilité étant le facteur limitant, il est difficile dans ce cas d'établir une relation entre la dissolution *in vitro* et l'absorption *in vivo*. Les problèmes de perméabilité ne peuvent que rarement être solutionnés par un développement de formulation spécifique. La biodisponibilité peut être cependant améliorée par synthèse de composés dérivés plus lipophiles, ou sous forme de prodrogue. C'est le cas notamment de l'Acyclovir qui est administrée sous forme de prodrogue (Valaciclovir) (122);

II 1 2 d) La classe IV

Cette classe recouvre les produits dont la solubilité et la perméabilité sont faibles (A_n et D_n faibles). Elle présente des problèmes importants en termes de solubilité et d'absorption et donc des problèmes de biodisponibilité. Les techniques utilisées pour améliorer la biodisponibilité de cette classe, combinent les techniques de la classe II et la classe III.

II 1.3 Les applications de la classification BCS

La classification BCS peut être utilisée i) dans les phases précoces de développement pour la sélection d'une substance candidate, ii) pendant la mise au point d'une nouvelle formulation et iii) pour les applications réglementaires (121). Dans les phases précoces de développement, la classification permet de définir des stratégies pour le développement de nouvelles formulations adaptées ainsi que les stratégies réglementaires.

La classification biopharmaceutique permet aussi de définir les exemptions de biodisponibilité qui consistent à ne pas effectuer d'études de bioéquivalence chez des volontaires sains mais à utiliser en substitution la dissolution *in vitro* comme critère de bioéquivalence dans le cadre défini par les différentes réglementations (par exemple, lors de transpositions d'échelles, de

changements de sites, de modifications de la formulation...). Cette exemption peut s'appliquer pour des formes à libération immédiate contenant des produits de classe I.

Un produit est considéré à libération rapide lorsque au moins 85% de la quantité de SA présente dans la formulation est dissoute en 15 ou 30 minutes en utilisant un appareil à paniers tournants ou à palettes tournantes et dans des milieux de différents pH simulant le tractus gastrointestinal (HCl 0,1N ou fluide gastrique simulé, tampon pH 4,5 et 6,8 ou milieu intestinal simulé).

II.2 Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System (BDDCS)

La classification BCS s'applique à des molécules qui ne subissent pas de métabolisation lors de l'absorption intestinale et pas d'effet de premier passage hépatique (métabolisation hépatique).

En 1995, Wu et Benet (123) effectuent une revue de la littérature relative à la classification BCS de différentes substances. Ils observent que les SA à forte perméabilité (classe I et II) sont principalement éliminées sous forme métabolisées et les SA à faible perméabilité (classes III et IV) sont principalement éliminées sous formes inchangées. Ils suggèrent que la prise en compte des systèmes de transports d'absorption et d'efflux au niveau des cellules du tractus digestif et des hépatocytes ainsi que la voie d'élimination de la SA (rénale/biliaire) sont plus pertinents que la simple perméabilité calculée à partir des transferts de masses. Ils proposent une nouvelle classification appelée « Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System » (BDDCS) fondée sur la solubilité et la métabolisation. (Tableau 7). La métabolisation est considérée élevée à partir de 70% et faible dans le cas contraire

<i>Classe</i>	<i>Solubilité</i>	<i>Métabolisme</i>
<i>I</i>	Élevée	Élevée
<i>II</i>	Faible	Élevée
<i>III</i>	Élevée	Faible
<i>IV</i>	Faible	Faible

Tableau 7 La classification BDDCS

Pour les composées de la classe I, l'absorption des molécules est principalement passive et fonction de leur caractère lipophile. La solubilité est élevée et la mise à disposition des molécules rapide. Compte tenu de ces caractéristiques, il y a saturation des systèmes enzymatiques de transporteurs d'absorption et d'efflux qui n'a que peu d'effets en termes de biodisponibilité et de cinétique d'absorption.

L'absorption des molécules de la classe II est principalement passive et fonction de leur caractère lipophile. La solubilité est faible et la mise à disposition des molécules lente. En conséquence, il y a non saturation des systèmes transporteurs qui peuvent, dans ce cas, jouer un rôle important sur la biodisponibilité et la cinétique d'absorption.

Pour les composées des classe III et IV la perméabilité est faible et l'absorption des molécules nécessitent des systèmes transporteurs qui jouent donc un rôle majeur dans la biodisponibilité et la cinétique d'absorption.

II.3 DCS

Cependant, afin de mieux estimer la capacité de développement d'une nouvelle SA, Butler et Dressman en 2010 ont fait évoluer la classification BCS vers la classification DCS (Developability Classification System). Par rapport au BCS, la principale modification apportée par le DCS est la partition de la classe II en IIa et IIb. (Fig.34)

Il apparait alors que l'absorption des substances IIa est limitée par leur vitesse de dissolution plutôt que par leur solubilité. L'absorption complète de ces SA peut être obtenue par une formulation standard, en portant une attention particulière aux facteurs influençant la libération de la SA, tels que la taille des particules, la mouillabilité ou la surface développée.

L'absorption des substances IIb est limitée par leur solubilité et nécessite en revanche la mise en œuvre de formulations plus complexes telles que des formes pré-dissoutes dont font partie les formulations lipidiques.

Ces systèmes de classification des SA mettent en avant le fait que l'amélioration de la solubilité des SA est un objectif clé des phases de développement galénique.

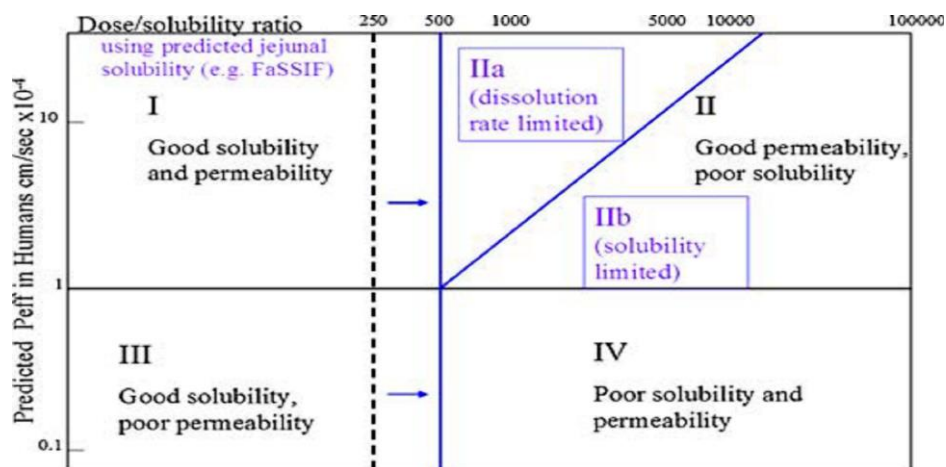


Figure 34 Developability Classification System (DCS)(124).

III. Conclusion :

Comme cela a été illustré dans ce chapitre, la biodisponibilité est définie comme la quantité de produit qui atteint la circulation générale et la vitesse à laquelle se produit ce phénomène. De nombreux paramètres interviennent sur la biodisponibilité et peuvent la limiter ou la modifier, ils sont liés i) à la substance active et à ses propriétés physico chimiques, ii) aux propriétés pharmacocinétiques de la substance active, iii) aux conditions physiologiques au niveau du tractus gastro-intestinal et iv) à la matrice d'administration.

La maîtrise de la biodisponibilité nécessite une connaissance approfondie des propriétés de la SA et des caractéristiques de la matrice d'administration. La connaissance de l'ensemble des paramètres qui peuvent influencer la biodisponibilité peut permettre de prédire la biodisponibilité d'un produit, d'un mélange de produit ou d'une matrice spécifique d'administration. Ainsi les données de solubilité, de dissolution et de perméabilité sont une première approche permettant de comparer des substances actives ou des formulations sur des critères pertinents vis à vis de leur comportement *in vivo* et le risque de « bioéquivalence ».

IV. Références

1. Règlement (UE) n ° 231/2012 de la Commission du 9 mars 2012 établissant les spécifications des additifs alimentaires énumérés aux annexes II et III du règlement (CE) n ° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. OJ L, 32012R0231 mars 22, 2012.
2. Aiache J, Cardot J, Beyssac E. Initiation à la connaissance du médicament: pharmacie, [1re année. 5e édition. Paris: Masson; 2008.
3. Aiache J, Cardot J, Beyssac E. Formes à libération modifiée destinés aux voies orales et parentérale. 3e édition. Vol. 4. Paris: Masson; 2007.
4. PHARMACOMedicale.org. Schéma général [Internet]. <https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/pharmacocinetique/36-etapes-du-devenir-du-medicament>
5. Aiache J PL. Traité de biopharmacie et pharmacocinétique. 3ème édition, Collectif, Jean-Marc Aiache, Pierre-Paul Leblanc, Jean-Guy Besner. Vol 67. Vigot; 1997, 396p.
6. Rowland M, Tozer TN, Rowland M. Distribution kinetics. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: concepts and applications (page 561-602). 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins; 2011. 839 p.
7. Hall LW, Lagerweij E, Nolan AM, Sear JW. Disposition of propofol after medetomidine premedication in beagle dogs. J Vet Anaesth. 1 juill 1997;24(1):23-9.
8. Rowland M, Tozer TN, Rowland M. Elimination. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: concepts and applications (page 111-157). 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins; 2011. 839 p.
9. Rowland M, Tozer TN, Rowland M. Fundamental concepts and terminology.. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: concepts and applications (page 17-45). 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins; 2011. 839 p.
10. Golan DE. Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy (page 31-48). Lippincott Williams & Wilkins; 2008. 1012 p.
11. Golan DE. Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy (page 49-61). Lippincott Williams & Wilkins; 2008. 1012 p.
12. CHAMBIN O. Cours IFSI - Année 2018/2019. Initiation à la Pharmacie Galénique, Odile CHAMBIN - [Internet]. ifsidijon.info/v2/wp-content/uploads/2018/10/Pharmacie-galénique-Mme-CHAMBIN.pdf
13. Heaney RP. Factors Influencing the Measurement of Bioavailability, Taking Calcium as a Model. J Nutr. 1 avr 2001;131(4):1344S-1348S.

14. Srinivasan VS. Bioavailability of Nutrients: A Practical Approach to In Vitro Demonstration of the Availability of Nutrients in Multivitamin-Mineral Combination Products. *J Nutr.* 1 avr 2001;131(4):1349S-1350S.
15. Rowland, Malcolm. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: concepts and applications* / Malcolm Rowland, Thomas N. Tozer. 4th ed. United States: Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins, c2011.;
16. Wachter VJ, Salphati L, Benet LZ. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 mars 2001;46(1-3):89-102.
17. Cornaire G, Woodley JF, Houin G. Influence des transporteurs d'efflux sur le passage intestinal des médicaments. *Rev Fr Lab.* 1 janv 2002;2002(339):33-7.
18. Dr SALEH. Introduction Pharmacocinétique: Étude du devenir d'un principe actif (PA) contenu dans un médicament dans l'organisme. 4 phases: Absorption Distribution Métabolisme Elimination. cours en ligne [Internet]. <https://slideplayer.fr/slide/5392734/>
19. Lamand V. principes pharmacocinétiques | Biodisponibilité IFSI croix rouge française [Internet]. <https://fr.scribd.com/presentation/265636762/principes-pharmacocinétiques>
20. EMEA. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. London, 14 December 2000 CPMP/EWP/QWP/1401/98. 2018.
21. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* mars 1995;12(3):413-20.
22. Grabowski; GJTNPASR. *Principles of Anatomy and Physiology* by Gerard J. Tortora. 7th Revised edition edition. John Wiley & Sons Inc; 1993.
23. Sabri A. Association Briochine de Chirurgie Digestive - Leçon sur notre système digestif | Anatomie du corps humain. [Internet]. <https://www.pinterest.com/pin/486740672213538534/>
24. Russell TL, Berardi RR, Barnett JL, Dermentzoglou LC, Jarvenpaa KM, Schmaltz SP, et al. Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, North American men and women. *Pharm Res.* févr 1993;10(2):187-96.
25. Hörter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 mars 2001;46(1-3):75-87.
26. Gillian P, Richards DA. *Physiologie humaine et physiopathologie* | Elsevier Masson. 1ère Edition. Elsevier Masson; 2019, 992 p. [Internet] <https://www.elsevier-masson.fr/physiologie-humaine-et-physiopathologie-9782294758195.html>
27. Unisciel C en ligne. *Physiologie des systèmes intégrés, les principes et fonctions - Anatomie 2020* [Internet]. <http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/grain6b1.html>
28. Pr. LAALAOUI A. *Physiologie de l'appareil digestif Absorption intestinale des nutriments - Slide 41* [Internet]. 2017 [cité 10 févr 2020]. Disponible sur:

- <https://docplayer.fr/42774116-Physiologie-de-l-appareil-digestif-absorption-intestinale-des-nutriments.html>
29. Ladopoulos T, Giannaki M, Alexopoulou C, Proklou A, Pediaditis E, Kondili E. Gastrointestinal dysmotility in critically ill patients. *Ann Gastroenterol*. 2018;31(3):273-81.
 30. Isolauri E, Kirjavainen P, Salminen S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut*. mai 2002;50(Suppl 3):iii54-9.
 31. Marieb EN. *Biologie humaine. Principes d'anatomie et de physiologie* 8e édition - 8ème. 2008 631p. [Internet]. <https://www.decitre.fr/livres/biologie-humaine-9782761327275.html>
 32. Ganong WF, Jobin M. *Physiologie médicale*. Bruxelles: De Boeck; 2005.
 33. Slideplayer. Module I Le système digestif - ppt vidéo online télécharger 2020 [Internet]. <https://slideplayer.fr/slide/3330745/>
 34. Liberal Dictionary. peristalsis 2019. [Internet]. <https://www.liberaldictionary.com/peristalsis/>
 35. Gaucher G, Satturwar P, Jones M-C, Furtos A, Leroux J-C. Polymeric micelles for oral drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. oct 2010;76(2):147-58.
 36. Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. *Dig Dis Sci*. 1 mars 1986;31(3):314-21.
 37. Bernier J, J Adrian J, Vidon N. *Les Aliments dans le tube digestif*. Doin. Paris; 1998. 468 p. [Internet] <https://www.leslibraires.fr/livre/10432410-les-aliments-dans-le-tube-digestif-bernier-j-j-adrian-j-vidon-n--doin>
 38. Jean-Claude Rambaud J-PB, Gérard Corthier BF. *Flore microbienne intestinale. Physiologie et pathologie digestives*, Libbey Eurotext; [Internet]. <https://www.decitre.fr/livres/flore-microbienne-intestinale-9782742005123.html>
 39. MC Verdier-Lorne. *Devenir du médicament dans l'organisme*. 2010-2011; Service de Pharmacologie biologique Faculté de Médecine. [Internet] https://natyinfirmiere.files.wordpress.com/2010/10/rennes20100907025550mverdierdevenir_med_2010_dcem1.pdf.
 40. Shargel L, McGraw-Hill Education. *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*, 7th éd. New York McGraw-Hill Education; 2016.
 41. Sugano K, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, Di L, et al. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov*. août 2010;9(8):597-614.
 42. Dobson PD, Kell DB. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nat Rev Drug Discov*. mars 2008;7(3):205-20.

43. Sarmiento B. Concepts and Models for Drug Permeability Studies. In: Concepts and Models for Drug Permeability Studies - 1st Edition. 1st Edition. 2015.
44. Bertram G. Katzung. Basic & Clinical Pharmacology, 7th éd. Appleton & Lange; 2000, 1232p.
45. Elsevier-Masson. Les fondamentaux de la pathologie digestive, Partie I : Les organes - Chapitre 4: Côlon - Page 2/21 CDU-HGE/Editions 2014. [Internet]. <https://www.snfge.org/content/les-fondamentaux-de-la-pathologie-digestive>
46. Minko T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. Adv Drug Deliv Rev. 3 mars 2004;56(4):491-509.
47. Roudier B. Les sources de variabilité dans les corrélations vivo-vitro prospectives. Spécialité : Sciences Pharmaceutiques: Université Clermont Auvergne; 2014: [Internet]. <http://www.theses.fr/s117438>
48. Barbour NP, Lipper RA. Introduction to Biopharmaceutics and its Role in Drug Development. In: Krishna R, Yu L, éditeurs. Biopharmaceutics Applications in Drug Development. Boston, MA: Springer US; 2008. p. 1-25.
49. Finholt P, Solvang S. Dissolution kinetics of drugs in human gastric juice--the role of surface tension. J Pharm Sci. août 1968;57(8):1322-6.
50. Aguiar AJ, Krc J, Kinkel AW, Samyn JC. Effect of polymorphism on the absorption of chloramphenicol from chloramphenicol palmitate. J Pharm Sci. 1 juill 1967;56(7):847-53.
51. Andrés A et al. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts. Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci. 9 mai 2015;76:181-91.
52. Jani PU, Florence AT, McCarthy DE. Further histological evidence of the gastrointestinal absorption of polystyrene nanospheres in the rat. Int J Pharm. 20 août 1992;84(3):245-52.
53. Jambhekar SS, Breen PJ. Drug dissolution: significance of physicochemical properties and physiological conditions. Drug Discov Today. déc 2013;18(23-24):1173-84.
54. Aprahamian M, Michel C, Humbert W, Devissaguet JP, Damge C. Transmucosal passage of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as a new drug carrier in the small intestine. Biol Cell. 1987;61(1-2):69-76.
55. Pharmacorama. Traversée des membranes. Pharmacorama. 2016 [Internet] <https://www.pharmacorama.com> /pharmacologie/medicaments-generalite/pharmacocinetique /traversee-membranes/
56. McClements DJ, Li F, Xiao H. The Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme: Classifying Nutraceuticals According to Factors Limiting their Oral Bioavailability. Annu Rev Food Sci Technol. 2015;6:299-327.
57. Mamadou G Bruno. Evaluation de l'impact des formulations pharmaceutiques sur l'absorption intestinale des molécules actives mesurée au moyen des Chambres d'Ussing.

- Université Paris Saclay; 2016. [Internet] <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01446840/document>.
58. Dressman JB. Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment, Second Edition, New York: CBC press; 2019
 59. Palm K, Stenberg P, Luthman K, Artursson P. Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm Res.* mai 1997;14(5):568-71.
 60. Noyes AA, Whitney WR. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J Am Chem Soc.* 1 déc 1897;19(12):930-4.
 61. Wagner JG, Nelson E. Kinetic analysis of blood levels and urinary excretion in the absorptive phase after single doses of drug. *J Pharm Sci.* nov 1964;53:1392-403.
 62. Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *Int J Pharm.* 14 sept 2006;321(1-2):1-11.
 63. Siepmann J, Siepmann F. Mathematical modeling of drug dissolution. *Int J Pharm.* 30 août 2013;453(1):12-24.
 64. McCarthy LG, Bradley G, Sexton JC, Corrigan OI, Healy AM. Computational fluid dynamics modeling of the paddle dissolution apparatus: Agitation rate, mixing patterns, and fluid velocities. *AAPS PharmSciTech.* 1 juin 2004;5(2):50-9.
 65. Scholz A, Kostewicz E, Abrahamsson B, Dressman JB. Can the USP paddle method be used to represent in-vivo hydrodynamics? *J Pharm Pharmacol.* avr 2003;55(4):443-51.
 66. Khoury N, Mauger JW, Howard S. Dissolution Rate Studies from a Stationary Disk/Rotating Fluid System. *Pharm Res.* 1 août 1988;5(8):495-500.
 67. Esbelin B, Beyssac E, Aiache J-M, Shiu GK, Skelly JP. A new method of dissolution in vitro, the "bio-dis" apparatus: Comparison with the rotating bottle method and in vitro: In vivo correlations. *J Pharm Sci.* 1991;80(10):991-4.
 68. Nicklasson M, Orbe A, Lindberg J, Borgå B, Magnusson A-B, Nilsson G, et al. A collaborative study of the in vitro dissolution of phenacetin crystals comparing the flow through method with the USP Paddle method. *Int J Pharm.* 20 mars 1991;69(3):255-64.
 69. Nicklasson M, Wennergren B, Lindberg J, Persson C, Ahlgren R, Palm B, et al. A collaborative in vitro dissolution study using the flow-through method. *Int J Pharm.* 1 juill 1987;37(3):195-202.
 70. Wähling C, Schröter C, Hanefeld A. Flow-Through Cell Method and IVIVR for Poorly Soluble Drugs. 2011;
 71. Brown CK, Chokshi HP, Nickerson B, Reed RA, Rohrs BR, Shah PA. Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. 1 janv 2004;
 72. Brochure de présentation de l'appareil USP 4 DFZ II - ERWEKA GmbH [Internet]. <https://www.erweka.com/products/dissolution-testers/flow-through-cell-usp-4.html>

73. Vertzoni M, Fotaki N, Kostewicz E, Stippler E, Leuner C, Nicolaides E, et al. Dissolution media simulating the intraluminal composition of the small intestine: physiological issues and practical aspects. *J Pharm Pharmacol.* avr 2004;56(4):453-62.
74. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res.* janv 1998;15(1):11-22.
75. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res.* juill 2008;25(7):1663-76.
76. Bruschi ML, éditeur. Mathematical models of drug release. In: *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Woodhead Publishing; 2015, p 63-86.
77. Jens T, Carstensen T & F. *Modeling and Data Treatment in the Pharmaceutical Sciences* 1st éd. New York; 1996
78. Souliman S. Utilisation d'un système digestif artificiel pour établir des corrélations in vitro /in vivo à jeun et en présence d'alimentation : application aux formes pharmaceutiques solides orales. [Clermont-Ferrand, France.]: Université Clermont Auvergne; 2006.
79. Tyle P. Controlled drug delivery: Fundamentals and applications. *J Pharm Sci.* 1 janv 1988;77(1):94.
80. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic Modeling On Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems. 2010;67(3):7.
81. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci.* 1 déc 1963;52(12):1145-9.
82. Desai SJ, Singh P, Simonelli AP, Higuchi WI. Investigation of Factors Influencing Release of Solid Drug Dispersed in Inert Matrices IV: Some Studies Involving the Polyvinyl Chloride Matrix. *J Pharm Sci.* 1 nov 1966;55(11):1235-9.
83. Simionato LD, Petrone L, Baldut M, Bonafede SL, Segall AI. Comparison between the dissolution profiles of nine meloxicam tablet brands commercially available in Buenos Aires, Argentina. *Saudi Pharm J.* 1 mai 2018;26(4):578-84.
84. Yuksel N, Kanık AE, Baykara T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. *Int J Pharm.* 19 nov 2000;209(1):57-67.
85. Gohel MC, Sarvaiya KG, Shah AR, Brahmabhatt BK. Mathematical Approach for the Assessment of Similarity Factor Using a New Scheme for Calculating Weight. *Indian J Pharm Sci.* 2009;71(2):142-4.
86. Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2014;13(2):155-71.

87. Polli JE. In vitro studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic in vivo studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms. *AAPS J.* juin 2008;10(2):289-99.
88. Emami J. In vitro - in vivo correlation: from theory to applications. *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Soc Can Sci Pharm.* 2006;9(2):169-89.
89. Sarmiento B, Andrade F, Silva SB da, Rodrigues F, Neves J das, Ferreira D. Cell-based in vitro models for predicting drug permeability. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 1 mai 2012;8(5):607-21.
90. Pelkonen O, Boobis AR, Gundert-Remy U, Action COST B15 Working Group 1. In vitro prediction of gastrointestinal absorption and bioavailability: an experts' meeting report. *Eur J Clin Pharmacol.* nov 2001;57(9):621-9.
91. Fritsch C, Orian-Rousseau V, Lefebvre O, Simon-Assmann P, Reimund JM, Duclos B, et al. Characterization of Human Intestinal Stromal Cell Lines: Response to Cytokines and Interactions with Epithelial Cells. *Exp Cell Res.* 1 mai 1999;248(2):391-406.
92. Fogh J, Orfeo T, Tiso J, Sharkey FE. Establishment of human colon carcinoma lines in nude mice. *Exp Cell Biol.* 1979;47(2):136-44.
93. Hidalgo IJ. Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Curr Top Med Chem.* nov 2001;1(5):385-401.
94. Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M. In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol.* juill 2007;23(4):241-56.
95. Maubon N, Le Vee M, Fossati L, Audry M, Le Ferrec E, Bolze S, et al. Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundam Clin Pharmacol.* déc 2007;21(6):659-63.
96. Ungell A-LB. Caco-2 replace or refine? *Drug Discov Today Technol.* déc 2004;1(4):423-30.
97. Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc.* sept 2007;2(9):2111-9.
98. Lea T. Caco-2 Cell Line. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., éditeurs. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models.* Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 103-11.
99. Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., éditeurs. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models.* Cham (CH): Springer; 2015.
100. Knipp GT, Ho NF, Barsuhn CL, Borchardt RT. Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. *J Pharm Sci.* oct 1997;86(10):1105-10.

101. Tang AS, Chikhale PJ, Shah PK, Borchardt RT. Utilization of a human intestinal epithelial cell culture system (Caco-2) for evaluating cytoprotective agents. *Pharm Res.* nov 1993;10(11):1620-6.
102. Nerurkar MM, Burton PS, Borchardt RT. The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system. *Pharm Res.* avr 1996;13(4):528-34.
103. Wachter VJ, Salphati L, Benet LZ. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 mars 2001;46(1-3):89-102.
104. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2 nov 2015;111:A3.B.1-A3.B.3.
105. Antunes F, Andrade F, Araújo F, Ferreira D, Sarmiento B. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 1 avr 2013;83(3):427-35.
106. Balimane PV, Chong S, Morrison RA. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J Pharmacol Toxicol Methods.* août 2000;44(1):301-12.
107. Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, et al. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci.* janv 1999;88(1):28-33.
108. Grès MC, Julian B, Bourrié M, Meunier V, Roques C, Berger M, et al. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm Res.* mai 1998;15(5):726-33.
109. Roeselers G, Ponomarenko M, Lukovac S, Wortelboer HM. Ex vivo systems to study host-microbiota interactions in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* févr 2013;27(1):101-13.
110. Acra SA, Ghishan FK. Methods of Investigating Intestinal Transport. *J Parenter Enter Nutr.* 1991;15(3):93S-98S.
111. Aulton ME. Ashford, M., Assessment of biopharmaceutical properties, in Aulton's *Pharmaceutics: The design and manufacture of medicines*, 3rd Edition, 2007. p. 308-313. 3rd Edition. Edinburgh; New York: Churchill Livingstone; 2007.
112. Sigma A. Product Information Sheet -Krebs-Henseleit Buffer Modified K3753 [Internet]. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/k3753>
113. FDA-BCS-2000. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Guidance for Industry. 2017.

114. ICH M9 guideline biopharmaceutics classification system based biowaivers EMA/CHMP/ICH/493213/2018. 2018.
115. Particle Sciences TB. Biopharmaceutical Classification System and Formulation Development. LLS Health CDMO, 2011, [Internet]. <https://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2011/biopharmaceutical-classification-system.html>
116. FDA-SUPAC-IR-1995. Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Scale-Up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation. 1995.
117. Löbenberg R, Amidon GL. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm.* 3 juill 2000;50(1):3-12.
118. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 15 janv 1997;23(1):3-25.
119. Oh DM, Curl RL, Amidon GL. Estimating the fraction dose absorbed from suspensions of poorly soluble compounds in humans: a mathematical model. *Pharm Res.* févr 1993;10(2):264-70.
120. Dressman JB, Fleisher D. Mixing-tank model for predicting dissolution rate control or oral absorption. *J Pharm Sci.* févr 1986;75(2):109-16.
121. Lennernäs H, Abrahamsson B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *J Pharm Pharmacol.* 2005;57(3):273-85.
122. Han HK, Oh DM, Amidon GL. Cellular uptake mechanism of amino acid ester prodrugs in Caco-2/hPEPT1 cells overexpressing a human peptide transporter. *Pharm Res.* sept 1998;15(9):1382-6.
123. Wu C-Y, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res.* janv 2005;22(1):11-23.
124. Butler JM, Dressman JB. The Developability Classification System: Application of Biopharmaceutics Concepts to Formulation Development. *J Pharm Sci.* 1 déc 2010;99(12):4940-54.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III

Application de la classification biopharmaceutique des médicaments à des ingrédients nutraceutiques hydrosolubles :
caféine et glucosamine

I. Introduction

Proposé par Gordon Amidon en 1995 (1), créé par la FDA (2) puis approuvé par l'EMA (3) et maintenant décrit dans les procédures ICH (ICH M9) (4), la classification biopharmaceutique permet de classer les composés selon leur solubilité aqueuse et leur perméabilité intestinale. C'est un des outils de pronostic les plus efficaces facilitant le développement des formes pharmaceutiques et permettant d'évaluer l'impact de la substance active et/ou de la formulation sur la biodisponibilité. La classification biopharmaceutique, incluant la dissolution de la forme à libération immédiate développée, prend en compte les deux facteurs majeurs gouvernant le taux et l'ampleur de l'absorption d'une molécule candidate : la dissolution et la perméabilité intestinale.

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

- BCS classe I : solubilité élevée, perméabilité élevée : ces composés se dissolvent très bien dans le tractus gastrointestinal et sont très bien absorbés.
- BCS classe II : faible solubilité, perméabilité élevée : ces composés présentent en général une absorption dépendante du taux de dissolution.
- BCS classe III : solubilité élevée, faible perméabilité : ces composés présentent en général une absorption dépendante du taux de perméabilité.
- BCS classe IV : faible solubilité et faible perméabilité : ces composés présentent des problèmes importants de biodisponibilité et le facteur limitant peut-être la solubilité ou la perméabilité ou une combinaison négative de ces deux paramètres.

La détermination de la classe biopharmaceutique d'un composé nécessite l'évaluation de la solubilité à l'équilibre d'une substance, dans des conditions physiologiques de pH. Le profil de solubilité de la substance, en fonction du pH, devrait être déterminé à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ dans des solutions tampons avec une gamme de pH de 1,0 à 6,8, pour une quantité de substance correspondant à la plus forte dose unique administrée (ICH M9) (4). La classe de solubilité est ainsi déterminée en calculant le volume d'un milieu aqueux suffisant pour dissoudre la dose la plus élevée dans la gamme de pH de 1,0 à 6,8. Une substance est classifiée comme fortement soluble lorsque la dose la plus élevée se solubilise soluble dans 250 mL ou moins d'un milieu aqueux dans une gamme de pH de 1,0 à 6,8.

La classe de perméabilité d'une substance peut être déterminée chez l'homme en utilisant le bilan de matière, la biodisponibilité absolue, ou les approches de perfusion intestinale. Les

méthodes recommandées n'impliquant pas l'homme incluent la perfusion intestinale *in vivo* ou *in situ* dans un modèle animal approprié (par exemple le rat), et/ou les méthodes *in vitro* de perméabilité en utilisant les tissus intestinaux excisés, ou les monocouches de cellules épithéliales appropriées. En l'absence de preuve suggérant l'instabilité dans l'appareil gastro-intestinal, un composé est considéré comme fortement perméable lorsque la quantité absorbée chez l'homme est égale à 85% ou plus d'une dose administrée. Compte tenu des relations mises en évidence entre le coefficient de perméabilité effective chez l'homme et la fraction de dose absorbée et la relation entre le coefficient de perméabilité apparente (méthode Caco-2) et la fraction de dose absorbée, une valeur limite du coefficient de perméabilité a été définie pour classer les substances (5). Lorsque la valeur du coefficient de perméabilité effective est supérieure à la valeur de celui de la substance de référence (Métoprolol), soit 1.10^{-4} cm/s, le produit est considéré comme très perméable. Dans le cas de la perméabilité apparente, le produit est considéré comme très perméable si la valeur du coefficient de perméabilité effective est supérieure 5.10^{-6} cm/s, valeur de référence.

Dans ce chapitre, les techniques de mesure permettant de situer une molécule dans la classification BCS ont été appliquées sur deux molécules nutraceutiques choisies comme modèle : la caféine et la glucosamine. La caféine peut être considérée comme une substance active médicamenteuse ou une substance d'intérêt nutraceutique en fonction de la dose administrée et la glucosamine est une substance hydrosoluble existant sous différents sels. La solubilité est déterminée par la méthode à l'équilibre et les essais de dissolution *in vitro* ont été aussi effectués pour mesurer l'impact des caractéristiques intrinsèques du produit sur la classe biopharmaceutique. La perméabilité a été déterminée par deux méthodes, la méthode de l'intestin isolé permettant de calculer la perméabilité effective et la méthode Caco-2 permettant de déterminer la perméabilité apparente. L'étude de ces deux produits permet à la fois de valider la pertinence des méthodes utilisées pour classer ces produits dans la classification biopharmaceutique et d'exemplifier la méthodologie de la détermination de la classe biopharmaceutique appliquée à des molécules nutraceutiques.

II. Produits étudiés

II.1 Caféine

La caféine est la drogue légale la plus consommée dans le monde (6). Présente naturellement dans de nombreuses plantes, elle est facilement disponible pour les particuliers et facile à consommer régulièrement. Elle est notamment présente dans les graines du caféier et du guarana ainsi que dans les feuilles de yerba maté et du théier (7). Elle peut être obtenue par synthèse, par une méthode simple, rapide, et efficace à partir de la diméthylurée et de l'acide malonique (8).

Elle peut influencer plusieurs facteurs qui affectent la santé et le bien-être. La consommation de caféine dose-dépendante, stimule la thermogénèse (production de chaleur dans l'organisme par l'augmentation du métabolisme cellulaire), augmente la dépense énergétique, la pression artérielle et diminue la fréquence cardiaque. La caféine semble avoir un effet sur l'humeur perçue, la concentration et l'excitation chez les consommateurs (6).

La caféine, aussi nommée « théine », « méthylthéobromine » ou « 1,3,7-triméthylxanthine » est un alcaloïde de la famille des méthylxanthines (qui regroupe la théobromine et la théophylline).

C'est une molécule de 194,19 g/mol de masse moléculaire, sa formule brute est : $C_8H_{10}N_4O_2$, avec un LogP de (-0,07) et une solubilité de 21,6 mg/mL (dans l'eau: à 25 °C) (9).

Selon le journal de l'EFSA (10), la caféine peut être consommée à une dose maximale de 400 mg/jour sans qu'elle soit néfaste pour la santé.

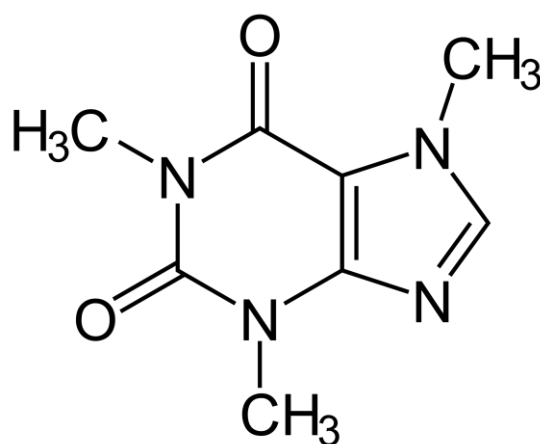


Figure 1 Structure de la caféine

Deux échantillons de caféine de qualité alimentaire « food grade » ont été étudiés, ils proviennent de deux fournisseurs différents et présentent des spécifications différentes regroupées dans le tableau 1. L'un est d'origine synthétique et l'autre d'origine naturelle et leur teneur est différente puisque l'extrait naturel titre seulement 10% comparativement au produit synthétique qui titre 99%.


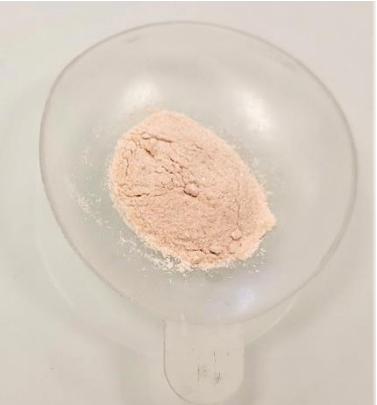
Echantillon	Caf-01	Caf-02
Spécification	<i>Anhydre</i>	<i>Extrait sec de guarana</i>
Pureté	<i>99%</i>	<i>10%</i>
Origine	<i>Synthétique</i>	<i>Naturelle</i>
Solvant d'extraction	-	<i>Eau</i>
Solubilité	<i>>20mg/mL</i>	<i>>20mg/mL</i>
Composition	<i>Caféine anhydre 99%</i>	<i>Extrait sec de gaines de guarana (40%), maltodextrin, gomme arabique, dioxyde de silicium.</i>
Apparence	 <i>Poudre blanche cristalline</i>	 <i>Poudre beige/marron</i>

Tableau 1 Spécifications des échantillons de caféine testés

II.2 Glucosamine

Les glycosaminoglycanes tels que la glucosamine et la chondroïtine sont des composés naturels considérés comme des SYSADOA (Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis) ou médicaments à action lente symptomatique pour l'arthrose. De plus, certains de ces composés ont également démontré un potentiel de modification de la maladie, basé sur la mesure du rétrécissement de l'espace articulaire par radiographie (11).

Néanmoins, l'utilisation de ces produits ainsi que la pertinence de leur efficacité clinique sont constamment débattues car ils pourraient être vendus «en vente libre» comme compléments alimentaires notamment en Amérique du Nord, alors qu'ils sont commercialisés en tant que médicaments homologués en Europe (11).

La structure « de base » de la glucosamine est la « D-glucosamine » qui est un glucide de la famille des osamines (sucre aminé) dont la structure est basée sur le glucose (12), elle constitue un composant important de plusieurs polysaccharides comme la chitine ainsi qu'un constituant majeur de la cuticule ou carapace des arthropodes (insectes, crustacés...).

La glucosamine est naturellement produite dans le corps humain comme précurseur des lipides glycosylés, des protéines, des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes. Elle peut être obtenue par extraction de la chitine des carapaces de crustacés suivie d'hydrolyse alcaline et acide (13). L'extraction de glucosamine à partir des sous-produits des crustacés par hydrolyse chimique ou enzymatique présente certains désavantages (allergie, variabilité dans la composition, impact environnemental négatif) et de la glucosamine provenant de source non animale est produite à partir de fractions de champignons ou à partir de fructose et ammonium ou de plantes et d'extraits de plante (maïs) (14).

C'est une molécule de 179,172 g/mol de masse moléculaire, sa formule brute est : $C_6H_{13}NO_5$, avec un LogP de (-2,8) et une forte solubilité supérieure à 330 mg/mL (dans l'eau: à 25 °C) (12).

Selon le journal de l'EFSA (15) la glucosamine peut être consommée à une dose maximale de 1,5 g/jour sans qu'elle soit néfaste pour la santé.

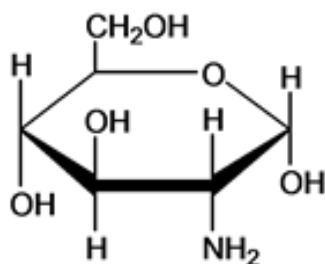


Figure 2 Structure de la glucosamine

Trois échantillons de glucosamine de qualité alimentaire « food grade » ont été étudiés, ils proviennent du même fournisseur mais ont des spécificités différentes en particulier concernant le type de sel (Tableau 2). Les essais ont ainsi été effectués sur un chlorhydrate, un sulfate disodique et un sulfate dipotassique. Les caractéristiques de ces trois lots sont regroupées dans le tableau 2.

Echantillon	Glu01	Glu02	Glu03
Spécification (type de sel)	<i>HCl (chlorhydrate)</i>	<i>Sulfate- 2NaCl (sulfate disodique)</i>	<i>Sulfate- 2KCl (sulfate dipotassique)</i>
Masse molaire	<i>311,6 g/mol</i>	<i>392,11 g/mol</i>	<i>424,3 g/mol</i>
Pureté mesurée	<i>100 %</i>	<i>99,8 %</i>	<i>99,9 %</i>
Origine	<i>Extrait de la carapace de crustacés</i>		
Solubilité	<i>>330 mg/mL</i>		
Apparence	<i>Poudre blanche cristalline inodore</i>		

Tableau 2 Spécification des échantillons testés de la glucosamine

III. Matériels et méthodes

Tous les réactifs et les produits chimiques utilisés sont « HPLC grade » ou « Laboratory reagent grade ».

III.1 Préparation des milieux de dissolution

Les milieux de dissolution utilisés pour l'étude de solubilité et de dissolution apparente sont des solutions tampons correspondant aux points caractéristiques de la classification biopharmaceutique soit pH 1,2, pH 4,5 et pH 6,8. Ces milieux de dissolution ont été préparés selon la Pharmacopée Européenne 10.0.

III.2 Etude de solubilité

L'étude de solubilité est réalisée par la méthode de l'équilibre. La quantité de caféine et glucosamine correspondant à la plus forte dose administrée par jour, soit respectivement 400 mg de poudre de caféine et 1500 mg de poudre de glucosamine, sont introduits dans des fioles de 250 mL et complétées au volume avec le milieu de dissolution pH 1,2 et pH 6,8. Les fioles, maintenues à une température de 37°C sont agitées pendant 6 à 24 h et la quantité de substance dissoute est évaluée par dosage, comparativement à un standard. Pour chaque substance active, l'essai est réalisé en triplicata pour chaque pH.

III.3 Etude de dissolution apparente

L'étude de la vitesse de dissolution des différents lots de poudre de caféine et glucosamine a été effectuée en utilisant la cellule à flux continu (Fig.3 a) à poudre de la méthode de la dissolution apparente décrite dans la Pharmacopée Européenne (16).

La cellule à flux continu (Fig.3 b) est composée des éléments suivants :

- Un réservoir contenant le milieu de dissolution mis sous agitation
- Une pompe servant à entrainer le milieu de dissolution à travers la cellule.
- La cellule proprement dite faite en un matériau transparent
- Un bain thermostaté qui permet de maintenir la température du milieu de dissolution ($37,0 \pm 0,5$ °C)

Le milieu de dissolution traverse la cellule du bas vers le haut et cela grâce à la pompe à piston. Une bille anti-reflux et un lit de billes de verre de 1 mm de diamètre permettent d'obtenir un

flux laminaire continu qui baigne la forme pharmaceutique. Un filtre disposé dans la tête de la cellule empêche le passage des particules non dissoute. A l'aide de la pompe, le milieu de dissolution traverse la cellule du bas vers le haut puis est renvoyé dans le réservoir à partir duquel le dosage de la substance active dissoute est effectué (circuit fermé).

L'appareillage utilisé est un SOTAX CE7smart qui comporte 6 emplacements pour les cellules avec une pompe CP7 (Sotax AG, Suisse). Le débit est réglé à 20 mL/min. La cellule utilisée est la cellule à poudre de diamètre 12 mm. Le mode de fonctionnement est le circuit fermé. Le volume de dissolution est de 500 mL et la température est de 37 ± 0.5 °C.

Chaque cellule a été préparée en mettant une bille rubis de 5 mm au fond de la cellule, puis remplie avec des billes de verre de 1 mm sans dépasser la jauge indiquée sur la cellule, ensuite des échantillons de 500 mg de poudre de caféine ou 500 mg de poudre de Glucosamine ont été mis par-dessus les billes de verres. L'essai a été réalisé en triplicate (n=3).

Des prélèvements de 1 mL ont été récupérés toutes les 15 minutes pendant 120 minutes et remplacés par du milieu à 37°C et le dosage de la quantité de caféine ou glucosamine dissoute est déterminée par dosage HPLC spécifique.



Figure 3.a) Photographie de l'appareil

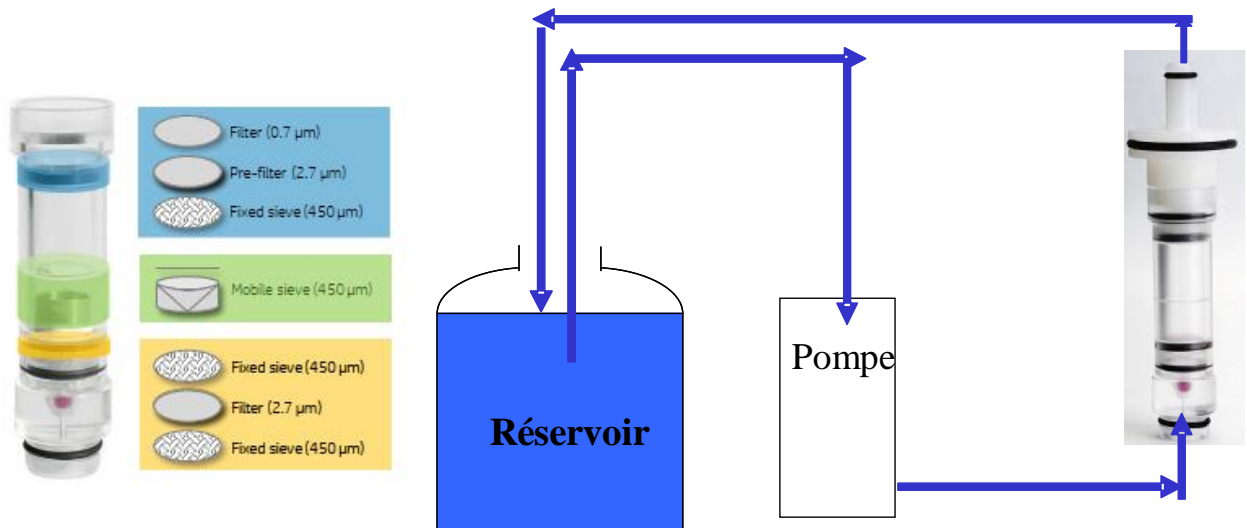


Figure 3.b) Principe de la cellule à flux continu pour la détermination de la vitesse de dissolution apparente

Les résultats de % dissous cumulés en fonction du temps sont calculés à partir des résultats du dosage en utilisant soit une gamme étalon de substance active soit une solution témoin de substance active dans le milieu de dissolution considéré comme référence.

Le calcul est le suivant :

$$\% \text{ dissous} = \frac{\text{Surface } E \times mT}{\text{Surface } T \times mSA} \times \frac{VT}{VE} \times 100$$

Avec

Surface E : surface obtenue pour l'échantillon

Surface T : surface obtenue pour le témoin

mT : masse témoin de substance active

mSA : masse de substance active introduite dans la cellule

VT : volume du témoin

VE : volume du milieu de dissolution

III.4 Etude de perméabilité apparente sur cultures cellulaires

Caco-2

III 4.1 Culture cellulaire

Les cellules Caco-2 proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC). Leur culture est réalisée en flasques de 75 cm² dans un milieu de culture composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), supplémenté avec 15% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), 1% (v/v) d'un mélange d'antibiotiques et antifongiques (10000 U/mL de pénicilline G, 10 mg/mL de Streptomycine et 25 µg/mL d'amphotéricine B), 1% (v/v) d'acides aminés non essentiels (glycine 750 mg/L, L-alanine 890 mg/L, L-asparagine 1320 mg/L, acide L-aspartique 1330 mg/L, acide L-glutamique 1470 mg/L, L-proline 1150 mg/L, L-sérine 1050 mg/L) et 1% (v/v) de L-glutamine à 200 mM).

Les cellules sont maintenues dans un incubateur (Hera Cell 150, Kendro©) à 37°C sous atmosphère composée de 95% d'air et de 5% de CO₂. A 80% de confluence cellulaire, soit tous les 3 à 5 jours, le milieu de culture est retiré et les cellules rincées deux fois avec 10 mL de tampon phosphate salin (PBS) avant d'être décrochées à l'aide de 500 µL de trypsine à 0,25% contenant 0,02% EDTA (v/v). Après 5 minutes d'incubation à 37°C, les cellules décrochées sont suspendues dans 10 mL de DMEM. Les cellules sont ensuite dénombrées à partir d'un aliquot de 10 µL à l'aide d'une cellule de Kova (Hycor© biomedical). La suspension cellulaire est centrifugée (10 min, 220g) (Sigma), et le culot cellulaire suspendu dans 10 mL de milieu DMEM. Les cellules (4 mL) sont enfinensemencées dans une nouvelle flasque, en ajustant le volume à 15 mL. Ce volume de suspension cellulaire est suffisant pour obtenir une concentration de 2.10⁶ cellules/mL. Par ailleurs, le milieu de culture est remplacé tous les deux jours.

Entre le 16^{ème} et le 23^{ème} passage, les cellules sontensemencées en plaque de 12 inserts (Transwell Corning®, Kennebunk, US, membrane de polystyrène 0,4 µm, surface 1,12 cm², 0,5 mL côté apical, 1,5 mL côté basolatéral). Le filtre, côté apical, estensemencé avec 1.10⁵ cellules/ mL suspendues dans du milieu de culture. Le milieu de culture est changé tous les deux jours pendant 21 jours. Cette période de culture assure la différenciation cellulaire, le développement des bordures en brosse et l'expression des enzymes associées à cette bordure. Après cette période de culture, les cellules se différencient et forment une monocouche isolant la partie supérieure (apicale) et la partie inférieure (basolatérale) des chambres de culture.

III 4.2 Mode opératoire

Caféine : des solutions de 50 µg/mL de caféine ont été préparées dans du PBS et préchauffées à 37 °C. Le milieu DMEM est éliminé des inserts, les puits rincés avec du PBS puis rempli avec 1,5 mL de PBS du côté basolatéral. Du côté apical, 0,5 mL de solution de caféine a été déposée. Les essais sont réalisés en triplicata pour chaque lot de caféine.

Des échantillons de 100 µL ont été prélevés à 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1 h30 et 2 h depuis le côté basolatéral de chaque puits, puis remplacés à chaque fois par 100 µL de PBS pour maintenir le volume à 1,5 mL. La quantité de caféine a été dosée par une méthode HPLC spécifique.

Glucosamine : à cause des interférences rencontrées lors de la mise au point de la méthode analytique en HPLC pour doser la glucosamine, le milieu habituel utilisé pour l'étude de perméabilité (DMEM ou PBS) a été remplacé par du glucose à 5%.

Des solutions de 60 mg/mL de glucosamine de chaque échantillon ont été préparées dans du glucose 5% et préchauffées à 37 °C. Le milieu DMEM est éliminé des inserts, les puits rincés avec du PBS et rempli avec 1,5 mL glucose 5% dans le côté basolatéral. Sur chaque puit, 0,5 mL de solution de glucosamine a été déposé du côté apical (n=3).

Des échantillons de 100 µL ont été prélevés toutes les 15 minutes pendant 2 heures depuis le côté basolatéral de chaque puits, puis remplacés à chaque fois par 100 µL de glucose 5% pour maintenir le volume à 1,5 mL. La quantité de glucosamine a été dosée par une méthode HPLC spécifique

III 4.3 Validation du test de perméabilité sur les Caco-2

Afin de s'assurer de la viabilité cellulaire tout au long des expérimentations et de l'intégrité de la monocouche cellulaire (membrane), deux tests complémentaires sont réalisés :

III 4 3 a) Test de viabilité cellulaire

Le dénombrement des cellules viables a été réalisé en cytométrie en flux (cytomètre Navios, Beckman Coulter, Brea, Etats-Unis) avec le marquage à l'iodure de propidium (IP).

L'IP est un colorant cationique et un agent intercalant des acides nucléiques sans spécificité de base, il réagit avec l'ADN ou l'ARN. Excité par le laser bleu (488 nm), il émet une fluorescence rouge (617 nm) quand il est lié à l'ADN. Son utilisation en cytométrie en flux est liée à sa très faible perméabilité membranaire. Du fait de sa lipophobie, il ne peut pas traverser, ou que très

difficilement, la membrane plasmique des cellules saines au contraire de celles qui sont endommagées. Ceci fait de lui un puissant marqueur de la viabilité cellulaire. Dans le cas d'une cellule viable, l'IP ne peut pénétrer et se lier à l'ADN de la cellule, contrairement à une cellule morte qui présente une membrane perméabilisée/fragilisée. Du fait de ses propriétés optiques, la fluorescence rouge/orange consécutive à l'excitation par un laser bleu met en évidence la nécrose cellulaire et permet le comptage des cellules mortes.

L'essai est effectué sur une plaque de 12 puits reproduisant exactement les mêmes conditions du test de perméabilité (inserts) sans prélèvement de milieu A la fin de l'expérimentation (2 h), les cellules sont trypsinées et décrochées à l'aide de 100 μL de trypsine à 0,25% contenant 0,02% EDTA (v/v). Après avoir remis en suspension les cellules, les culots sont repris dans 1 mL de PBS, vortexés, puis un volume de 290 μL d'échantillon est transféré dans un microtube contenant 3 μL d'IP (marquage). Les microtubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 min, puis injectés dans le cytomètre pour le comptage comparativement à une culture sans dépôt de substance active. Le résultat est exprimé en % de viabilité par rapport aux cellules sans traitement.

III 4 3 b) Résistance électrique trans-épithéliale

La résistance électrique trans-épithéliale (TEER) est mesurée, sur les inserts, tout au long du test à l'aide d'un voltmètre épithélial (EVOM² World Instrument Precision TM) muni d'une électrode (STX2) afin de connaître l'intégrité des jonctions serrées (Fig.4).



Figure 4 Voltmètre épithélial (EVOM² World Instrument Precision TM) pour la détermination de la résistance électrique trans-épithéliale

Les valeurs du TEER des monocouches ont été mesurées avec le voltmètre. Cette mesure est relevée dans le milieu initial puis en présence des solutions contenant les produits à analyser aux différents temps de la cinétique. À la fin de l'expérience, les solutions de caféine ont été retirées des inserts, puis les cellules sont rincées avec du PBS et incubées à 37°C dans du DMEM complet pour permettre à la membrane de se régénérer pendant 48 h. Les mesures de TEER ont été enregistrées en complément, à 24 et 48h après l'expérience. Avant chaque expérimentation, la monocouche doit présenter une valeur du TEER supérieure ou égale à 250 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ pour être utilisée. Au début de l'expérimentation, les inserts devront avoir un TEER supérieur ou égal à 250 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ pour être utilisés (17).

III.5 Etude de perméabilité effective *Ex vivo* (Intestin isolé)

III 5.1 Animaux

Les animaux utilisés dans cette étude étaient des rats mâles adultes Wistar de 400 ± 10 g de poids. Ils ont été logés dans une pièce à température contrôlée (20 ± 2 °C) et ont été maintenus sur un cycle de routine 12h lumière / 12h obscurité (lumières allumées de 8h00 à 20h00). Les animaux avaient libre accès à un régime alimentaire standard en boulettes sous forme de granulé (A04, UAR, Epinay-sur-Orge, France) et à l'eau du robinet. Tous les soins et la manipulation des animaux ont été effectués avec l'approbation du comité d'éthique.

III 5.2 Mode opératoire

Après une période d'acclimatation d'une moyenne de 5 jours, les rats mis à jeun pendant les dernières 24 heures ont été anesthésiés à l'aide d'Imalgène® 1000 par injection intra-péritonéale (150 $\mu\text{L}/100$ g de poids corporel) et de Valium® (50 $\mu\text{L}/100$ g de poids corporel). Après laparotomie et ligature de l'artère cœliaque, des segments de 10 cm de jéjunum (6 au total) ont été prélevés. L'extérieur (face séreuse) et l'intérieur (face muqueuse) de chaque organe ont ensuite été rincés à l'aide de 10 mL de sérum physiologique. Après séchage sur papier absorbant, les différents segments sont pesés puis ligaturés à une extrémité, l'autre extrémité permettant l'introduction des produits à étudier (caféine et glucosamine). Des solutions à 1 mg/mL de chaque lot de poudre de caféine dans du tampon de survie Krebs-Henseleit, ou des solutions à 60 mg/mL de chaque lot de glucosamine dans du glucose 5% ont été introduites à l'aide d'une seringue. La seconde extrémité est ligaturée, puis les organes sont pesés. Ils sont ensuite rincés dans 10 mL de tampon Krebs-Henseleit avant d'être déposés dans une cuve à organe isolé en verre contenant 15 mL de tampon Krebs-Henseleit maintenu à 37°C et aérés par un mélange O₂ (95%) / CO₂ (5%). Un bouchon est ensuite placé au-dessus de chaque cuve

afin d'éviter toute évaporation (Fig 5). Des prélèvements de milieu tampon (compartiment séreux) ont été effectués toutes les 15 min pendant 2 heures et analysés par HPLC. Pour chaque lot de poudre étudié l'essai a été réalisé sur 3 segments intestinaux.

La viabilité des organes a précédemment été mise en évidence par *Garrat et al.* (18) et a été confirmée par l'observation d'une activité péristaltique, caractérisée par des mouvements ondulatoires le long de la membrane intestinale.

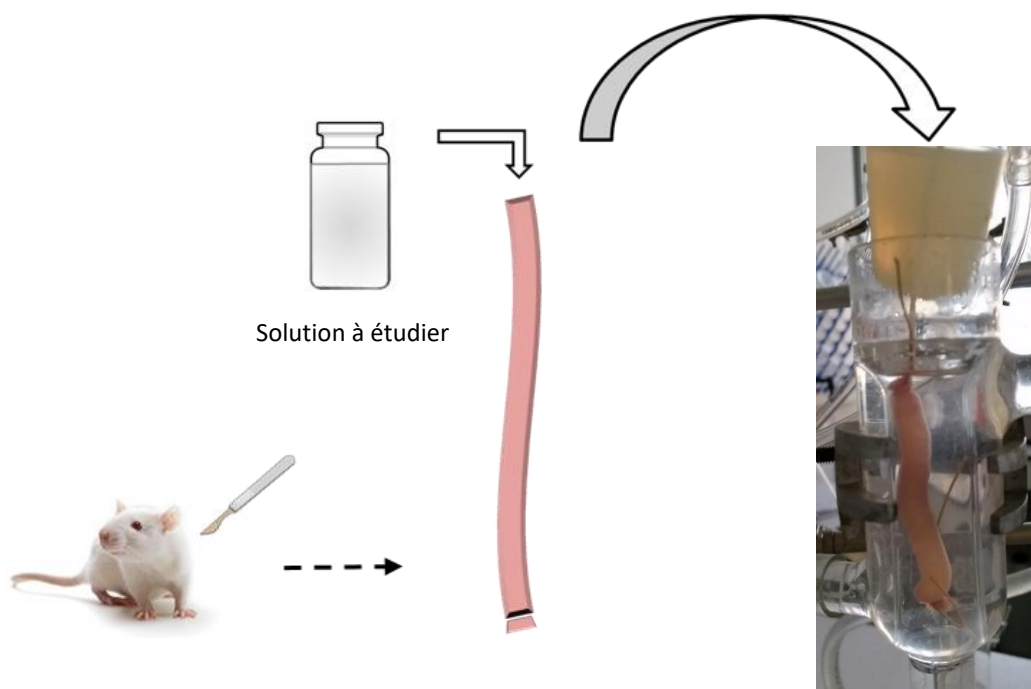


Figure 5 Montage de l'étude de perméabilité sur intestin isolé d'après (19)

III.6 Dosage des échantillons

Le dosage de la caféine et de la glucosamine contenues dans les échantillons prélevés dans les différents milieux et aux différents temps des cinétiques est effectué par une méthode HPLC. Le système chromatographique utilisé est l'appareil Merck Hitachi LaChrom Elite® comprenant une pompe, un injecteur automatique, un four pour colonne (VWR HITACHI L-2300, VWR, USA) et un détecteur UV à barrettes de diode. Le logiciel EZ Chrom Elite™ est utilisé pour évaluer les chromatogrammes. Pour chaque composé étudié, les différents critères (spécificité, linéarité, précision et exactitude) ont été vérifiés.

Caféine : la méthode utilisée est adaptée de celle décrite par Koblova *et al.* (20).

Les conditions chromatographiques utilisées sont :

- Une colonne C18 de $4,6 \times 100$ mm et de $3,5 \mu\text{m}$ (Symmetry®),
- Une phase mobile composée d'acétonitrile et de tampon phosphate 6,8 (Eur Ph) (10 : 90, v/v),
- Un volume d'injection de $10 \mu\text{L}$,
- Un débit de 1 mL/min ,
- Une détection à 235 nm ,

Un temps d'analyse de 5 min pour un temps de rétention de $2,2 \pm 0,1$ min.

Un exemple de chromatogramme obtenu est présenté dans la figure 6.

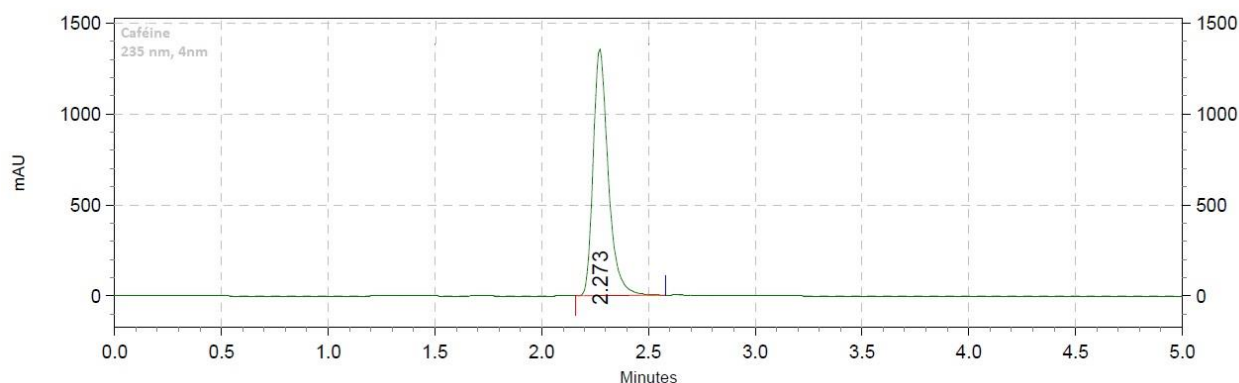


Figure 6 Chromatogramme obtenu lors du dosage de la caféine

Glucosamine : le dosage des échantillons a été réalisé en appliquant la méthode décrite par Nagarajan *et al.* (21).

Les conditions chromatographiques utilisées sont :

- Une colonne C18 de $4,6 \times 250$ mm et de $5 \mu\text{m}$ (Interchim®),
- Une phase mobile composée d'acide octane sulfonique dans l'eau : ACN : triéthylamine (90,65: 8,96: 0,381), ajustée à pH 4,0 avec de l'acide orthophosphorique.
- Un volume d'injection de $25 \mu\text{L}$,
- Un débit de 1 mL/min ,
- Une détection à 195 nm ,
- Un temps d'analyse de $3,5 \text{ min}$ pour un temps de rétention de $1,7 \pm 0,3 \text{ min}$.

Un exemple de chromatogramme obtenu est présenté dans la figure 7

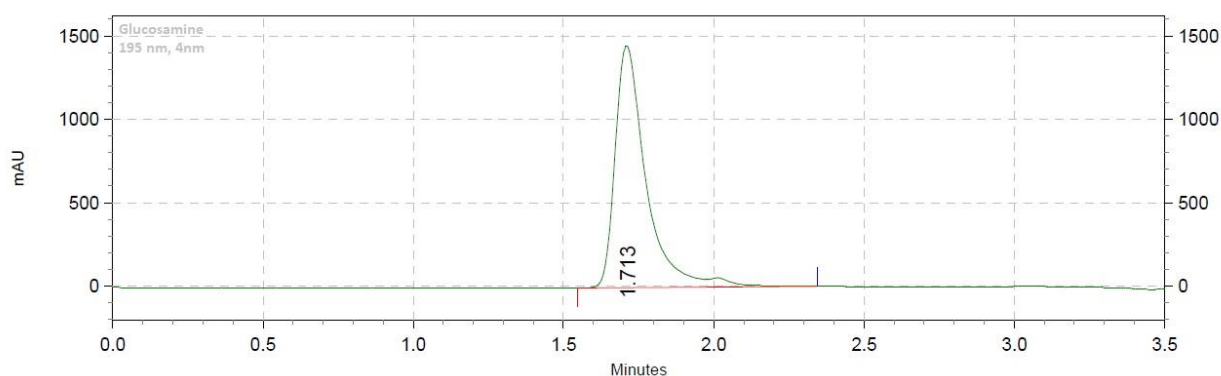


Figure 7 Chromatogramme obtenu lors du dosage de la glucosamine

IV. Résultats et discussion

IV.1 Caféine

IV 1.1 Solubilité

La solubilité des échantillons de poudre de caféine, quel que soit le pH étudié, est largement supérieure à la dose de 400 mg retenue comme dose maximale de référence. La solubilité n'est pas influencée par le pH, par l'origine synthétique ou naturelle de la molécule et les résultats obtenus rejoignent ceux décrits dans la littérature avec une solubilité aqueuse dans les tampons supérieure à 20 mg/mL quel que soit le pH utilisé (22).

Dans nos conditions expérimentales, le volume nécessaire pour dissoudre 400 mg est d'environ 20 mL, soit très inférieure à la limite de 250 mL préconisée dans la classification biopharmaceutique.

IV 1.2 Dissolution apparente

Les résultats de dissolution apparente, déterminée avec la cellule à flux continu spécifique pour les poudres, sont présentés dans les figures 8 à 10 pour les milieux pH 1,2, 4,5 et 6,8 respectivement et regroupés dans le tableau 3. L'essai a été effectué sur 400 mg de poudre de chacun des lots correspondant à 400 mg de caféine pour le lot de caféine anhydre et 10% soit 40 mg de caféine pour l'extrait sec de guarana. Les résultats sont ainsi exprimés en taux de dissolution représentant les quantités cumulées de caféine dissoutes (à gauche) et le pourcentage dissous (à droite) en fonction du temps.

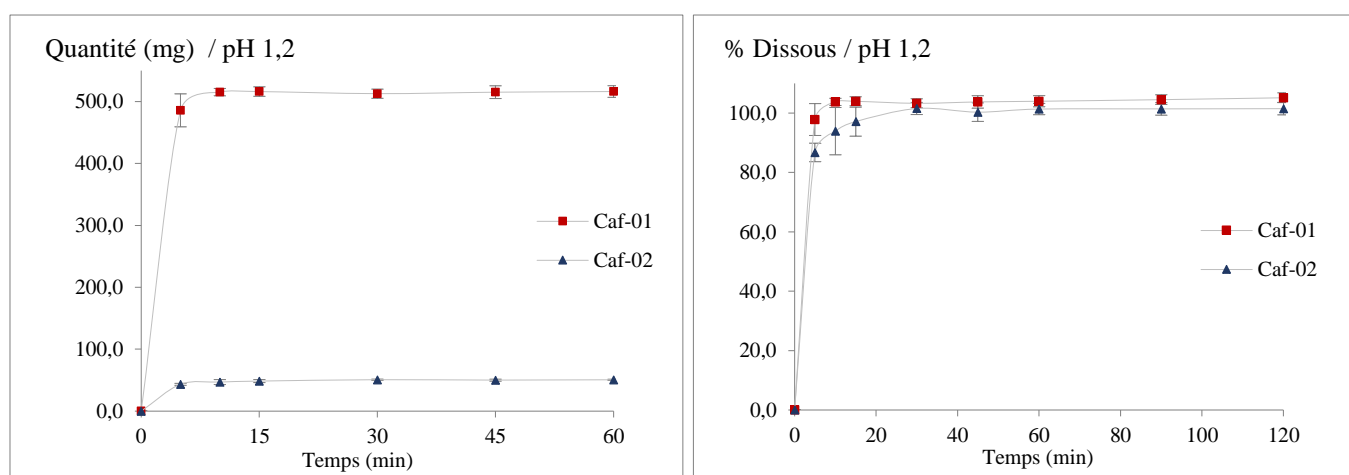


Figure 8 Résultats de dissolution apparente, présentés en quantités et % dissous, des poudres de caféine dans le tampon pH 1,2 (n=3)

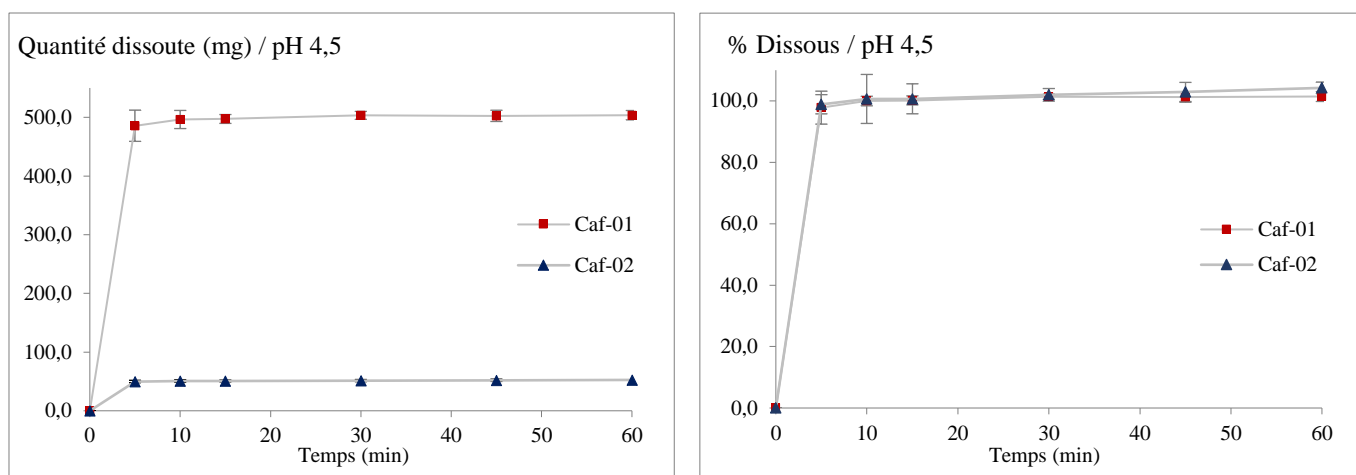


Figure 9 Résultats de dissolution apparente présentés en quantités et % dissous, des poudres de caféine dans le tampon pH 4,5 (n=3)

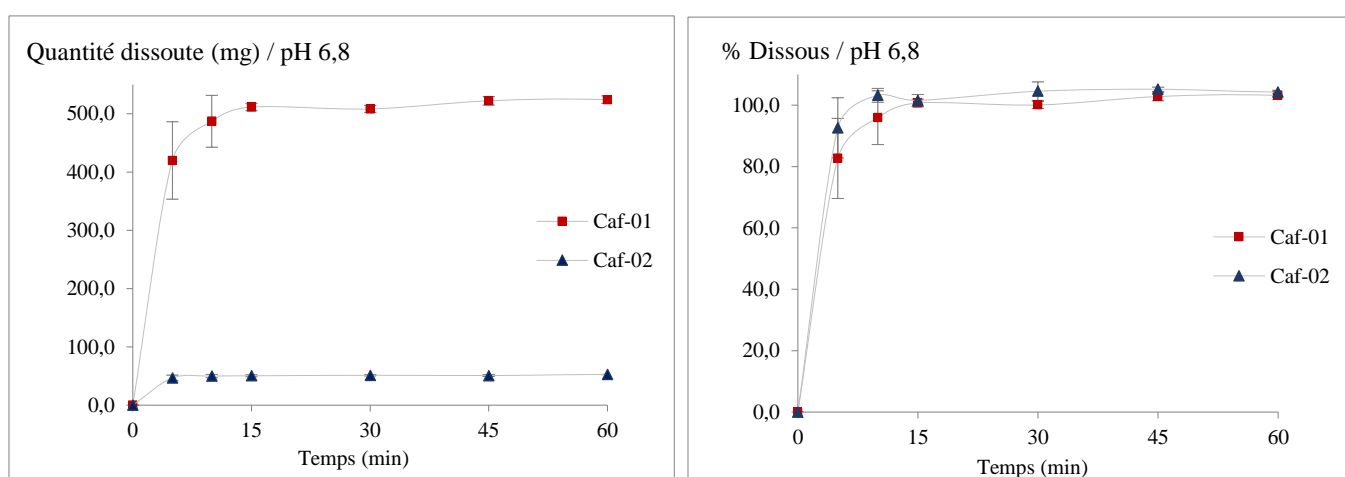


Figure 10 Résultats de dissolution apparente présentés en quantités et % dissous, des poudres de caféine dans le tampon pH 6,8 (n=3)

Produit	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
Caf-01 (Caféine anhydre)	100,8 ± 1,5	100,1 ± 1,5	100,7 ± 1,3
Caf-02 (Extrait sec de guarana)	97,1 ± 4,9	100,7 ± 1,2	99,8 ± 3,4

Tableau 3 Taux de dissolution des poudres de caféine à 15 min (n=3) en fonction du pH

L'analyse des résultats obtenus met en évidence une vitesse de dissolution très rapide de la poudre de caféine, quel que soit le pH de dissolution et l'origine du produit (synthétique ou

naturelle). La variabilité est très faible malgré des temps d'analyse précoces (5 min) et plus de 80% de la quantité de caféine présente dans l'échantillon est dissoute en 5 minutes et la totalité de la poudre est dissoute en 15 minutes. Compte tenu de ces résultats, dans le cas d'une formulation à libération immédiate (comprimé ou gélule) comprenant de la caféine, la dissolution de celle-ci n'est pas le facteur limitant et les poudre de caféine de différentes origines sont interchangeables.

IV 1.3 Perméabilité apparente sur Caco-2

Les résultats de perméabilité de la caféine à travers des cellules Caco-2, exprimés en quantités absorbées (μg) en fonction du temps, sont présentés dans la figure 11 et regroupés dans le tableau 4.

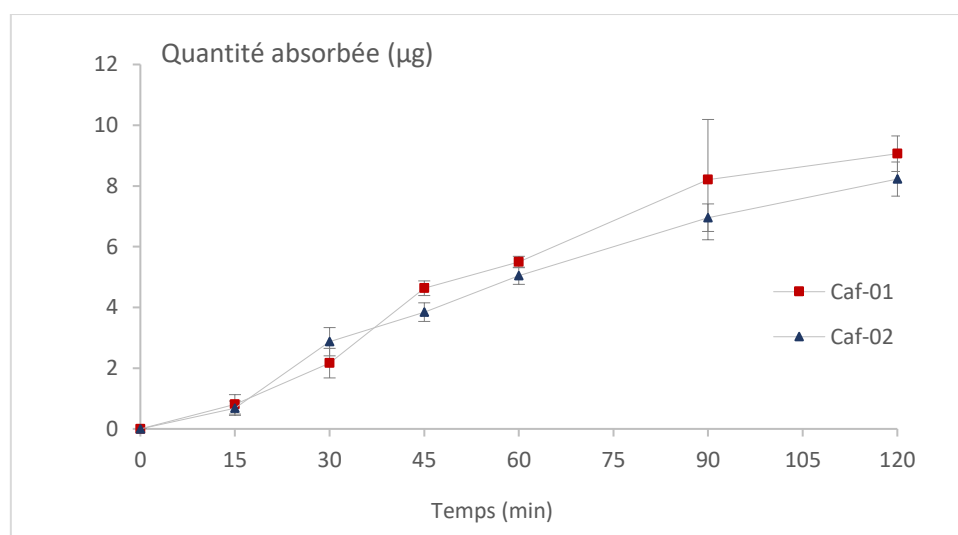


Figure 11 Résultats de perméabilité apparente sur le modèle Caco-2 de la caféine ($n=3$)

Perméabilité <i>in vitro</i>	Caf-01	Caf-02
% Absorbé	$29,62 \pm 1,91$	$30,09 \pm 2,05$
Quantité absorbée à 120 min (mg)	$9,06 \pm 0,58$	$8,23 \pm 0,56$
P_{app} ($10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$)	$1,84 \pm 0,12$	$1,87 \pm 0,12$

Tableau 4 Quantité, taux absorbé et perméabilité apparente (P_{app}) des poudre de caféine

L'absorption de la caféine à travers la monocouche cellulaire est progressive et importante. Presque 10 mg soit environ 30% de la quantité totale de caféine déposée du côté apical des cellules est retrouvée côté basolatérale. La variabilité est faible et identique entre les produits étudiés. Les solutions déposées ont la même concentration en caféine et tiennent compte du

titre en caféine (100% pour la forme anhydre, 10% pour l'extrait sec de guarana). L'origine de la caféine, synthétique ou naturelle, n'influence pas son absorption.

Le coefficient de perméabilité apparente de la caféine est très supérieur à la valeur de 5.10^{-6} cm/s qui est la limite de haute perméabilité fixée pour les substances actives dans la BCS. Dans ces conditions, la caféine est considérée comme un produit de haute perméabilité.

Les études de perméabilité sur Caco-2, précédemment publiées (23,24), ont mis en évidence un passage linéaire dans le temps, bidirectionnel, pH indépendant, non saturable et d'ordre 1. Le transport est transcellulaire et correspond à un phénomène de diffusion passive. L'utilisation d'un milieu sans calcium, conduisant à une ouverture des jonctions serrées ne modifie pas le coefficient de perméabilité de la caféine, ce qui implique que la voie paracellulaire est une voie mineure de transport de la caféine (24). Les résultats de notre étude sont en accord avec les données de la littérature.

La viabilité cellulaire à 2 heures (Fig.12) n'est pas modifiée en présence de caféine comparativement au témoin sans produit déposé et plus de 90% des cellules sont viables après 2 heures. La caféine n'a pas d'impact sur la viabilité cellulaire, à la concentration étudiée.

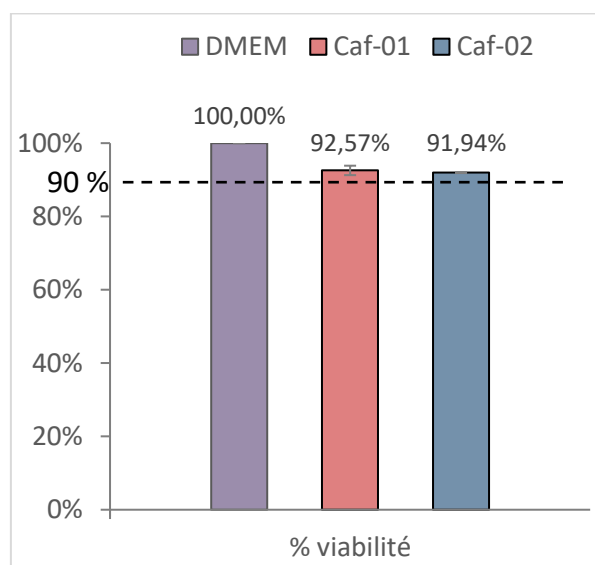


Figure 12 Taux de viabilité cellulaire (%) des échantillons testés de caféine (n=3) mesuré par cytométrie

La résistance électrique trans-épithéliale (Fig 13), mesurée à T0 (avant et après dépôt des échantillons), 2 h (fin de l'expérimentation) et 24 h permet d'évaluer l'intégrité du tapis cellulaire de caféine. La valeur du TEER diminue fortement après addition des solutions de caféine mais retrouve une valeur normale après 24 h. Cette modification du TEER implique une déstabilisation du tapis cellulaire, le passage d'eau et d'ion au niveau paracellulaire et un

impact sur les jonctions serrées (25). Toutefois cette modification est transitoire et les cellules Caco-2 retrouvent leur intégrité au bout de 24 h lorsque le produit est enlevé.

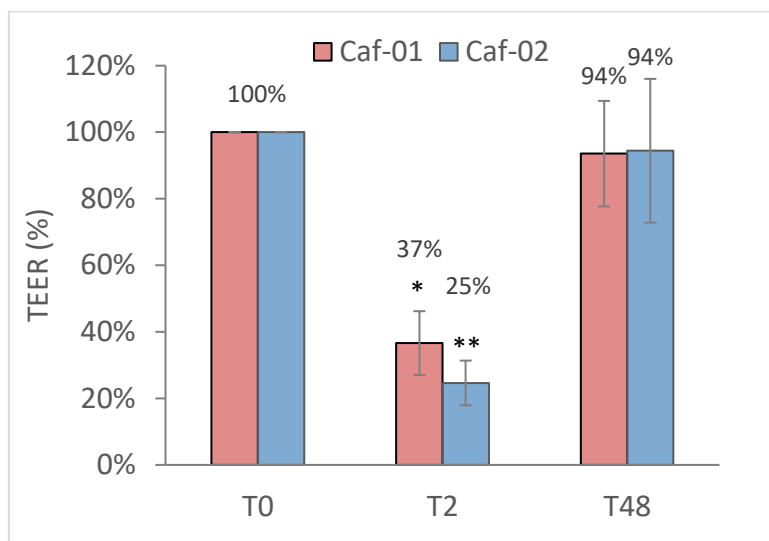


Figure 13 Valeurs du TEER (%) évalués en T0, T2 et T48 (n=3)

IV 1.4 Perméabilité effective *ex vivo* déterminée sur intestin isolé

Les résultats de perméabilité effective de la caféine sur intestin isolé, exprimés en quantités absorbées (μg) en fonction du temps, sont présentés dans la figure 14 et regroupés dans le tableau 5.

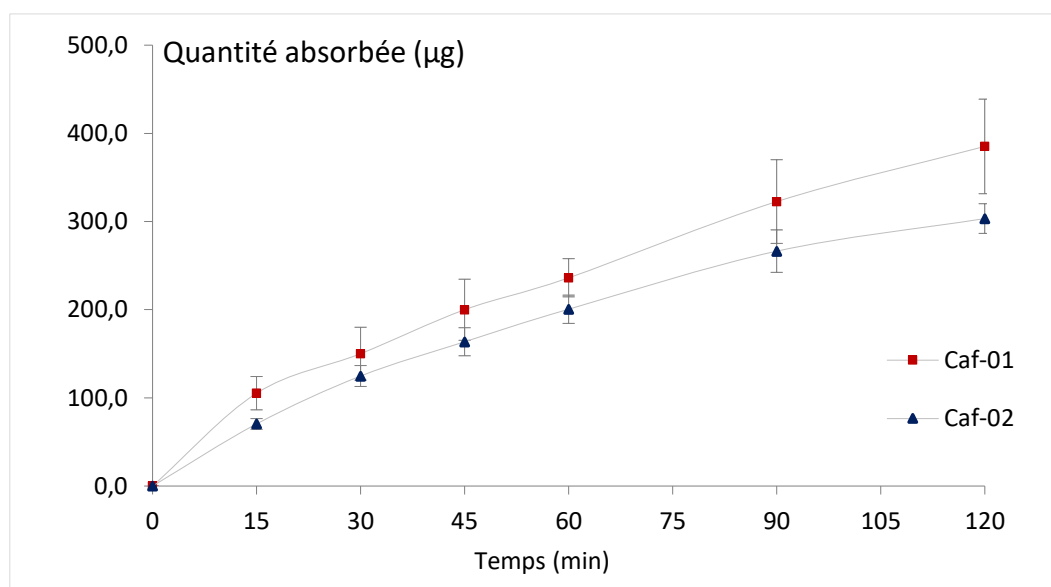


Figure 14 Résultats de perméabilité de la caféine sur le modèle *ex vivo*

Perméabilité <i>ex vitro</i>	Caf-01	Caf-02
% Absorbé	46,65 ± 3,80	42,16 ± 30,75
Quantité absorbée à 120 min (mg)	459,90 ± 39,37	416,22 ± 1,52
P_{eff} (10^{-4} cm.s ⁻¹)	1,65 ± 0,13	1,49 ± 0,05

Tableau 5 Quantité, taux absorbée (%) et perméabilité effective (P_{eff}) de la caféine sur le modèle *ex vivo* ($n=3$).

Les résultats obtenus avec l'intestin isolé sont similaires à ceux obtenus avec les cellules Caco-2. L'absorption est progressive et massive, plus de 400 mg soit 40% de la quantité de caféine introduite dans le segment intestinal est « absorbée » au niveau de la muqueuse intestinale et se retrouve dans le compartiment extérieur après 2h d'incubation. La variabilité est faible, malgré l'utilisation de matériel biologique et les résultats ne sont pas influencés par la nature de l'échantillon (synthétique ou naturel).

La valeur du coefficient de perméabilité effective est supérieure à la valeur limite de 1.10^{-4} cm.s⁻¹ caractérisant un produit de haute perméabilité par rapport à un produit de faible perméabilité. La caféine est donc un produit présentant une grande perméabilité.

Les résultats de perméabilité sont en accord avec les données publiées chez l'homme qui indiquent, après administration orale de caféine, une absorption rapide et complète au niveau du tractus gastrointestinal avec une concentration maximale atteinte en 1 h et une biodisponibilité de 100% (26,27).

IV.2 Glucosamine

IV 2.1 Solubilité

Comme dans le cas de la caféine, la solubilité des échantillons de glucosamine dans l'eau à 25°C est très importante comparativement à la dose maximale journalière (1500 mg) choisie comme référence. Pour des raisons analytiques (beaucoup d'interférences à $\lambda = 195$ nm), le dosage de la quantité de glucosamine dissoute n'a pu être réalisé qu'à pH 4,5. Toute la dose est solubilisée dans un volume de 250 mL à pH 4,5 et les solutions à pH 1,2 et pH 6,8 ne présentent aucune particule visible, mettant en évidence une solubilisation totale de la poudre de glucosamine.

La glucosamine est une petite molécule (masse moléculaire = 179,17 g/mol) et il s'agit chimiquement d'une base. Comme le groupement NH_2 ne peut pas être libre par nature, il doit être acétylé, sulfaté ou salifié. La N-acetylglucosamine a été rarement utilisée dans les études pharmacologiques et n'est jamais décrite dans les études cliniques bien qu'elle soit disponible dans certains pays comme complément alimentaire. Le sulfate (glucosamine-6-sulfate) n'a jamais été utilisé. La glucosamine utilisée dans les compléments alimentaires pour son activité sur l'arthrose est donc un sel soit le chlorhydrate soit le sulfate représentés figure 15 (28). Le chlorhydrate est le plus facile à obtenir alors que le sulfate de glucosamine est très hygroscopique et instable et il peut être stabilisé avec du chlorure de sodium pour obtenir une forme cristallisée ou du potassium (29).

La glucosamine présente un pKa de 7,58, au pH de 4,5, le groupement amine est pratiquement complètement protonisé favorisant la solubilisation du produit (12). La solubilité est indépendante du type de sel (chlorhydrate, sulfate disodique ou sulfate dipotassique) et du pH.

Le volume nécessaire pour dissoudre 1500 mg de glucosamine est très inférieur à la limite de 250 mL préconisée dans la classification biopharmaceutique. Dans ces conditions ce produit peut être considéré comme un produit très soluble.

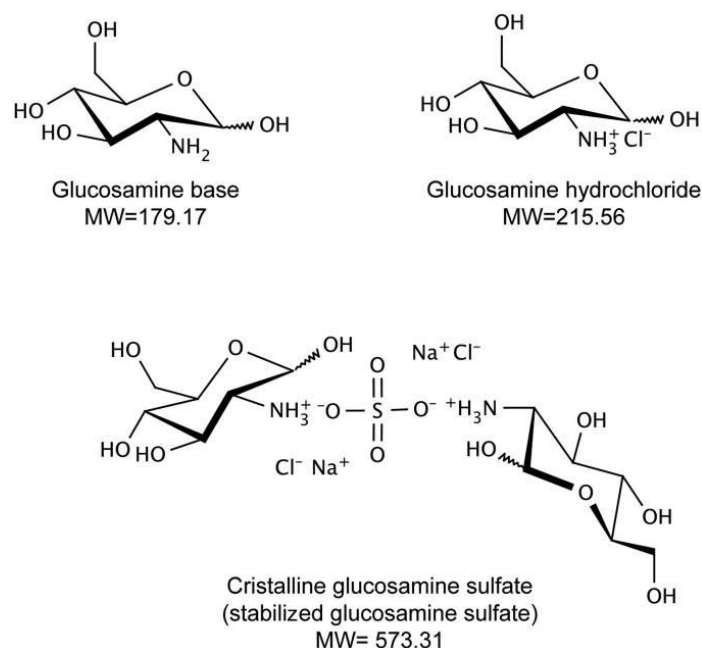


Figure 15 Structure de la glucosamine base et de ses sels (28)

IV 2.2 Dissolution apparente

Pour des raisons analytiques (beaucoup d'interférences à $\lambda = 195$ nm), le test de dissolution de la glucosamine a été réalisé uniquement avec le milieu à pH 4,5. Les résultats de dissolution apparente, sont présentés dans la figure 16 et regroupés dans le tableau 6. Les résultats sont exprimés en quantités cumulées de glucosamine dissoutes en fonction du temps. La quantité de poudre de glucosamine étudiée est de 500 mg pour chacun des lots. La quantité étudiée, inférieure à la dose maximale choisie comme référence (1500 mg) est représentative du lot et permet d'effectuer la manipulation dans de bonnes conditions (remplissage correct de la cellule sans risque de colmatage ou « pression en retour »).

La vitesse de dissolution de la glucosamine est très rapide quel que soit le sel étudié. La glucosamine est une molécule polaire très soluble, plus de 90% de la quantité de glucosamine présente dans l'échantillon est dissoute en 5 minutes et la totalité de la poudre est dissoute en moins de 10 minutes. Les essais ont aussi été effectués à pH 1,2 et pH 6,8 sans dosage avec une appréciation visuelle de la solubilisation de la glucosamine dans la cellule. Quels que soient le pH et le sel étudié, la solubilisation de la poudre est très rapide puisque visuellement aucune particule n'est visible dans la cellule à 10 minutes.

Compte tenu de ces résultats, dans le cas d'une formulation à libération immédiate (comprimé ou gélule) comprenant de la glucosamine, la dissolution de celle-ci n'est pas le facteur limitant et les poudres de différents sels sont interchangeable.

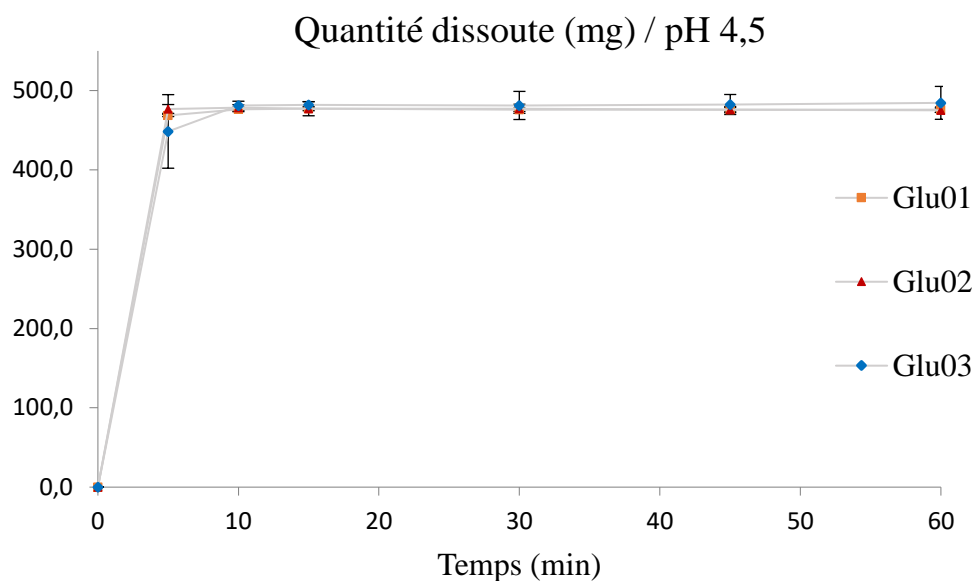


Figure 16 Résultats de dissolution apparente des poudres de glucosamine dans le tampon pH 4,5 (n=3)

Dissolution apparente pH 4,5	Glu01	Glu02	Glu03
Quantité dissoute à 15 min (mg)	475,6 ± 4,2	477,3 ± 8,0	480,10 ± 14,6
% Dissous	94,6 ± 0,8	94,1 ± 1,6	94,7 ± 2,9

Tableau 6 Taux de dissolution et quantités dissoutes de glucosamine à 15 min (pH 4,5)

IV 2.3 Perméabilité apparente sur Caco-2

Les résultats de perméabilité de la glucosamine à travers la monocouche des cellules Caco-2, exprimés en quantités absorbées (mg) de glucosamine base en fonction du temps, sont présentés dans la figure 17 et regroupés dans le tableau 7.

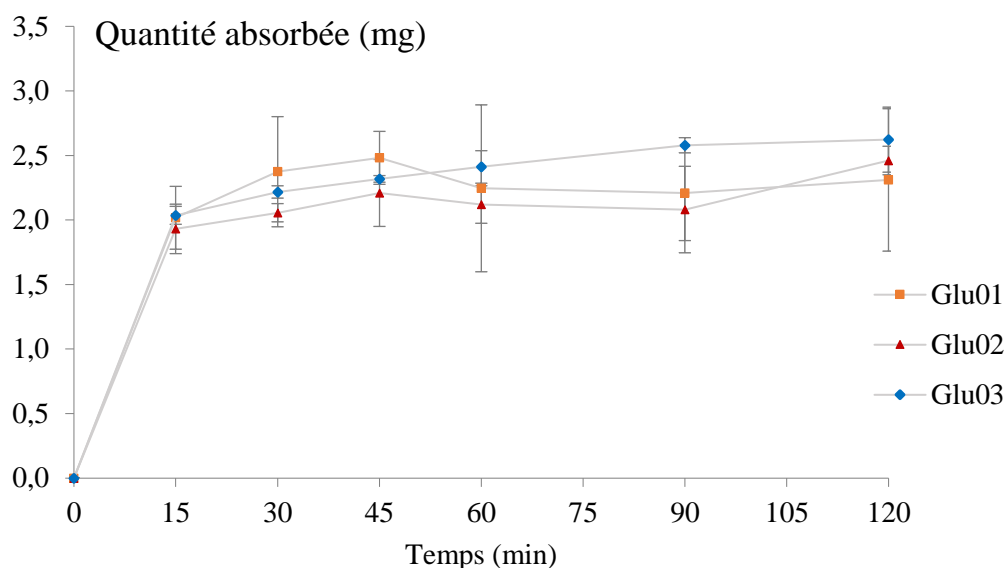


Figure 17 Résultats de perméabilité apparente sur le modèle Caco-2 de la glucosamine base ($n=3$)

Perméabilité <i>in vitro</i>	Glu01	Glu02	Glu03
% absorbé	$6,38 \pm 1,52$	$8,37 \pm 0,37$	$9,83 \pm 0,94$
Quantité absorbée à 120 min (mg)	$2,31 \pm 0,55$	$2,46 \pm 0,11$	$2,62 \pm 0,25$
P_{app} ($10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$)	$3,96 \pm 0,94$	$5,19 \pm 0,23$	$6,09 \pm 0,58$

Tableau 7 Quantité, taux absorbé et perméabilité apparente (P_{app}) des échantillons testés de glucosamine sur le modèle *in vitro* (Caco-2)

Le passage de la glucosamine à travers les cellules Caco-2 est très faible avec une variabilité assez importante. Cette variabilité peut être attribuée d'une part à la faible quantité de produit qui traverse la membrane et aux problèmes analytiques rencontrés dans le dosage de la glucosamine. Pour le calcul, les % absorbés ont été ramenés à la quantité de glucosamine base présente dans la solution de départ. Moins de 10% de la dose déposée est absorbée en 120 minutes et cette absorption est indépendante du type de sel étudié. Cette faible absorption est pratiquement complète en 15 minutes puis très lente jusqu'à la fin de la manipulation (2 h) avec des variations de quantités absorbées au cours du temps très faibles.

Le coefficient de perméabilité apparente de la glucosamine est proche ou légèrement inférieur à la valeur de $5 \cdot 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ qui est la limite de haute perméabilité fixée pour les substances actives dans la BCS. Dans ces conditions, la glucosamine est considérée comme un produit limite entre la faible et la haute perméabilité et d'autres paramètres doivent être pris en compte pour définir son statut.

La viabilité cellulaire à 2 heures (figure 18) n'est pas modifiée en présence de glucosamine comparativement au témoin sans produit déposé et plus de 90% des cellules sont viables après 2 heures. La glucosamine n'a pas d'impact sur la viabilité cellulaire, à la concentration étudiée.

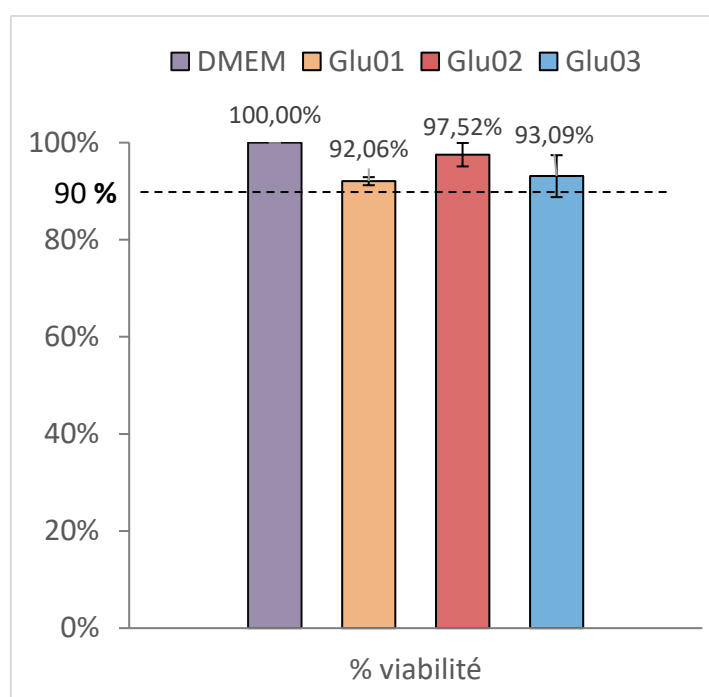


Figure 18 Taux de viabilité cellulaire calculé (%) des échantillons testés de glucosamine (n=3)

Les valeurs du TEER (Fig.19), mesurée à T0, à la fin de la manipulation (2h) et à 24h ne mettent pas en évidence de modifications liées au dépôt de solutions de glucosamine. Le TEER garde une valeur supérieure à 90% pendant toute la durée de l'expérimentation et proche de 100% à 24 h.

Le protocole de détermination de la perméabilité sur Caco-2 a dû être adapté compte tenu des interférences rencontrées lors de la mise au point de la méthode de dosage. Le milieu habituel à utiliser pour l'étude de perméabilité (DMEM ou PBS) a été remplacé par du glucose à 5%.

L'ensemble des résultats de viabilité cellulaire (cytométrie et TEER) permettent de valider l'intégrité des cellules Caco-2 tout au long de l'expérimentation.

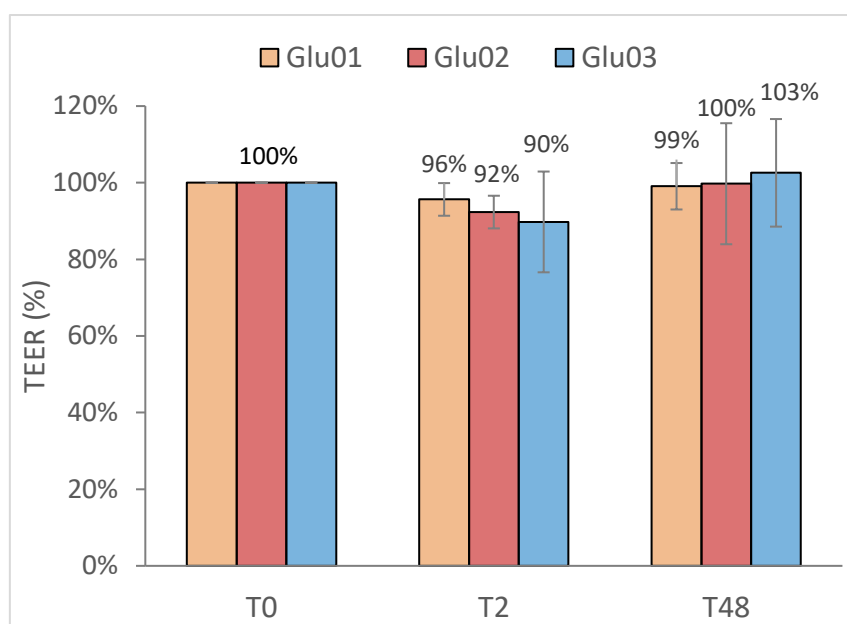


Figure 19 Valeurs du TEER (%) évalués en T0, T2 et T48 (n=3)

IV 2.4 Perméabilité effective *ex vivo* déterminée sur intestin isolé

Les résultats de perméabilité effective de la glucosamine sur intestin isolé, exprimés en quantités absorbées (mg) de glucosamine base en fonction du temps, sont présentés dans la figure 20 et regroupés dans le tableau 8.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux précédemment obtenus avec les cellules Caco-2. Le pourcentage de glucosamine retrouvé dans le compartiment récepteur est faible (<50% en 120 min) et plus de 80% du produit sont absorbés au bout de 15 minutes. La cinétique d'absorption est très lente et la valeur du coefficient de perméabilité effective est inférieure à la limite de haute perméabilité. La glucosamine peut être considérée comme un produit de faible perméabilité.

La perméabilité n'est pas influencée par le type de sel, même si le coefficient de perméabilité du sel de sulfate dipotassique est légèrement supérieur à celui des deux autres sels (chlorhydrate et sulfate di-sodique). L'influence du sel semble avoir un effet limité car en milieu aqueux, au pH neutre de travail, compte tenu de la valeur du pKa (pKa = 7,58), quel que soit le sel étudié, celui-ci est totalement dissocié en glucosamine et contre ion.

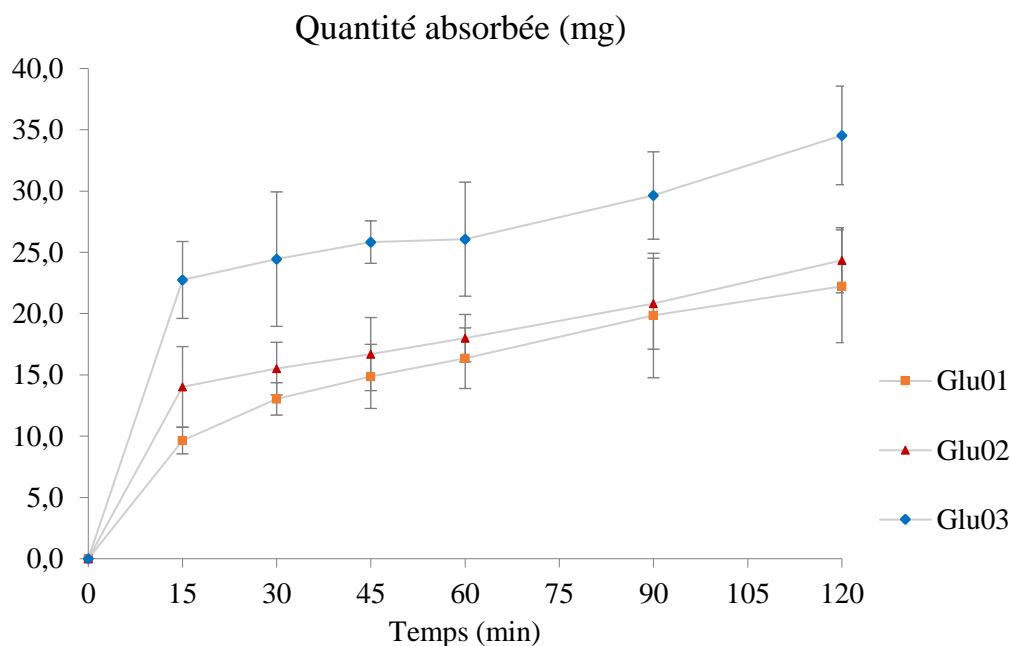


Figure 20 Résultats de perméabilité de la glucosamine sur le modèle *ex vivo*

Perméabilité <i>ex vivo</i>	Glu01	Glu02	Glu03
% Absorbé	51,55 ± 10,86	60,83 ± 7,51	76,90 ± 15,3
Quantité absorbée à 120 min (mg)	31,96 ± 7,36	36,73 ± 4,42	47,09 ± 9,54
P_{eff} (10^{-6} cm/sec)	2,36 ± 0,54	2,71 ± 0,32	4,63 ± 0,94

Tableau 8 Quantités, taux absorbée (%) et perméabilité effective (P_{eff}) à 120 min sur le modèle *ex vivo* des échantillons testés de glucosamine.

De nombreuses études sont encore contradictoires sur le devenir *in vivo* et la biodisponibilité de la glucosamine. L'absence de méthodes fiables avec une limite de quantification importante expliquent ce problème. Toutefois le développement de méthodes de chromatographie ionique et de LC/MS a permis de clarifier certaines données sans apporter toutes les réponses sur le devenir *in vivo* de ce produit après son administration orale. La biodisponibilité absolue de la glucosamine est faible, elle a été estimée entre 3 et 6% chez le cheval (30), 12% chez le chien (31), 21% chez la souris (32). Chez l'homme, l'administration orale de glucosamine sulfate à la dose de 7,5 g conduit à des concentrations plasmatiques en dessous de la limite de quantification de la méthode de chromatographie ionique. L'utilisation par voie orale de 314 mg de Glucosamine marquée au C_{14} a permis de mettre en évidence un temps de latence de 1,5 h avant apparition de la molécule au niveau plasmatique, une vitesse d'absorption faible de 0,24

h^{-1} et un maximum de concentration plasmatique 9 h après l'administration et une biodisponibilité orale de 44% (33,34). L'utilisation de LC/MS avec une limite de quantification très importante a permis de mettre en évidence une pharmacocinétique linéaire pour des doses de 300 mg à 1500 mg mais pas pour 3000 mg et un temps de concentration maximal de 3 à 4 h à l'état d'équilibre après administration 1 fois/jr d'une poudre soluble (35). Les données de perméabilité apparente et effective, obtenues au cours de notre étude, sont en accord avec les données de la littérature. Une faible quantité de produit est absorbée, avec une vitesse très lente, conduisant à un maximum de concentration décalé dans le temps malgré la grande solubilité de la substance active. Ces données confirment la faible perméabilité de la glucosamine.

Toutefois le mécanisme d'absorption de la glucosamine et la faible biodisponibilité doivent encore être clarifiés. Les études d'absorption effectuées *in vitro* et *in vivo* chez le rat démontrent une absorption linéaire de la glucosamine, préférentiellement au niveau du duodénum. Cette absorption n'est pas influencée par le glucose mais le transport de la glucosamine est significativement réduit avec la quercétine. L'absorption est en partie un transport facilité faisant intervenir le transporteur GLUT2 (36).

Le fait que la glucosamine soit absorbée par transport facilité dans les différents segments du tractus gastrointestinal ne permet pas d'expliquer la faible biodisponibilité. Mais la forte concentration en glucose (5g/L) utilisée dans le milieu des tests de perméabilité pourrait expliquer la faible perméabilité due à l'éventuelle compétition entre le glucose et la glucosamine pour l'absorption au niveau du transporteur GLUT2.

Les premières études considéraient que plus de 80% du produit était absorbé, compte tenu de la faible quantité retrouvée dans les fèces et attribuaient la faible biodisponibilité après administration orale à un fort premier passage hépatique. Les études récentes ont mis en évidence une possible implication du microbiote sur la perte de glucosamine au niveau intestinal chez la souris et chez l'homme (36,37). La confiance dans les conclusions, issues de l'analyse de différentes études chez l'homme ou l'animal, est modérée pour l'association entre l'exposition à la glucosamine et l'augmentation de l'abondance du genre bactéroïdes chez la souris, de faible qualité pour l'association glucosamine et augmentation des bactéries de la famille S24-7 (bactéroïdes) et une diminution des lactobacilles.

Les mécanismes d'interaction avec le microbiote seraient dues à des phénomènes de biotransformation. La glucosamine serait rapidement phosphorylée à l'intérieur des cellules pour former de la glucosamine-6-phosphate, qui entre dans les voies de formation des protéoglycanes, glycolipides et glycoprotéines. Ainsi une partie de la glucosamine administrée par voie orale serait utilisée par les entérocytes pour la formation de mucine (glycoprotéine de

la muqueuse intestinale). De plus, la glucosamine-6-phosphate peut être transformée en fructose-6-phosphate et en ammoniacque par le biais de la glucosamine-6-phosphate désaminase. Cette biotransformation a lieu dans les bactéries majoritairement retrouvées dans à l'intestin humain (38).

Les données sur l'efficacité de la glucosamine dans le traitement de l'arthrose sont aussi sujet à controverse. La majorité des études publiées avec la glucosamine utilise du sulfate di-sodique, décrit comme glucosamine cristalline, en opposition au chlorhydrate de glucosamine. Cette forme de glucosamine cristalline est brevetée, il s'agit d'une substance pure, synthétisée à partir de chitine marine, dans laquelle la glucosamine, le sulfate, le chlore et le sodium sont dans des proportions stœchiométriques de 2:1/2:2 respectivement. Selon certaines études, seule cette forme de glucosamine a prouvé son efficacité et les administrations de chlorhydrate de glucosamine seraient sans effet significatif pour le traitement de l'arthrose (28). Dans d'autres études, malgré l'absence de réduction de la douleur comparativement au placebo, le chlorhydrate de glucosamine aurait un effet bénéfique chez certains patients (39). Les propriétés physicochimiques et biopharmaceutiques des différents types de glucosamine ne peuvent expliquer ce résultat. L'hétérogénéité des résultats obtenus dans les différentes études publiées proviendrait de la mauvaise qualité des informations des études : hétérogénéité dans la qualité des matières premières et des produits étudiés produits, dosage et posologie différentes, co-administration d'autres produits, biais d'étude dans le choix des sujets, études sponsorisées par les fabricants, une tendance générale à ne publier que des résultats positifs (40).

Une étude comparative entre différents compléments nutritionnels à base de glucosamine et chondroïtine (généralement associés dans les compléments alimentaires) et deux spécialités pharmaceutiques à base de chondroïtine sulfate a mis en évidence l'hétérogénéité des produits proposés. Parmi les 25 compléments alimentaires provenant de 8 pays européens différents et de 10 compagnies différentes, 19 avaient des taux de substance inférieures à la dose déclarée (jusqu'à -60%) et tous les produits étaient contaminés par du sulfate de kératane (jusqu'à 47%) présent à l'origine dans le cartilage des animaux et extrait avec la chondroïtine (41).

Ces différents résultats ou l'absence d'informations concernant la glucosamine seule ou associée avec la chondroïtine mettent en lumière le problème d'absence de législation stricte concernant la qualité des matières premières et des formulations de compléments alimentaires. Contrairement aux spécialités pharmaceutiques pour lesquelles une monographie est le plus souvent disponible au niveau de la pharmacopée pour la substance active, il n'existe pas de normes rigoureuses concernant la qualité des matières premières pour les nutraceutiques. En l'absence de contrôles analytiques obligatoires, comme c'est le cas dans le domaine

pharmaceutique, chaque fabricant peut établir sa propre procédure analytique en ce qui concerne l'identification, la pureté et la quantité de produit dans le complément alimentaire (42).

L'utilisation systématique de méthodes de caractérisation (IF, RMN, DRX..) ou de dosage (HPLC, MS) associées à l'étude des propriétés physiques des poudres et l'évaluation des propriétés biopharmaceutiques des produits formulés (dissolution *in vitro*) permettrait d'étayer les preuves d'innocuité et de tolérance des produits et de proposer au patient une formulation dont la biodisponibilité serait maximale et constante.

V. Conclusion

Compte tenu de la grande solubilité et de la grande perméabilité de la caféine, elle peut être considérée comme une classe 1 dans la classification biopharmaceutique ce qui est en accord avec les données publiées. Après administration orale d'une forme à libération immédiate, toute la dose peut se dissoudre, quel que soit le pH physiologique, et la fraction absorbée est très importante. L'origine de la caféine n'a pas d'impact sur sa biodisponibilité et seule une modification de la matrice d'administration (forme avec une libération inférieure à 80% en 15 ou 30 minutes ou volontairement à libération modifiée par exemple) pourrait entraîner des variations de biodisponibilité et d'interchangeabilité.

Dans le cas de la glucosamine, les études de solubilité, dissolution et perméabilité apparente et effective conduisent à la positionner comme une molécule de classe 3 dans la classification biopharmaceutique. Là encore, les données obtenues rejoignent les résultats de la littérature et mettent aussi en évidence l'importance de la matrice d'administration et la qualité du produit administré sur les éventuelles modifications de biodisponibilité.

L'ensemble de ces résultats permet aussi de mettre en évidence la pertinence des outils utilisés pour déterminer la classe biopharmaceutique des produits. La solubilité dans les milieux de différents pH, associée à la vitesse de dissolution, permet de quantifier le paramètre solubilité de la classification avec une prédictibilité évidente. La culture de cellules Caco-2 permet d'avoir un accès direct et facile aux côtés apical et basal de l'épithélium intestinal, permettant d'évaluer les échanges entre ces deux compartiments, il permet de calculer la perméabilité apparente des produits étudiés. L'utilisation de la méthode de l'intestin isolé permet de se rapprocher des conditions *in vivo* et d'estimer la perméabilité effective dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal et de compléter les informations fournies par le système Caco-2.

La détermination de la classification biopharmaceutique pour les nutriments en utilisant pour la perméabilité les cellules Caco-2 et l'intestin isolé, est une approche qui, associée à la caractérisation physicochimique de la substance active et la détermination de la dissolution des formes développées, permet d'évaluer l'efficacité de l'absorption orale et de prédire ou limiter les risques de problèmes de biodisponibilité.

VI. Références

1. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* mars 1995;12(3):413-20.
2. FDA C for DE and. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance. FDA [Internet]. 2 août 2019 <https://www.fda.gov/about-fda/center-drug-evaluation-and-research-cder/biopharmaceutics-classification-system-bcs-guidance>
3. EMA. Investigation of bioequivalence Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/. 2018.
4. EMA. ICH M9 on biopharmaceutics classification system based biowaivers. 2018.
5. Lennernäs H. Human jejunal effective permeability and its correlation with preclinical drug absorption models. *J Pharm Pharmacol.* juill 1997;49(7):627-38.
6. Astrup A, Toubro S, Cannon S, Hein P, Breum L, Madsen J. Caffeine: a double-blind, placebo-controlled study of its thermogenic, metabolic, and cardiovascular effects in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr.* mai 1990;51(5):759-67.
7. Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci.* avr 2010;75(3):R77-87.
8. Wilson T, Temple NJ, éditeurs. *Beverages in Nutrition and Health.* Humana Press; 2004 (Nutrition and Health). [Internet] <https://www.springer.com/gp/book/9781588291738>
9. PubChem Database C. National Center for Biotechnology Information. , CID=2519, [Internet]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>
10. EFSA Journal 2015;13(5):4102. Scientific Opinion on the safety of caffeine. 2015;13(5):4102.
11. Henrotin Y, Marty M, Mobasher A. What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? *Maturitas.* juill 2014;78(3):184-7.
12. PubChem Database. D-G. National Center for Biotechnology Information. CID=439213, [Internet]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Glucosamine>
13. Agiba AM. Nutraceutical formulations containing glucosamine and chondroitin sulphate in the treatment of osteoarthritis: emphasis on clinical efficacy and formulation challenges. *Int J Curr Pharm Res.* 1 mars 2017;1-7.
14. Roman-Blas JA, Castañeda S, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Herrero-Beaumont G. Combined Treatment With Chondroitin Sulfate and Glucosamine Sulfate Shows No Superiority Over Placebo for Reduction of Joint Pain and Functional Impairment in Patients With Knee Osteoarthritis: A Six-Month Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(1):77-85.

15. EFSA Journal 2009;7(9):1264. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to glucosamine alone or in combination with chondroitin sulphate and maintenance of joints (ID 1561, 1562, 1563, 1564, 1565) and reduction of inflammation (ID 1869) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA J. 2009;7(10):1264.
16. Pharmacopée européenne 10.2. 2.9.43. Dissolution apparente p437 [Internet]. https://www.edqm.eu/sites/default/files/supplement_pheur-index_9-2_fr-2016.pdf
17. Qiang Z, Ye Z, Hauck C, Murphy PA, McCoy J-A, Widrlechner MP, et al. Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers. J Ethnopharmacol. 11 oct 2011;137(3):1107-12.
18. G Garrait, Jarrige J-F, Blanquet S, Beyssac E, Cardot J-M, Alric M. Gastrointestinal Absorption and Urinary Excretion of trans -Cinnamic and p -Coumaric Acids in Rats. J Agric Food Chem. 2006;54(8):2944–50. 2006;
19. Martin B,. Dispersions aqueuses d'organogel pour la délivrance orale de substances actives, Doctorat d'Université, Université Paul Sabatier, Toulouse, 2017.
20. Koblová P, Sklenářová H, Brabcová I, Solich P. Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of ascorbic acid, phenylephrine, paracetamol and caffeine using a monolithic column. Anal Methods. 31 mai 2012;4(6):1588-91.
21. Nagarajan P, Dinakaran SK, Ghosh S, Avasarala H, Nallayya M, Banji D. Method Development and Validation for Glucosamine and Chondroitin Sulphate in Softlet Form by RP-HPLC. 2013;
22. Wytenbach N, Alsenz J, Grassmann O. Miniaturized assay for solubility and residual solid screening (SORESOS) in early drug development. Pharm Res. mai 2007;24(5):888-98.
23. Kerns EH, Di L, Petusky S, Farris M, Ley R, Jupp P. Combined Application of Parallel Artificial Membrane Permeability Assay and Caco-2 Permeability Assays in Drug Discovery. J Pharm Sci. 1 juin 2004;93(6):1440-53.
24. L S, V S, D K, J K, J S, Z S. Caco-2 cells and Biopharmaceutics Classification System (BCS) for prediction of transepithelial transport of xenobiotics (model drug: caffeine). Neuro Endocrinol Lett. 1 janv 2009;30 Suppl 1:101-5.
25. Gasbarrini G, Montalto M. Structure and function of tight junctions. Role in intestinal barrier. Ital J Gastroenterol Hepatol. sept 1999;31(6):481-8.
26. Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. Pharm Res. juin 1997;14(6):763-6.
27. Carrillo JA, Benitez J. Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications. Clin Pharmacokinet. août 2000;39(2):127-53.
28. Rovati LC, Girolami F, Persiani S. Crystalline glucosamine sulfate in the management of knee osteoarthritis: efficacy, safety, and pharmacokinetic properties. Ther Adv Musculoskelet Dis. juin 2012;4(3):167-80.

29. Wan MD, Volpi G. Method of preparing mixed glucosamine salts. US5847107A, 1998 [Internet] <https://patents.google.com/patent/US5847107A/en>
30. Du J, White N, Eddington ND. The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate after oral and intravenous single dose administration in the horse. *Biopharm Drug Dispos.* avr 2004;25(3):109-16.
31. Adebowale A, Du J, Liang Z, Leslie JL, Eddington ND. The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and low molecular weight chondroitin sulfate after single and multiple doses to beagle dogs. *Biopharm Drug Dispos.* 2002;23(6):217-25.
32. Aghazadeh-Habashi A, Sattari S, Pasutto F, Jamali F. Single dose pharmacokinetics and bioavailability of glucosamine in the rat. *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Soc Can Sci Pharm.* août 2002;5(2):181-4.
33. Setnikar I, Rovati LC. Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of Glucosamine Sulfate. *Arzneimittelforschung.* sept 2001;51(09):699-725.
34. Setnikar I, Palumbo R, Canali S, Zanolo G. Pharmacokinetics of glucosamine in man. *Arzneimittelforschung.* oct 1993;43(10):1109-13.
35. Persiani S, Roda E, Rovati LC, Locatelli M, Giacobelli G, Roda A. Glucosamine oral bioavailability and plasma pharmacokinetics after increasing doses of crystalline glucosamine sulfate in man. *Osteoarthritis Cartilage.* déc 2005;13(12):1041-9.
36. Ibrahim A, Gilzad-kohan MH, Aghazadeh-Habashi A, Jamali F. Absorption and bioavailability of glucosamine in the rat. *J Pharm Sci.* juill 2012;101(7):2574-83.
37. Shmagel A, Demmer R, Knights D, Butler M, Langsetmo L, Lane NE, et al. The Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Gut Microbial Composition: A Systematic Review of Evidence from Animal and Human Studies. *Nutrients.* 30 janv 2019;11(2).
38. Oliva G, Fontes MR, Garratt RC, Altamirano MM, Calcagno ML, Horjales E. Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure.* 1 déc 1995;3(12):1323-32.
39. Houghton JB, McMillan R, Wein C, Paget-Dellio SD. Effect of glucosamine hydrochloride in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol.* nov 1999;26(11):2423-30.
40. Vasiliadis HS, Tsikopoulos K. Glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis. *World J Orthop.* 18 janv 2017;8(1):1-11.
41. Restaino OF, Finamore R, Stellavato A, Diana P, Bedini E, Trifuoggi M, et al. European chondroitin sulfate and glucosamine food supplements: A systematic quality and quantity assessment compared to pharmaceuticals. *Carbohydr Polym.* 15 oct 2019;222:114984.
42. Burns DT, Walker MJ, Mussell C. Chondroitin Sulfate: A Critical Review of Generic and Specific Problems in Its Characterization and Determination-An Exemplar of a Material with an Unknown or Variable Composition (UVCB). *J AOAC Int.* 1 janv 2018;101(1):196-202.

CHAPITRE IV

Application de la classification biopharmaceutique des médicaments à des ingrédients nutraceutiques liposolubles

Etude de cas : le resveratrol

Impact of critical quality attributes on interchangeability and bioavailability of BCS Class 2 nutritional ingredients: application to resveratrol

I. Introduction

Dietary or nutritional supplements are now becoming increasingly popular and the global marketplace has consistently been growing for more than 3 decades. They are defined as concentrated sources of nutrients, with a nutritional or physiological effect, that are marketed in forms of drug dosage forms such as tablets, capsules, or powders especially. They are intended to correct nutritional deficiencies, maintain an adequate intake of certain nutrients or to support specific physiological functions. A wide range of phytonutrients and other ingredients may be used in dietary supplements, including vitamins, minerals, fish oils, probiotics, plant preparation, active compounds extracted from plants, enzymes, amino acids and protein powders (1). Despite their potential pharmacological effect, they are not medicinal products (2) and therefore they do not need approval from the health authorities such as European Medical Agency (EMA) and Food and Drug Administration (FDA) (3). In such conditions, compared to drugs, they do not have the same standard quality and they do not need to prove their efficacy and safety prior to marketing (4).

One of the major issues concerning dietary supplements are their safety and their bioavailability, depending of sources of nutrients and matrices of administration (e.g. dosage form, type of excipients, manufacturing process). Bioavailability is a pharmacokinetic term; measuring the fraction of the administered dose which reaches circulatory system for further distribution into tissues in order to become biologically available for exerting healthy functions (5,6). Extended to nutritional supplement, it could be defined as the fraction, from the ingested nutraceutical, that becomes accessible to absorption at the level of the gastrointestinal tract, is metabolized, and distributed to the organs and tissues (7). After oral administration of a dietary supplement, the first step is the release of the bioactive compound from the dosage form administered (tablet, capsule) and its solubilisation in the biological fluid of the gastrointestinal tract. The absorption of the solubilized compound through the intestinal epithelial membrane, mainly in the small intestine, is the second step; this will lead to the transfer of the bioactive substance into the systemic circulation and further distribution in organs and tissue (8,9). Several factors limit the oral bioavailability of bioactive compounds in dietary supplement i) physicochemical properties of the compound (physical state, particle size, solubility,

dissolution rate...), ii) release from the dosage form (amount and type of excipient, process parameters, accelerated or sustained release, iii) biopharmaceutical properties of the compound (lipophilicity, permeability, type of absorption) (10). Bioavailability is the result of combination of solubility and lipophilicity of biomolecules and for poorly soluble and/or poorly permeable compounds; any change in one of these factors could enhance or decrease the bioavailability and the expected effect. Most nutraceuticals come from natural sources or chemical synthesis but there is also a tremendous development on synthetic biology approach. According to the origin of the product, they could present differences in chemical structure and different water solubilities that would dramatically influence their *in vivo* behaviour (11).

This is particularly important for poorly soluble compounds such as resveratrol which is largely used in nutritional supplements. Among the different phytonutrients, resveratrol gains a lot of interest for its potential preventive actions in human disease (12). Resveratrol is a natural polyphenolic compound that can be found mostly in grapes and many other red fruits. At first, resveratrol attracted little interest until 1992, when it was speculated to be related with the cardioprotective effects of red wine (13). In the last decade, studies on resveratrol were increased significantly because of its demonstrated beneficial effects on health. Many cell culture studies have shown that resveratrol has anti-oxidative, anti-aging, anti-diabetic, anti-inflammatory, anti-obesity, neuroprotective and cardio-protective properties (14,15). Numerous biochemical mechanisms have been proposed to account for this ability, including antioxidant activity, modulation of nitric oxide biosynthesis and activity, alteration of cell-to-cell interactions, and inhibition of platelet COX-1 (16). Resveratrol has a very low oral bioavailability due to its poor water solubility, which reduces the dissolution-rate limited cell absorption and to other pharmacokinetic mechanisms such as a high biotransformation via conjugation pathways (17,18). Actually on the market, resveratrol is available on many forms such as natural compound extracted from red grapes, synthetic even water soluble forms.

The aim of the study is to compare the characteristics parameters of different batches of resveratrol, from different origins, by studying and comparing their physicochemical properties including chemical structure, solubility and dissolution rate and their permeability properties in order to evaluate the potential influence of quality of the bioactive compound on bioavailability.

II. Materials and methods

I.1 Resveratrol

Six food grade of Resveratrol powder samples were purchased from different suppliers with four specifications: Natural 98% (*polygonum cuspidatum* extract), Artificial 99%, water soluble 10% and Natural raw extract 50% (*polygonum cuspidatum* extract). Different batches of the same specification were also available. Finally, eleven samples of resveratrol, gathered in table1 are available for the study.

Batch number	01	02 - 03	04 – 05 - 06	07	08 -09 - 10	11					
Specifications	98% Natural	99% Artificial	98% Natural	Water Soluble 10%	98% Natural	50% Natural					
Origin	PCPE*	Synthetic	PCPE*	Resveratrol + Maltodextrin	PCPE*	PCRE**					
Apparence											

* PCPE: *polygonum cuspidatum* purified extract

** PCRE: *polygonum cuspidatum* raw extract

Table 1 Resveratrol specifications and origins

II.1 Reagent

All chemicals and solvents used in this study were HPLC or laboratory analytical reagent grade. Sodium chloride, Hydrochloric Acid 37%, Acetic Acid, HPLC water, Acetonitrile and Sodium hydroxide were purchased from Fisher Scientific. Sodium Acetate was purchased from Sigma Aldrich and Potassium Phosphate Monobasic was purchased from Acros Organics.

II.2 FTIR analysis

FTIR measurements were performed at room temperature using a Shimadzu iraffinity-1 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). A background signal was acquired by scanning an empty sample because absorption intensity is relative. Resveratrol samples were placed on

the top of the diamond ATR sampling unit directly in their powder form. The scanning ranged from 4000 cm^{-1} to 0 cm^{-1} and each spectrum was obtained using 80 scans.

II.3 ^1H NMR

^1H NMR Nuclear magnetic resonance spectra were performed using Bruker DRX 500 spectrometer (500 MHz for ^1H) (Bruker Biospin SAS, Wissembourg, France). Resveratrol samples were prepared at 10 mg/mL in DMSO- d_6 (Dimethyl sulfoxide). Chemical shift values (δ) were quoted in parts per million (ppm) and calibrated to the deuterated solvent reference peak. Coupling constants (J) were quoted in Hz.

II.4 Powder X-Ray Diffraction

Resveratrol samples were analyzed using a Philips X'PERT diffractometer equipped with a "Cu- $K\alpha$ " source, with the 2θ angle set between 5° and 30° and $1.228^\circ/\text{min}$ scanning speed. Radiations were generated at 30mA and 40 kV.

II.5 Particle size measurement

Particle sizing was performed using Malvern Mastersizer 3000 laser diffraction particle size analyzer. The measurement was obtained by putting Resveratrol powder in the Aero S dry powder disperser. The results of three successive analyzes were volume based, and the mean volume diameters Dv10, Dv50 and Dv90D were selected to represent the average diameter particles. Mastersizer 3000 software was used.

II.6 Solubility and dissolution experiments

II 6.1 Preparation of dissolution media

Dissolution media used in solubility and apparent dissolution rate study were buffer solutions, corresponding to the three pH studied in biopharmaceutical classification system determination, pH 1.2, pH 4.5 and pH 6.8. These dissolution media were prepared according to the European Pharmacopoeia (19).

II 6.2 Solubility study

Solubility study consists of evaluating the saturation concentration according to the excess substrate addition method (20,21). An excess amount of resveratrol from every batch was added

to safelight flask of 100 mL, and then filled with either pH 1.2, pH 4.5 or pH 6.8 buffers. Flasks were stirred for 24 hours in a water bath at 37 ° C then solutions were centrifuged at 3000 rpm to get the supernatant of each solutions in order to measure the maximal concentration of resveratrol dissolved. Each batch was measured in triplicates (n=3).

II 6.3 Dissolution study

Dissolution test was performed using the USP apparatus 4 (CE 7 Smart with CP7 piston pump, Sotax AG, Switzerland) with 12 mm (Sotax part number 8820) flow cells. Each cell was prepared by putting a 5-mm ruby bead in the apex of the cone then filled with 1 mm glass beads without exceeding the gauge indicated on the cell, 100 mg of Resveratrol sample was put above the glass bead bed in triplicates (n=3) for each batch. The temperature of the flow cell unit was $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ and the flow rate through cells was fixed at 20 mL/min, all in a closed-loop of 500 mL of pH 6.8 buffer. 1 mL of sample volume was took each 15 min than replaced with media.

II.7 Evaluation of apparent permeability with Caco-2cells

II 7.1 Cell culture

Caco-2 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). They were cultured on a microporous insert membrane of 0.4 μm pore size. Inserts used in this experiment were 12 wells Transwell® inserts with a polycarbonate membrane of 3 μm and a well's surface area of 1.12 cm^2 .

In each well, $5 \cdot 10^5$ cells were seeded at passage 52 then incubated for 21 days with complete DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) supplemented with 15% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine) that was changed every 3 days for two weeks then every day in the last week. After this culture period, cells were differentiated at a maximum level and form a monolayer isolating the upper (Apical) and lower (Basolateral) of the culture chambers.

II 7.2 Caco-2 assay

One of each Resveratrol specification was selected for this experiment, Resveratrol 02 (Rsv02) for the artificial Resveratrol 06 (Rsv06) for the natural pure extract, Resveratrol 07 (Rsv07) for the water soluble and Resveratrol 11 (Rsv11) for the natural raw extract.

After complete differentiation of the monolayer Caco-2 cells, complete DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) was replaced with PBS, for analytical reasons, in both sides of the wells, where the basolateral side was filled with 1.5 mL and the apical side containing the cells, was washed 3 times with PBS then filled with Resveratrol suspensions to be tested.

Resveratrol suspensions (1mg/mL) were prepared in PBS and preheated to 37 °C, a volume of 0.5 mL was deposited on the apical side (n=3) for each batch. 100µL. Samples (100µL) were taken every 15 min for 2 hours from the basolateral side of each well and replaced with 100 µL of fresh PBS to maintain the volume of 1.5 mL. All samples were analyzed with an HPLC validated method.

Results are presented as apparent permeability coefficient P_{app} expressed in (cm.s⁻¹) and calculated for the 120 min period of the experiment according to Equation [1]

$$P_{app} \text{ (cm. s}^{-1}\text{)} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{AC_0} \quad [1]$$

Where (dQ/dt) is the flux of the compound across the cells (mol.s⁻¹),

C_0 is the initial concentration at t_0 (mol.mL⁻¹),

and A is the surface area of the monolayer (1.12 cm² in this case).

Recovery rates were calculated as controls of compound adsorption to cells and/or support, according to Eq. [2] as indicated in Hubatsch et al. (22), to verify the mass balance:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{Q_{basolateral_{t120}} + Q_{apical_{t120}}}{Q_{apical_{t0}}} \quad [2]$$

Where $Q_{basolateral_{t120}}$ is the total quantity in the basolateral compartment at 120 min, $Q_{apical_{t120}}$ is the total quantity remaining in the apical compartment at 120min and $Q_{apical_{t0}}$ is the initial quantity put in the apical compartment.

II 7.3 Evaluation of the membrane integrity and cells viability

II 7 3 a) TEER (Trans Epithelial Electrical Resistance) determination

TEER values of the monolayers were measured using EVOM2 (World Precision Instrument) Volt-Ohm Meter to verify the monolayers confluence and integrity, it informs about the tight junctions formation between cells (22). Cell monolayers with a TEER values at 37C° below 500 Ωcm² are discarded (23). TEER measurement was recorded throughout incubation at every sampling time and 48h after the experiment as a measure of cell viability and monolayer

integrity. At the end of the experiment, permeability studies were stopped by removing the apical medium and washing the cells three times with PBS. Immediately fresh complete DMEM incubated at 37°C was replaced. The monolayers were allowed to regenerate for 48 h at 37°C in an atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂ at 90% relative humidity.

Variation of TEER (%), compared to initial values, is calculated according to Equation [3].

$$TEER (\%) = \frac{TEER (t)}{TEER (t_0)} \times 100 \quad [3]$$

II 7 3 b) Cell viability test

The viability of the cells, in the presence of resveratrol suspensions, was evaluated by trypan blue exclusion (final concentration of 0.4% in PBS) (24). Cell viability is calculated as the number of viable cells divided by the total number of cells (Equation [4]), within the grids on the kova slide using trypan blue exclusion test. Cells were visually quantified under microscope to determine whether they took up or excluded the colorant. The cells that have clear cytoplasm are considered viable cells and the ones that have blue cytoplasm are considered nonviable cells.

$$\% Viability = \frac{(Number\ of\ viable\ cells)}{(Total\ number\ of\ cells)} \times 100 \quad [4]$$

II.8 Evaluation of effective permeability

II 8.1 Animals

Animals used in this study were adult males Wistar rats (Centre d'Élevage Charles Ricer, Saint-Germain-Nuelles, France) of 400 ± 20 g weight. They were housed for an acclimation period of an average of 5 days in a temperature controlled room ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) and were maintained on a 12h light/12h dark routine cycle (lights on from 8:00 a.m. to 8:00 p.m.). Animals had free access to a commercial pelleted standard diet (A04, UAR, Epinay-sur-Orge, France) and tap water. All care and handling of animals were performed with the approval of the Committee for Ethical Issues.

II 8.2 Preparation of excised jejunum segments

To increase intestine sensitivity and to reduce intestinal residue, rats were put on fasting for the last 24h before the experiment. Rats were anesthetized using Imalgene 1000® (150 $\mu\text{L}/100$ g of rat weight). After laparotomy and clipping of the coeliac artery, six jejunum segments (10 cm length) were taken off and rinsed with 10 mL of normal saline maintained at 37°C . After drying on paper towel, the different organs were weighted. One end of the organ segment was ligated, the other one being for the introduction of resveratrol suspensions.

II 8.3 Intestinal permeability study

Resveratrol suspensions prepared in Krebs Henseleit buffer (1 mL, corresponding to 1mg/mL of resveratrol) were introduced into the mucous side of each organ. Then the second end of the jejunum was ligated and the jejunal sacs were weighted. The sacs were rinsed with 10 mL of Krebs Henseleit modified buffer (composition in mmol/L: 118.1 NaCl, 4.7 KCl, 2.2 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 MgSO_4 , 1.2 KH_2PO_4 , 25.0 NaHCO_3 , and 11.1 glucose, pH 7.5), then transferred into a tissue chamber containing 12 mL of warmed (37°C), oxygenated (95% $\text{O}_2/5\%$ CO_2) Krebs Henseleit buffer. Every 15 min, 100 μL medium samples were collected from the serosal side and centrifuged (10 000g, 5 min) before HPLC analysis. Sampling was performed until 120 min incubation period corresponding to the viability for rat material (25).

Results are presented as effective permeability coefficient P_{eff} expressed in ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$) and calculated for the 120 min period of the experiment according to Equation [5]

$$P_{\text{eff}} (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}) = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{2\pi r L C_0} \quad [5]$$

Where (dQ/dt) is the flux of the compound across the intestinal segment ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$), C_0 is the initial concentration at t_0 ($\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$), and $2\pi rL$ is the surface area of the intestine with r the radius of the intestine (0.25 cm) and L the length of the segment (10 cm).

II.9 HPLC analysis

Quantification of resveratrol was measured by liquid chromatography (HPLC), using a method adapted from Katsagonis *et al.* (26). InterChim® C18 column with dimensions of 150×4.6 mm i.d. packed with $3.5 \mu\text{m}$ particles with a UV detection (VWR-Hitachi HPLC-unit LaChrom Elite, with pump HTA L-2130, Autosampler L-2200 and DAD-detector L-2450) was used. The mobile phase composed acetonitrile: potassium phosphate monobasic 20mM (50:50) was pumped at a flow rate of 1 mL/min. The injection volume was 25 μL .

Standard solution (1mg/mL) were prepared by dissolving 100 mg of resveratrol in 10mL of acetonitrile in a safelight flask then diluted with water to have 100, 50, 20, 10, 5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively to determine the calibration curve. ($r^2 = 0.9997$).

II.10 Statistical analysis

Values are expressed as the mean \pm SD (standard deviation) and the ANOVA (one-way analysis of variance) was used for the calculation of the p-value. The significance level α (alpha) was set as the usual at 0.05 indicating 5% risk so if $p < 0.05$ results are considered to be statistically significant.

II 10.1 Dissolution analysis

Comparison of Resveratrol dissolution kinetics were evaluated with mathematical model independent approach (similarity test f_2) and model dependant approach (dissolution efficiency and Weibull model)

II 10 1 a) Similarity of dissolution profiles

Statistical analysis of the similarity factor f_2 or “similarity fit factor (f_2)”, is described in the different dissolution and investigation of bioequivalence guidelines of EMA and FDA and is requested to compare dissolution profiles (27). An f_2 value, equation 6, greater than 50 means that the two dissolution profiles can be considered as similar (less than 10% difference) (28).

$$f_2 = 50 \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [\bar{R}(t) - \bar{T}(t)]^2}{n}}} \right] \quad [6]$$

Where f_2 is the similarity factor, n is the number of time points, $R(t)$ is the mean percent reference drug dissolved at time t ; $T(t)$ is the mean percent test drug dissolved at time t

II 10 1 b) Dissolution efficiency

The dissolution efficiency is the area under the dissolution curve, between two time points, expressed as a percentage of the curve at maximum dissolution (i.e. 100% dissolved) over the same time interval. Dissolution efficiency, equation [7], is the percentage ratio between the area under curve (AUC) in time t and the AUC of the rectangle representing 100% dissolution at the same time point (29).

$$DE\% = \frac{AUC_0^T}{AUC_{100.T}} \times 100 \quad [7]$$

To compare the different resveratrol batches, the difference in percentage of total dissolution efficiency must comply within 10%, as explained in equation [8]

$$\frac{(\% \text{ DE tablets} - \% \text{ DE OE tablets})}{\% \text{ DE tablets}} \times 100 \quad [8]$$

II 10 1 c) Weibull model

For model dependent, first order Weibull model was used because this model provided the best kinetic curve adjustment (30) calculated with the following equation [9]

$$Q_t = Q_\infty \left[1 - \exp \left(- \frac{t}{MDT} \right)^\beta \right] \quad [9]$$

Where Q_∞ is the amount dissolved at time infinite, MDT is the Mean Dissolution Time to dissolve 63.2% of the substance and β is the shape parameter obtained from the slope. The shape parameter characterizes the curve as exponential ($\beta = 1$), sigmoidal, S-shaped with upward curve followed by turning point ($\beta > 1$), or parabolic with higher initial slope, after that consistent with the exponential ($\beta < 1$) (30).

III. Results and discussion

III.1 FTIR analysis

FTIR results representing the similar spectrums are gathered in figure 1 including all Rsv batches except Rsv07 (water soluble). Spectrum of Resv08 is presented in figure 2 in order to clearly highlight the different specific bands. Spectrums show a band at 3197 cm^{-1} that corresponds to the free O–H stretching vibration, then the following four characteristic bands of the benzene skeleton vibrations at: 1606 cm^{-1} and 1583 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} and 1380 cm^{-1} also, the absorption band at 1445 cm^{-1} is assigned to the O–H in plane vibration of the aromatic ring. The last characteristic band at 964 cm^{-1} represents the C=C–H trans olefinic configuration in Rsv. All these typical absorptions are characteristic of a trans-resveratrol structure, consisting of two phenols joined by a double bond, presented in figure 3, that matches perfectly with what was described in the literature (31–33). There is no structural difference between natural and synthetic resveratrol and all the different origins correspond to trans-resveratrol structure.

Rsv07 spectrum shown in figure 4 presents the same absorption band of the free O–H stretching vibration at 3325 cm^{-1} but the other previous absorption bands of Rsv functions are no longer visible due to the low concentration of Rsv in this batch (10%). A small band appear near the zone of 2895 cm^{-1} that corresponds to the C–H stretching in carbohydrates, then three strong bands appear gathered at 1151 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} and 1024 cm^{-1} corresponding to C–C stretching, C–O stretching of the secondary alcohol and ether function and to O–H bending. A last significant band at 898 cm^{-1} demonstrates the β -glucosidic linkage between dextrin units. These bands appearing highlight a typical structure and functions found in a dextrin or carbohydrates, whom structure and spectrum are presented in figure 5 and 6 respectively (34). These results clearly confirm the 90% of Maltodextrin excipient in this batch.

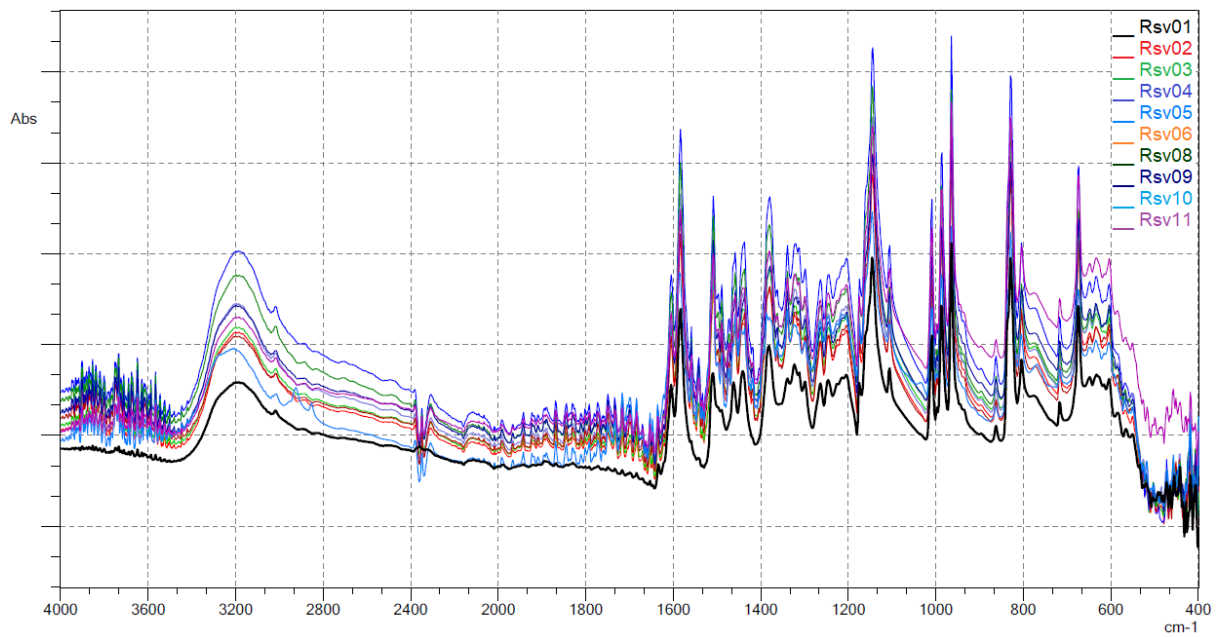


Figure 1 Rsv Spectrums (all batches except Rsv07)

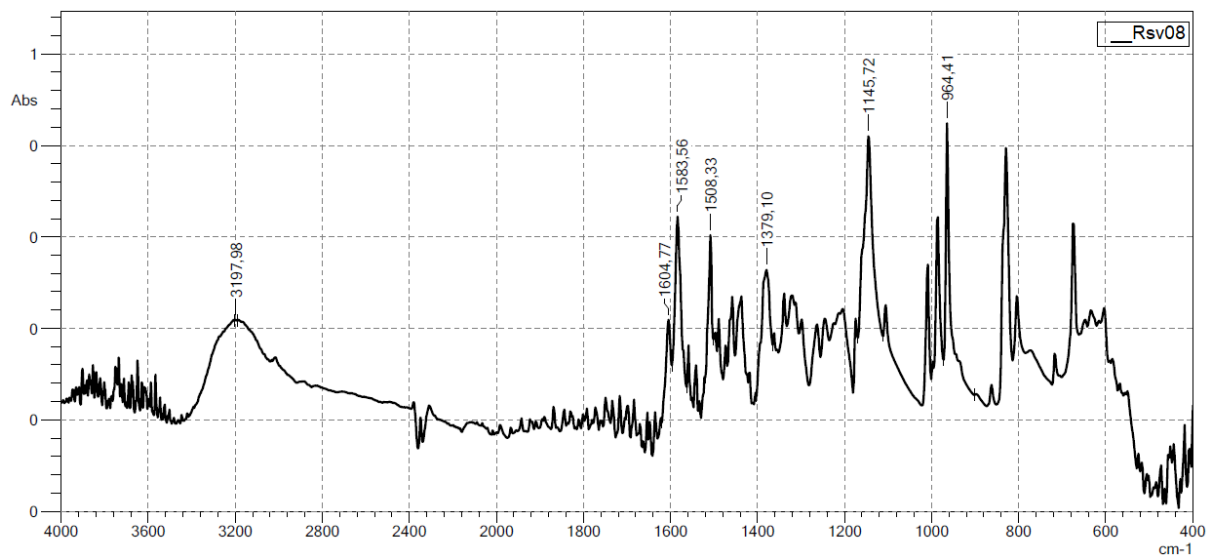


Figure 2 Example of Rsv08 FTIR spectrum with details

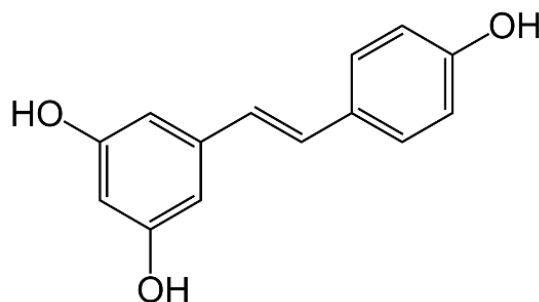


Figure 3 Trans-Resveratrol Structure

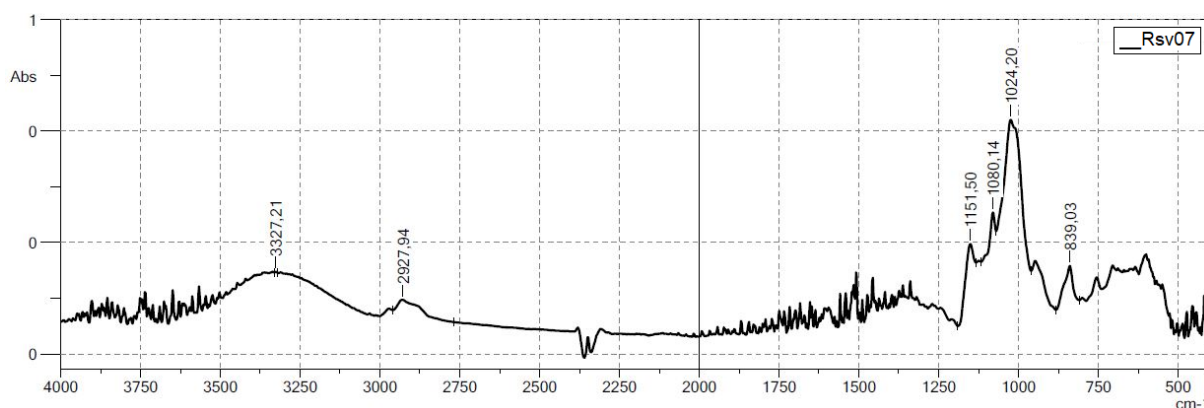


Figure 4 Rsv07 FTIR spectrum

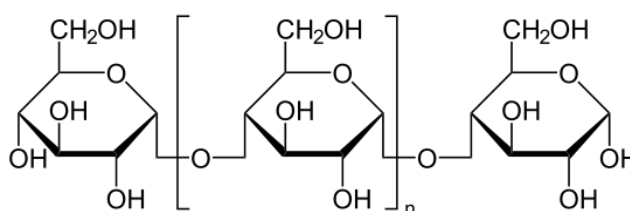


Figure 5 Chemical structure of Maltodextrin

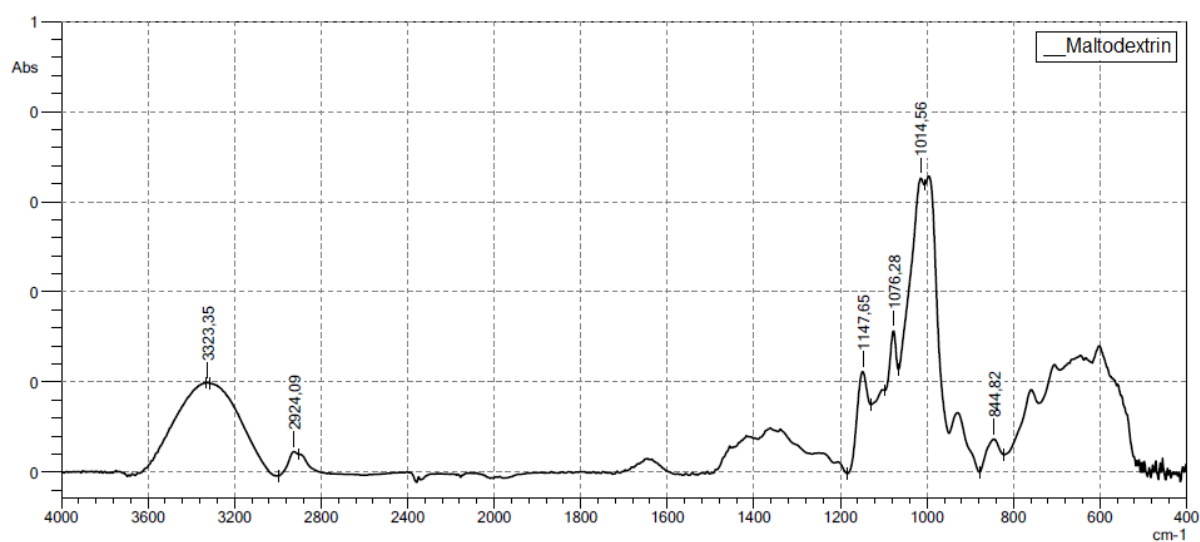


Figure 6 Maltodextrin FTIR Spectrum

III.2 ^1H NMR

Figure 7 shows stacked ^1H NMR spectra obtained for Maltodextrin and Rsv samples in $\text{DMSO-}d_6$. In all spectrums represented, only Rsv07 spectrum (fig07b) presents common peaks with pure Maltodextrin spectrum (fig07a) between 3.5 ppm and 5 ppm, however starting from 6 ppm, We can clearly identify *trans* Rsv peaks with no sign of *cis* configuration in according with the author in Commodari *et al.* (35). In the $^3J_{(H,H)}$ coupling constant of 16.3 Hz between

the ethylenic protons assign at δ 6.92 and 6.81 is consistent with the *trans* orientation of the phenolic rings. Hydroxyls show chemical shifts of 9.55 and 9.26 ppm for the monophenolic and the diphenolic ring respectively. The multiplet skewing allows to assign the para-system at two doublet at δ 7.39 and 6.75 ($^3J_{(H,H)} = 8.6$ Hz). The doublet at δ 6.38 ($^4J_{(H,H)} = 2.2$ Hz) relative to two protons and the triplet at 6.11 ($^4J_{(H,H)} = 2.2$ Hz) defines the substitution pattern of the dimeta-substituted aromatic ring. These results confirm the one obtained with FTIR analysis, there is no structural difference between natural and synthetic resveratrol, all the different origins correspond to *trans*-resveratrol structure and the water soluble resveratrol (Res07) is a mixture or adsorption with maltodextrin.

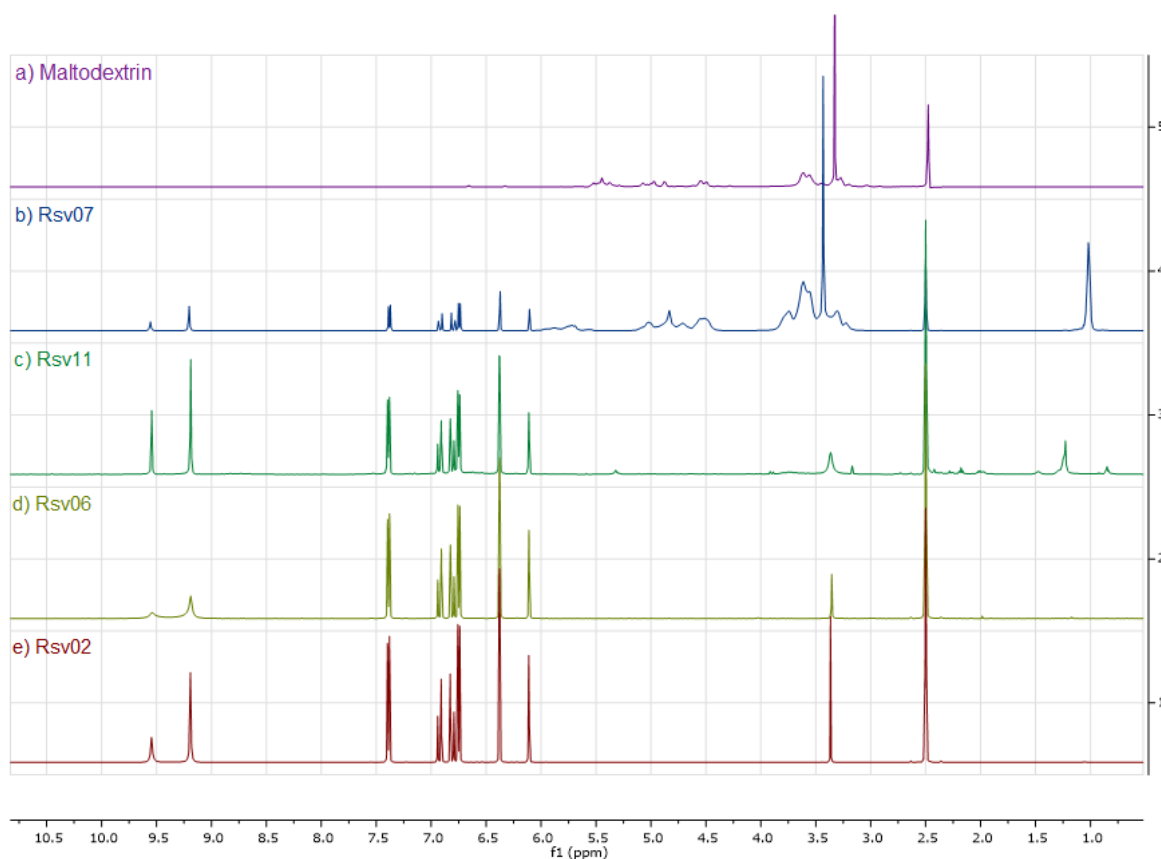


Figure 7 ^1H NMR Nuclear magnetic resonance spectra of: a) Maltodextrin, b) Rsv07, c) Rsv11, d) Rsv06 and e) Rsv02

III.3 Powder X-Ray Diffraction

X-ray diffraction analysis presented in figure 8, was carried out to determine the crystallinity of the different resveratrol samples. All the resveratrol batches, except Rsv07 showed very similar peaks at 2θ values of 6.4, 16.4, 19.2, 22.4, 23.6, 25.3, and 28.4, perfectly fitting the data reported in the literature (36). These results clearly indicate a crystalline polymorphic structure

for all the powders except Rsv07. For Rsv07, there are no Bragg peaks in diffractogram, such a broad diffraction halo is a characteristic feature of totally amorphous materials. Water soluble resveratrol is a mixture of natural resveratrol with maltodextrin (10:90) obtained by spray drying a well-known technic employed to obtain amorphous material and improve solubility of Class2 pharmaceutical compounds (37). As previously determined from FTIR and ^1H NMR analysis, the X-ray diffraction analysis do not exhibit any structural difference between natural and synthetic resveratrol, all the different origins correspond to trans-resveratrol structure.

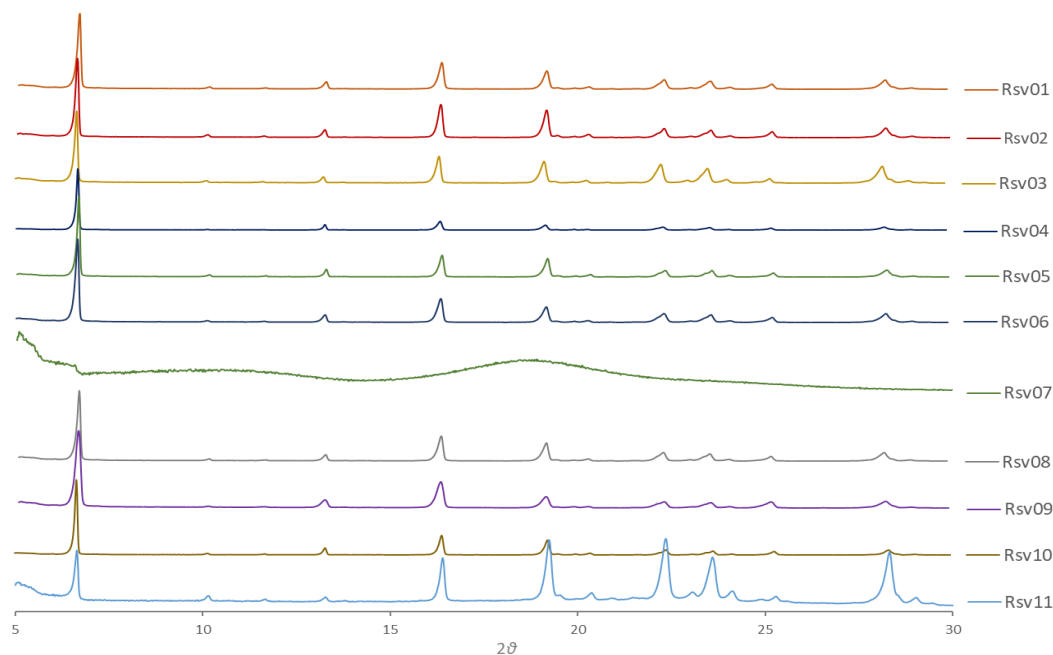


Figure 8 X-ray diffraction spectra of Rsv samples

III.4 Particle size determination

Particle size measurements are presented in figure 9, the distribution of the different batches is displayed in % volume of particles according to their size (μm) expressed in logarithmic scale. The main parameters of distribution Dv10, Dv50 and Dv90 are gathered in table 2.

Whatever the origin of resveratrol, natural or synthetic, all the powders presented small particles, the Dv50 and Dv10 of different batches range from 8.60 μm to 34.4 μm and from 2.45 μm to 9.39 μm respectively. However, Dv90 has a larger range, it goes from 31.5 μm to 789 μm , which is due to a second population of particles that have bigger sizes. These two populations give an asymmetric bimodal shape to the curve, which means, that the second population represents a very small proportion according to the whole volume of the powder. From these results, we can notice that the batches that have the biggest gap between Dv90 and Dv50, have the largest span (*distribution width*) like Rsv05, Rsv06 and Rsv07. In terms of

particle size distribution, this informs about the quality of the powder and demonstrates the poor homogeneity of distribution for these three batches. For Rsv07, these results could be related to the large amount of maltodextrin (around 90%) and the particle size selected for the excipient.

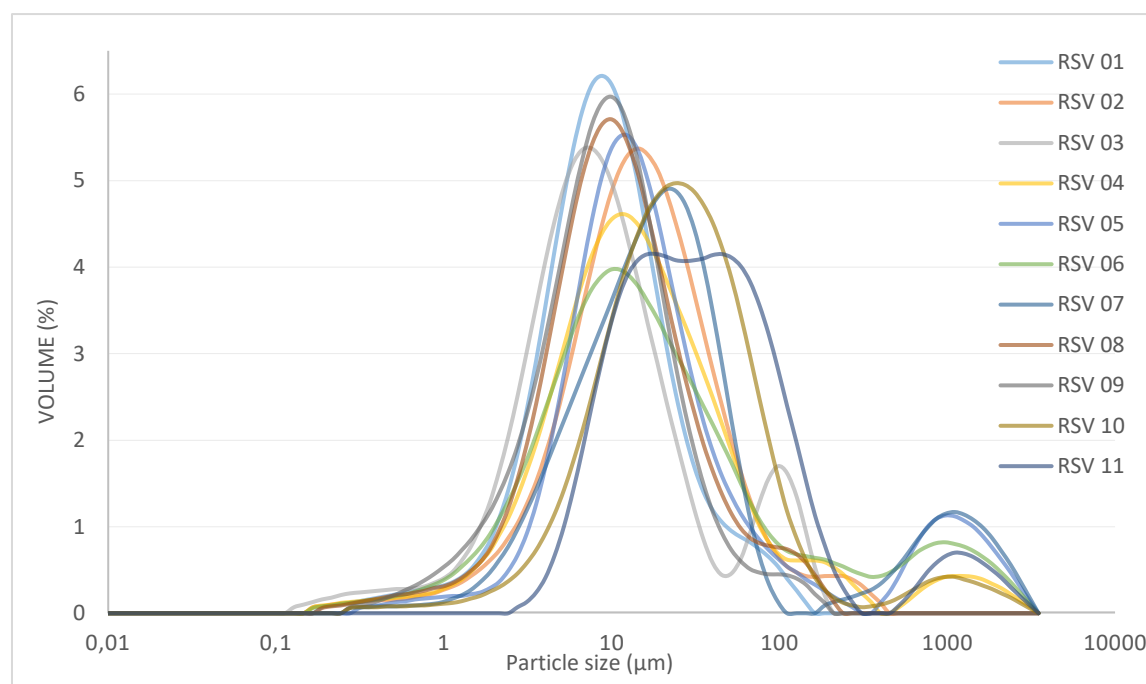


Figure 9 Rsv particle size analysis

	<i>Rsv01</i>	<i>Rsv02</i>	<i>Rsv03</i>	<i>Rsv04</i>	<i>Rsv05</i>	<i>Rsv06</i>	<i>Rsv07</i>	<i>Rsv08</i>	<i>Rsv09</i>	<i>Rsv10</i>	<i>Rsv11</i>
<i>Dv90 (μm)</i>	32.8	57.6	68.0	94.2	710	385	789	44.1	31.5	97.6	154
<i>Dv50 (μm)</i>	9.62	15.6	8.60	14.6	15.9	15.4	21.0	11.2	9.98	26.0	34.4
<i>Dv10 (μm)</i>	3.15	4.06	2.45	3.57	5.19	3.14	4.85	3.38	2.71	6.94	9.39
<i>Span (distribution width)</i>	3.082	3.444	7.624	6.194	10.610	9.324	37.282	3.650	2.911	3.489	4.217

Table 2 Table representing Rsv Distribution Volumes Dv10, Dv50, Dv90 and distribution width (Span) of the different resveratrol batches

Comparison of particle size distribution of the different batches from the same supplier could give an idea of quality and interchangeability about resveratrol powders. Surprisingly, there is more differences between the two synthetic batches (figure 10) than between the natural batches of the same supplier (figure 11 and 12). The synthetic batch Rsv03 has two different particle size populations, one centred on 9μm and the other around 100μm. The variability, of all the different natural resveratrol batches from the same supplier, is very low and there is no different

in term of particle size distribution. Selecting one batch from each supplier allows a better comparison between the different origins of resveratrol (figure 13).

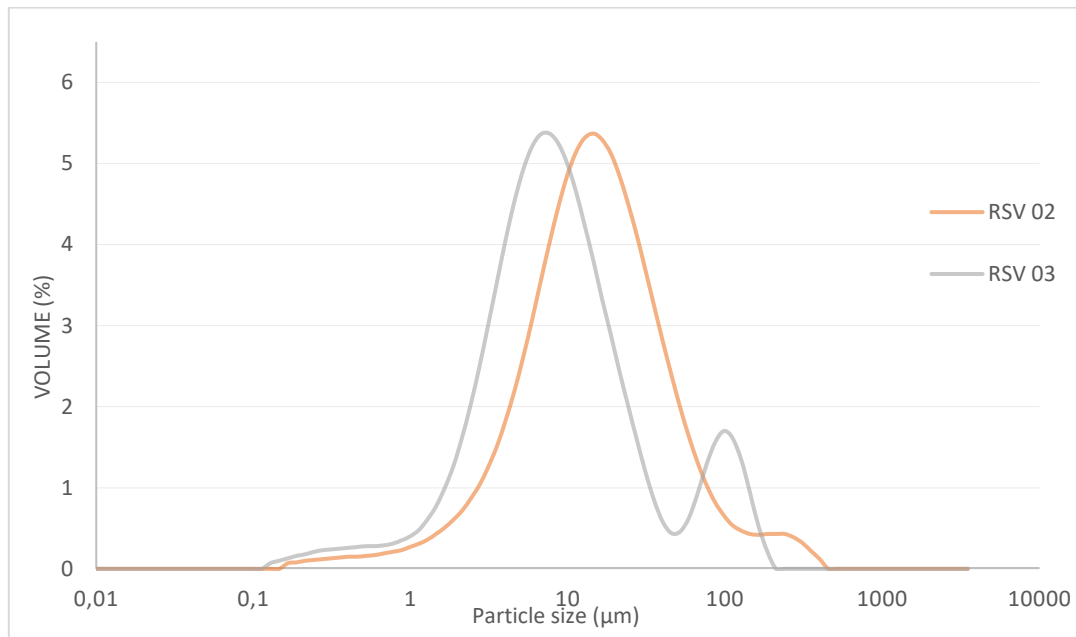


Figure 10 Particle size analysis of different batches of synthetic origin resveratrol

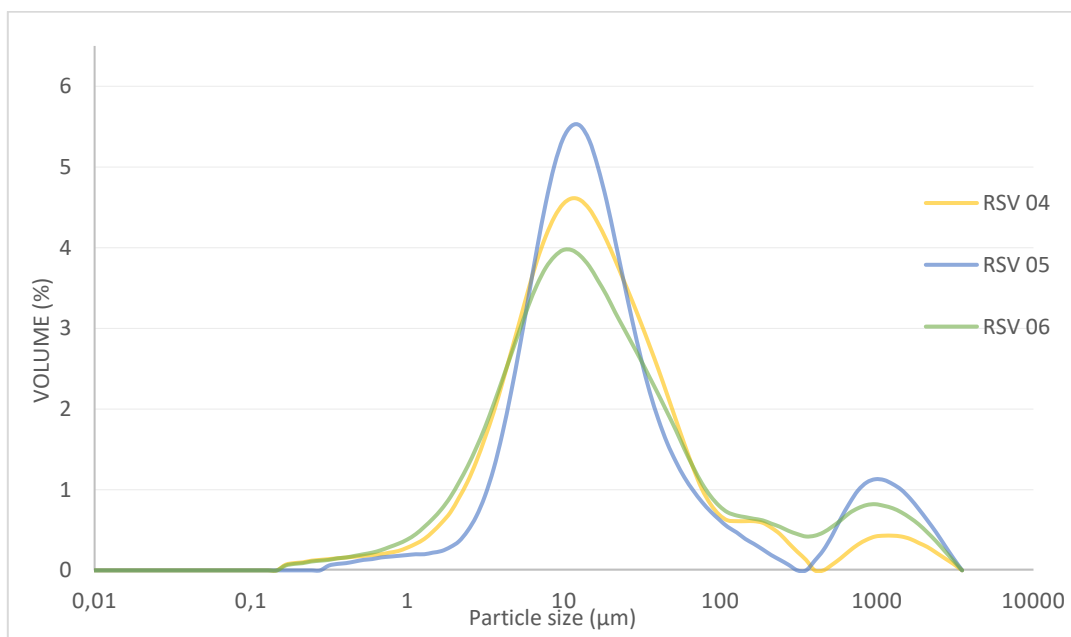


Figure 11 Particle size analysis of different batches of natural origin resveratrol

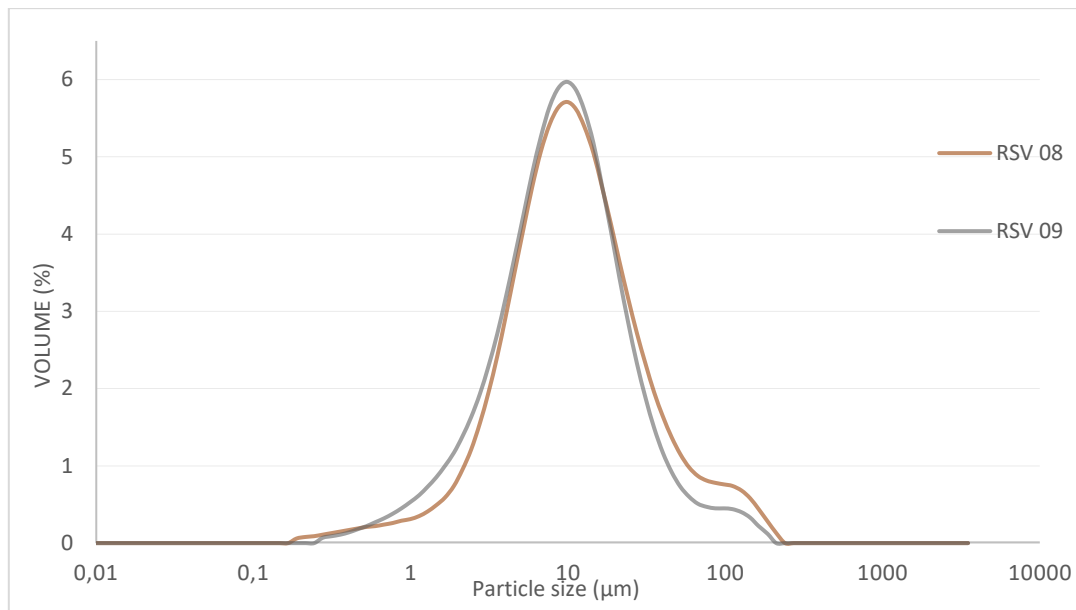


Figure 12 Particle size analysis of different batches of natural origin resveratrol

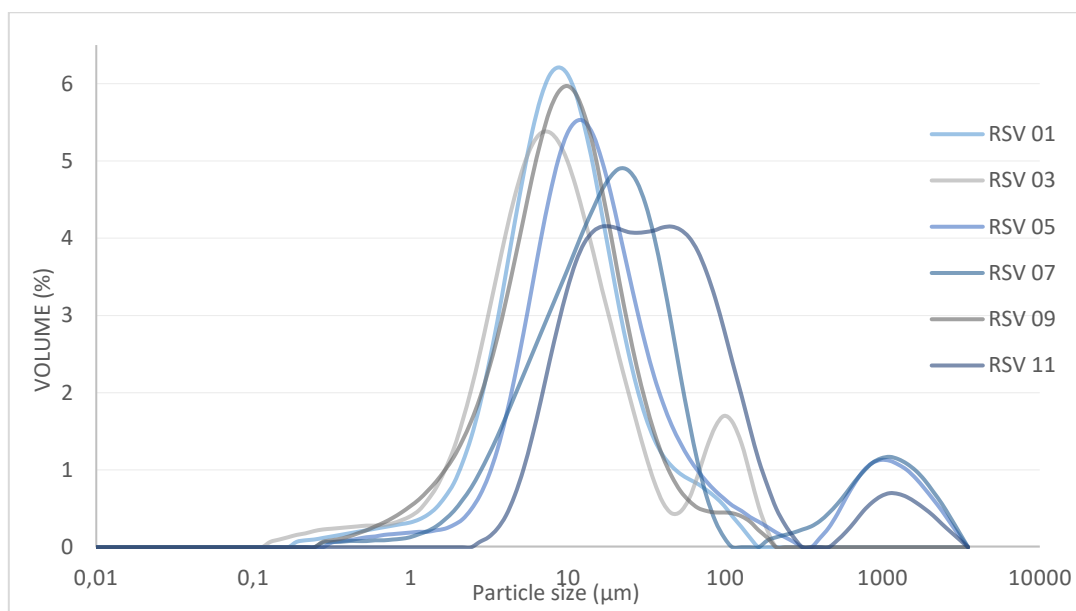
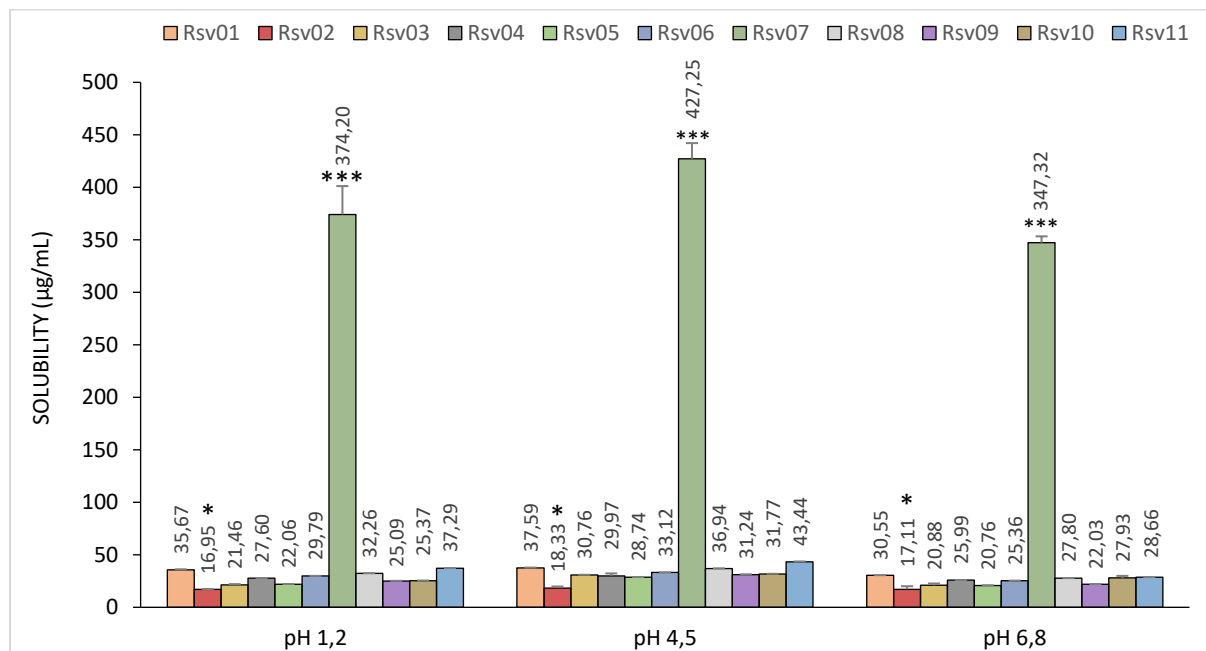


Figure 13 Particle size analysis of resveratrol from different origins

The different results clearly highlights the difference between suppliers and especially for Rsv11 and the need to fix particle size limits during the pre-formulation study of nutritional supplements. It is known from Noyes and Whitney equation that dissolution rate is influenced by the surface of the particles. In such conditions, the shape and diameter of the particles is an important factor to take in consideration in order to proceed to the development of immediate release dosage forms, especially in the case of poorly soluble compound such as resveratrol.

III.5 Solubility

Solubility results of the different resveratrol batches in the three selected pH are presented in figure 14.



*Figure 14 Rsv Solubility in pH 1.2, pH 4.5 and pH 6.8 buffers. Solubility value statistically different from the control * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$.*

For all batches, except Rsv07 the amorphous water soluble product, whatever the origin (natural or synthetic) and the supplier, the solubility values range from 16.95µg/mL to 43.44µg/m. As expected, resveratrol has a poor solubility in aqueous solution and its solubility is not influenced by pH. The results are in accordance with data described in literature where a solubility of 0.03 mg/mL in water at 25 C° is reported (38). Resveratrol is freely soluble in PEG-400 and soluble in alcohol and in the natural oils, surfactants and co-surfactants. Solubilities of resveratrol in these solvents is probably due to its lipophilicity ($\text{LogP}_{o/w} = 3.1$). Resveratrol is reasonably stable in acidic mediums up to pH 6 with a rapid degradation at neutral and basic conditions due to basic hydrolysis. This is consistent with the behavior of a phenol. Resveratrol, a phenol like compound, becomes ionized when the pH increases in the basic medium and causes the compound to be unstable resulting in rapid degradation. It appears that the drug is most stable at pH 5 and 6 (18).

There is a statistical difference in solubility between the two synthetic batches. The solubility of Rsv02 is half the value of the other synthetic batch Rvs03. The variability between the synthetic batches is higher than the one between the different natural batches

(Rsv04/Rsv05/Rsv06 and Rsv08/Rsv09) as previously shown with the particle size determination. Nevertheless, these differences found in solubility may not be significant *in vivo* because the daily dose of resveratrol is very high (1g/day). In all cases, whatever the batch considered only a very small fraction of the dose administered could be dissolved in a volume of 250 mL, described as reference volume in the BCS, at all pH. In such conditions, resveratrol can be define as a poorly soluble compound regarding the requirements of the BCS. This poor solubility represents a real problem that must be overcome for both synthetic and natural resveratrol in order to enhance their bioavailability.

For Rsv07, solubility ranges from 347,32 μ g/mL to 427,25 μ g/mL in the three media. This value represents 10 times the solubility of the “unmodified” resveratrol. The high solubility of Rsv07 is due to the combination with maltodextrin (90%) by spray drying technic, leading to an amorphous solid dispersion. The amorphous materials are characterized by lack of distinct intramolecular arrangement and poor thermodynamic stability in contrast to the molecules of crystalline material “packed” in a highly ordered fashion. Maltodextrin is a polysaccharide produced from the acidic or enzymatic hydrolysis of starch. It is considered a polymer of D-glucose chains linked by glycosidic -(1-4) and -(1-6) bonds, and is formed by linear (amylase) and branched (amylopectin) carbohydrates with different equivalents of dextrose (39). Maltodextrin is an amorphous excipient that combined with resveratrol by spray drying could lead to an amorphous solid dispersion. The solubility of an amorphous drug could be 1.1- to 1000-fold higher in comparison to crystalline form. Due to thermodynamic properties, the amorphous products present higher apparent water solubility (40). The amorphous form of resveratrol, confirmed by XRD analysis increases the solubility of the compound in all pH.

III.6 Dissolution

The same amount of powder of the different batches of resveratrol (100 mg of pure powder) were used in this study. Due to the lack of difference of solubility in the different pH, the dissolution was performed only in pH 6.8. The cumulative amount of resveratrol is presented in figure 15 and gathered in table 3.

Despite the same amount of resveratrol in each powder tested, except for the amorphous Rsv07 (10% m/m), there is a large difference between the different batches. The amount dissolved at 120 min range from 6.6 μ g (Rsv11) to 65.5 μ g (Rsv06) which is the maximal value obtained. There is a factor of 10 between the lowest and the highest amount of resveratrol dissolved.

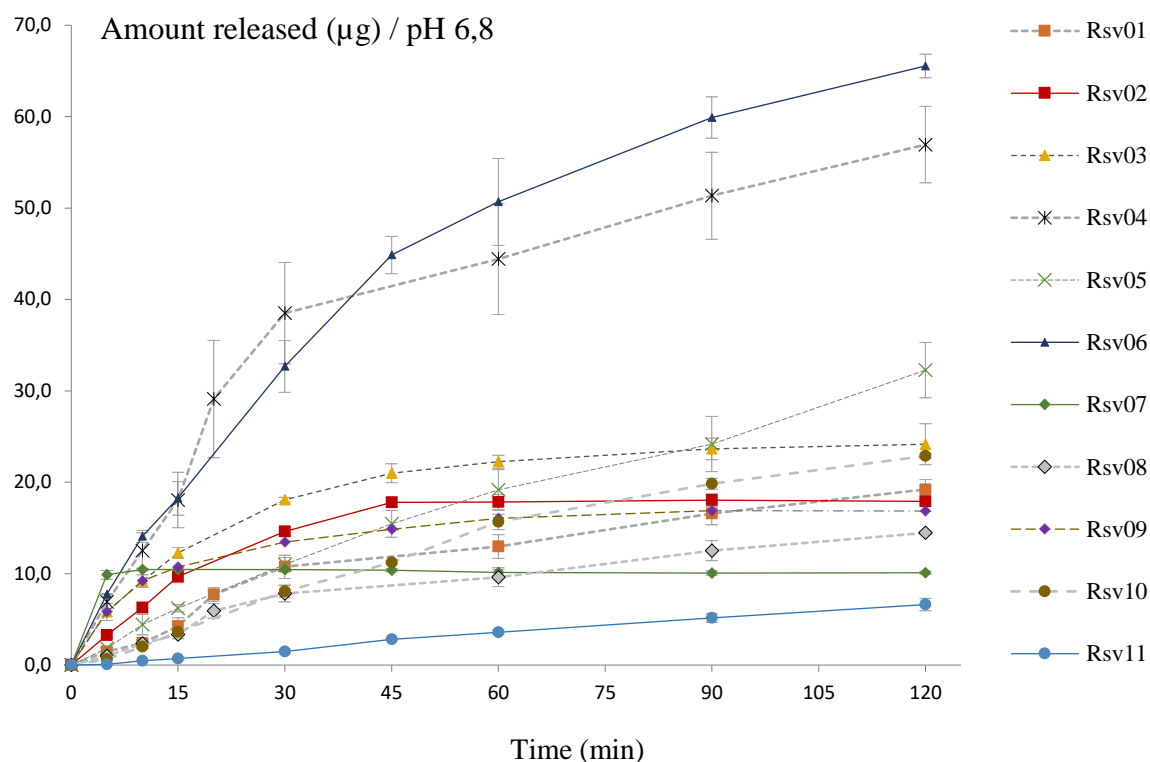


Figure 15 Dissolution profiles of all resveratrol Batches in pH 6,8

	Rsv01	Rsv02	Rsv03	Rsv04	Rsv05	Rsv06	Rsv07	Rsv08	Rsv09	Rsv10	Rsv11
Quantity at 120 min (µg)	19.2 ± 1.1	17.9 ± 1.1	24.2 ± 2.2	56.9 ± 4.2	32.3 ± 3.0	65.5 ± 1.3	10.1 ± 0.2	14.5 ± 0.1	16.9 ± 1.3	22.9 ± 0.3	6.6 ± 0.7
% Dissolved	18.7 ± 1.6	17.4 ± 0.9	24.0 ± 2.2	56.2 ± 3.9	32.1 ± 3.0	65.2 ± 1.5	96.5 ± 0.6	13.9 ± 0.3	16.5 ± 0.8	21.5 ± 0.4	12.8 ± 1.2

Table 3 Resveratrol dissolution at 120 min (% and amount)

The two batches of synthetic resveratrol (Rsv02 and Rsv03) have similar dissolution profile all along the 120 min of experiment. Pure natural resveratrol behave differently between the different suppliers. There are few differences between the different batches Rsv08, Rsv09 and Rsv10 from the same supplier while there is a great difference between the batches Rsv03, Rsv04 and Rsv05 from the other supplier. In this last case, the amount release of two batches is twice the amount of the third one (56.2 µg, 65.2µg and 32.3µg respectively). As expected, Rsv07 (10% water soluble) has a very fast dissolution. The entire amount of compound is dissolved in less than 5 min. The amorphous product presents higher solubility and dissolution rate.

There is no direct relation between particle size and dissolution rate, nevertheless it is possible to classify the release in three groups and to compare the profiles with mathematical model

independent approach and model dependant approach. The resveratrol dissolution kinetics have been divided in three different groups based on the amount of drug dissolved at 120 min and the rate of release. G1 “the High group” (Rsv04 and Rsv06), G2 “the Low-plate group” (Rsv02, Rsv03, Rsv07 and Rsv09) and G3 “the Low-continued group” (Rsv01, Rsv05, Rsv08, Rsv10 and Rsv11). The profile comparison with f_2 , dissolution efficiency and Weibull function are given in table 4.

In the “high group”, there is a continuous dissolution with a high estimated final amount (F_{inf}) of drug dissolved from Weibull model. More than 50% of the total amount is dissolved in 120 min without any steady state or plateau level. There is no difference between the two profiles of Rsv04 and Rsv06. The value of f_2 is greater than 50% and the difference between DE is lower than 10% indicating a similarity between the two profiles. These two batches come from the same supplier. The β of Weibull model is close to 1, indicating an exponential release.

Nevertheless, the values of sum of square deviations are very high, so the model do not fit well the experimental values. The dissolution model is rather a biphasic model with two different rate and a shift at 30 min. There is a fast release during 30 min and a slower one from 30 min to 120 min but without saturation or lack of dissolution.

In the “Low plate group”, there is a low rate of dissolution and the estimated Weibull model F_{inf} is low, between 10 to 25 %. This group brings together the two synthetic batches, a natural one and the amorphous solid dispersion. Taking into account f_2 and DE, there is similarity between profiles of Rsv02, Rsv03 and Rsv09. As expected, the profile of amorphous Rsv07 is different from the others. The release is total in less than 5 min. For the other batches, the Weibull model is an exponential (β close to one) and the low values of sum of square deviations are consistent with this model.

In the “Low-continued group”, there is a continuous dissolution of resveratrol. The profile from Rsv01, Rsv05 and Rsv10 are similar compare to the profiles of Rsv08 and Rsv11 using the f_2 determination while there is no difference between profiles using the DE. The Weibull model is close to an exponential one for all the batches and the model fit the data especially for Rsv08 and Rsv11 batches.

Model independent				Model dependent					Comment
Group	Ref/Test	f_2	Sample	DE	Weibull model			Sum of squared deviations	
					F_{inf}	MDT	β		
G1 "High"	Rsv06/Rsv04	62.60	Rsv04	0.69	54.51	29.30	1,10	58,22	Biphasic release
			Rsv06	0.68	62.90	29.99	1.14	100,30	Same deviation time (30 min)
G2 "Low-Plate"	Rsv02/Rsv03	68.80	Rsv02	0.86	18.11	19.03	1,26	0,71	7 different
	Rsv02/Rsv07	40.02	Rsv03	0.81	24.32	21.80	0,92	0,19	
	Rsv02/Rsv09	66.59	Rsv07	0.99	10.29	2.83	2,05	0,21	
			Rsv09	0.85	17.25	15.93	0.71	0,42	
G3 "Low-continued"	Rsv01/Rsv05	60.11	Rsv01	0.65	20.39	50.47	1,02	7,83	8 and 11 different
	Rsv01/Rsv08	39.33	Rsv05	0.58	63.67	199.45	0,80	15,40	
	Rsv01/Rsv10	59.03	Rsv08	0.64	16.30	57.81	0,94	3,83	
	Rsv01/Rsv11	30.85	Rsv10	0.63	23.75	51.30	1,19	13,83	
			Rsv11	0.55	10.67	128.04	1.06	0.75	

Table 4 Model dependent and Model independent statistical analysis of resveratrol dissolution result

This dissolution study of pure resveratrol clearly highlights the difference between dissolution rates of resveratrol from different origins. For poorly soluble compound such as resveratrol, any increase in amount of drug dissolved could influence the bioavailability. If dissolution is the limiting factor affecting the therapeutic activity, any change in dissolution rate will influence the amount of drug absorbed. Despite a lack of difference in structure, particle size and solubility, the great difference in dissolution rate could directly affect the bioavailability. The great difference in dissolution rate for batches from the same supplier must alert on the quality of products, the potential lack of interchangeability. The raw materials of nutritional supplements should be carefully selected during formulation and the development should take into account the different properties of the compound including the dissolution rate.

III.7 Evaluation of apparent permeability with Caco-2 cells

Only 4 batches over the 11 available were tested for apparent and effective permeability, mainly for ethical reason (reduction of animal experiment). One batch of each dissolution group “high group”, “low-plate group” and “low--continued group” were selected including synthetic and natural product and adding the specific amorphous water soluble product.

Apparent permeability results with Caco-2 cells, expressed in amount absorbed (μg) in function of time are presented in figure 16 and gathered in table 5.

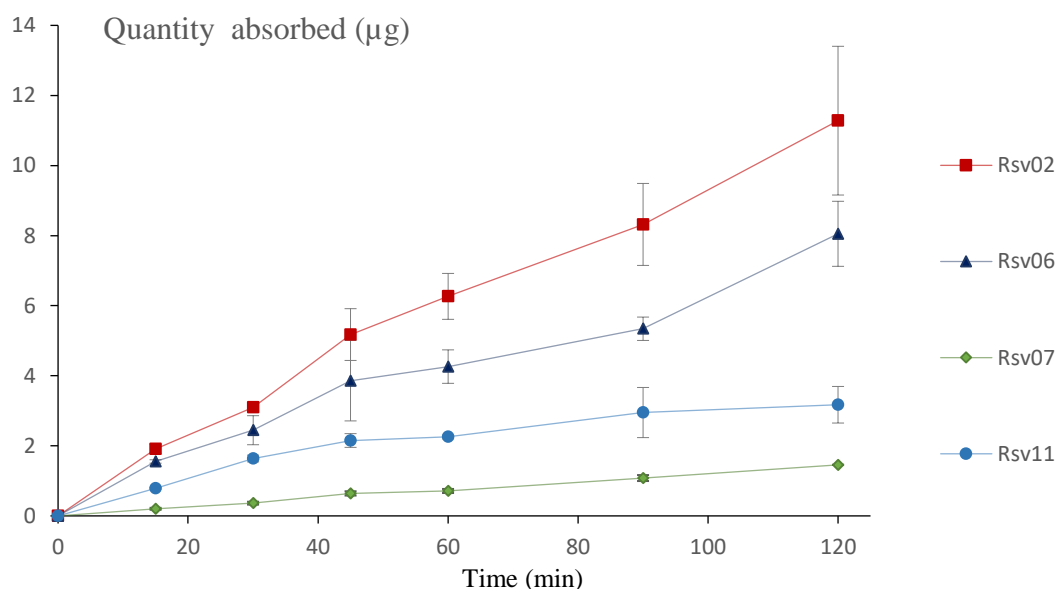


Figure 16 Resveratrol permeability study in Caco-2 model

<i>Batch</i>	<i>Absorption (at 120 min)</i>		<i>P_{app} (×10⁻⁵ cm.s⁻¹)</i>
	<i>μg</i>	<i>%</i>	
<i>Rsv02</i>	<i>12.09 ± 2.27</i>	<i>55.77 % ± 10.49</i>	<i>3.46 ± 0.65</i>
<i>Rsv06</i>	<i>8.63 ± 0.99</i>	<i>33.20 % ± 3.82</i>	<i>2.06 ± 0.23</i>
<i>Rsv07</i>	<i>1.61 ± 0.07</i>	<i>22.73 % ± 0.96</i>	<i>1.41 ± 0.06</i>
<i>Rsv11</i>	<i>3.40 ± 0.56</i>	<i>26.43 % ± 4.35</i>	<i>1.64 ± 0.27</i>

Table 4 Amount, % absorbed at 120 min and apparent permeability (P_{app}) of Resveratrol tested

The absorption of resveratrol across the monocellular layer is continuous and important. More than 50% of the amount deposited on the apical side reaches the basolateral side for Rsv02 batch. There is a low variability whatever the compound tested (synthetic, natural or amorphous solid dispersion). The suspensions prepared take into account the % of resveratrol of each sample (from 98% to 50% and 10% for Rsv02 and Rsv06, Rsv11 and Rsv07 respectively). The origin of the compound seems not to influence the permeability. The apparent coefficient is greater for the synthetic batch compare to the natural ones.

The apparent permeability coefficient, calculated at 120 min is greater than the value of 5.10^{-6} cm/sec define as the limit of high permeability for drugs in the BCS. In such conditions, resveratrol could be considered as a high permeability product.

Cell viability at 120 min (figure 17) is not modified in the presence of resveratrol suspension compare to the standard without product. More than 90% of cells are viable after 120 min. The resveratrol has no impact on cell mortality, at studied concentrations.

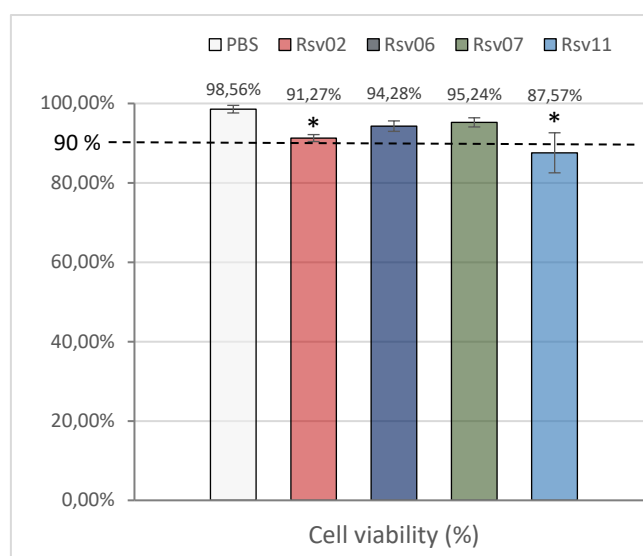


Figure 17 Cell viability (%) of Resveratrol tested on Caco-2. Viability value statistically different from the control (PBS) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$.

The mean TEER values (figure 18) at T_0 was superior to $1100 \pm 30 \Omega\text{cm}^2$ for all resveratrol batches indicating a good junctional formation of the Caco-2 cell monolayers. After application of the different resveratrol batches on the cells, TEER values decreased significantly according to control reaching at T_{2h} 39% and 54% for Rsv02 and Rsv11 respectively ($p < 0.001$). 44% for Rsv06 ($p < 0.01$) and 67% for Rsv07 ($p < 0.05$) which represent the weakest influence on tight junction among all resveratrol batch. This reduction in TEER values is correlated with the P_{app} values. The non-modified resveratrol (Rsv02, Rsv06 and Rsv11) have bigger capability to open the tight junctions and to modulate the paracellular route through the monolayers than amorphous solid dispersion Rvs07. This result could be link to the large amount of maltodextrin in the amorphous batch and is lack of impact on tight junction compare to resveratrol in suspension. After the test, apical samples were removed and replaced with fresh medium, to allow the full recovery of the cells. TEER values monitored increased after 48h to reach the initial values, indicating the full recovery of the cellular monolayer integrity (figure 18).

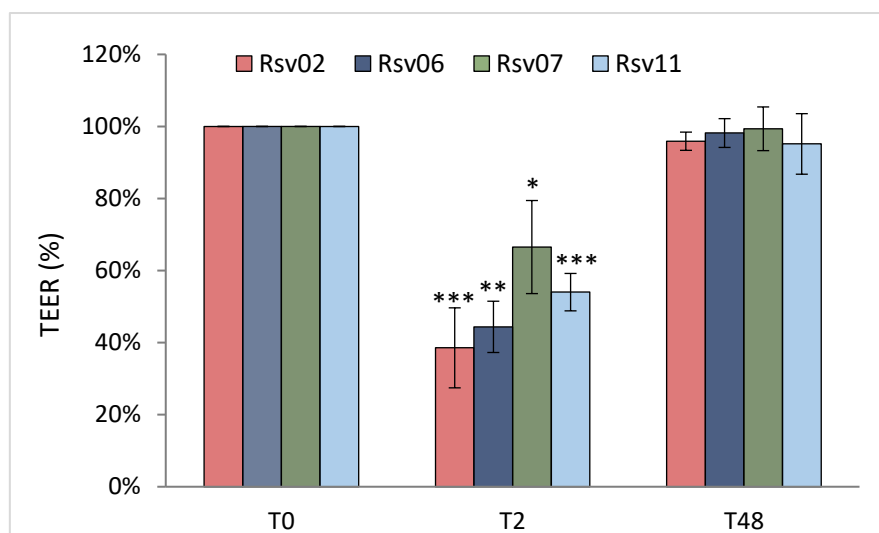


Figure 18 TEER (%) profiles evaluated at T0, T2 and T48. TEER value statistically different from the control * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

III.8 Evaluation of effective permeability

The effective permeability results, determined *ex vivo* on isolated rat intestinal segment, expressed in the amount absorbed (μg) are presented in figure 19. The value of effective permeability are gathered in table 6.

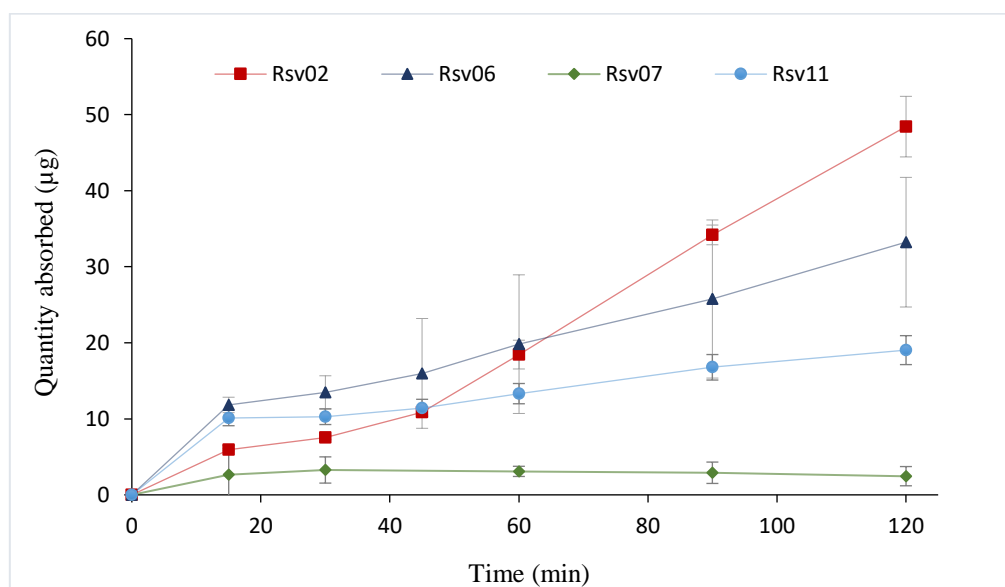


Figure 19 Resveratrol permeability study in *ex vivo* model of different batches

<i>Sample</i>	<i>Absorption (at 120 min)</i>		<i>P_{eff} (×10⁻³ cm s⁻¹)</i>
	<i>μg</i>	<i>%</i>	
<i>Rsv02</i>	<i>47.82 ± 4.0</i>	<i>47.82% ± 4.3</i>	<i>4.17 ± 0.34</i>
<i>Rsv06</i>	<i>33.23 ± 8.5</i>	<i>48.83% ± 12.7</i>	<i>3.99 ± 1.02</i>
<i>Rsv07</i>	<i>3.57 ± 0.4</i>	<i>1.76% ± 0.3</i>	<i>0.13 ± 0.015</i>
<i>Rsv11</i>	<i>19.04 ± 6.2</i>	<i>12.25% ± 3.7</i>	<i>1.13 ± 0.36</i>

Table 5 Amount, % absorbed at 120 min and effective permeability (*P_{eff}*) of Resveratrol tested

The permeability results on intestinal rat segment are very similar to the one obtained with Caco-2. Despite the use of biological material, the variability is low. The absorption is continuous and important for Rsv02 and Rsv06. More than 45% of the amount introduced in the intestinal segment has been found in the serosal compartment. There is no difference between synthetic and natural origin. The effective permeability coefficient, calculated at 120 min is greater than the limit value of 1×10^{-4} cm/sec for a high permeable drug compared to a low permeable one. Resveratrol could be considered as a high permeability product.

For the amorphous water soluble resveratrol (Rsv07) the amount of drug absorbed is very low, only 2 % of the drug was found in the serosal compartment. This result is not in accordance with the claim of the product. For this compound, a solution was introduced in the intestinal segment rather than a suspension and the gradient concentration is not high enough, between the two compartments, to allow diffusion of the compound. The volumes are more important compared to Caco-2 model and according to Fick's Law, equilibrium state between the two sides is quickly reached. To avoid this problem, a higher concentration should have been tested or a saturated solution of Rsv07.

In order to illustrate this phenomenon, an experiment was performed by introducing, in the intestinal segment, either a solution, corresponding to the supernatant of the suspension or the suspension of Resveratrol. This experiment was performed with Rsv02 and Rsv06. The results are presented in figure 20.a and 20.b. From the data obtained, it is possible to conclude that resveratrol is more absorbed when it is introduced inside the intestinal segment as a suspension (sus) than a solution (Sn). This could be explained by the passive diffusion of the compound across the membrane and the difference in value of concentration gradient, between the internal lumen of intestine and the external side, in case of a suspension (high value) and a solution (low value).

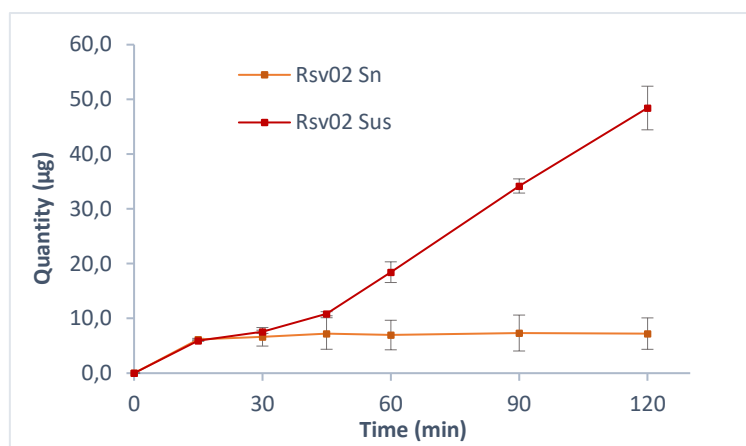


Figure 20 a) Comparing Rsv02 ex vivo permeability in suspension (Sus) vs supernatant (Sn)

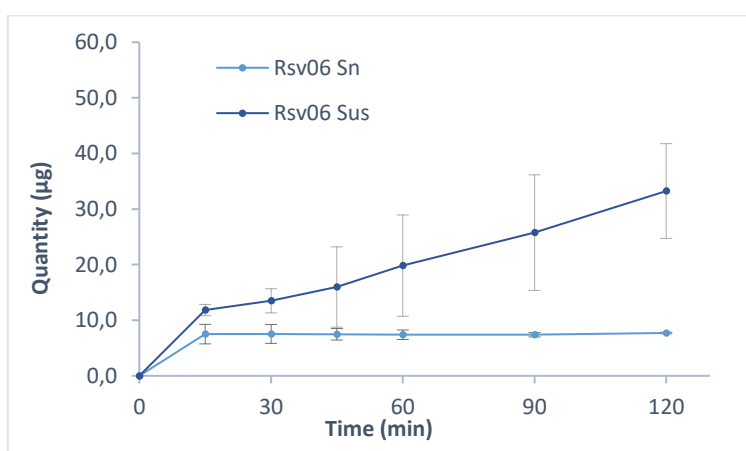


Figure 20 b) Comparing Rsv06 ex vivo permeability in suspension (Sus) vs supernatant (Sn)

In case of a suspension, resveratrol amount is important. As the drug is very permeable, the dissolved drug can cross the membrane and reach the large volume of serosal side. The flow is continuously fed by the non-dissolved particles remaining inside the intestine which allow the creation of a high concentration gradient. Every dissolved particle that passes through the membrane creates a space in the solvent for the dissolution of a non-dissolved particle. Therefore, as long as this cycle continues, absorption of resveratrol is maintained through the intestinal membrane until equilibrium is reached.

Many papers have been published on absorption and bioavailability of resveratrol, they all agree on the poor bioavailability and the rapid metabolism of resveratrol, which is very common among polyphenols. By contrast, methylated polyphenols appear to demonstrate greater intestinal absorption and enhance hepatic stability (41). Studies on resveratrol often report that the compound cross the intestinal epithelium by rapid trans epithelial passive diffusion in its free form (42) or through specific transport when it is conjugated to G (glucuronide) or S (sulphate) (43). Our results are in accordance with these findings.

The low bioavailability of resveratrol is a combination of low solubility that limits the permeability and important metabolism that reduces the free form of resveratrol reaching the systemic circulation. Resveratrol seems to go through an apical efflux by MRP2 (Multi-drug Resistance-associated protein 2), an efflux pump presents on the apical membrane, highlighted by the effect of MK-571 (an MRP inhibitor) that seems to implicate MRP2 as responsible for apical efflux *trans*-resveratrol (44). The G and S forms are the major resveratrol metabolites found in plasma after a rapid first-pass metabolism (45). Once in the liver, resveratrol is once more metabolized into G and S derivatives, which can run into an enterohepatic recirculation and be reabsorbed in the small intestine. Then from the liver, the compounds regain the systemic circulation to be distributed to the organs and can be eliminated directly in the urine (42). In the intestinal tract, the unabsorbed resveratrol can reach the colon, where it is metabolized to dihydro-resveratrol that can be either absorbed or excreted by G and S derivatives in feces (44).

III.9 Apparent and effective permeability comparison

Figure 21 represents the comparison between apparent permeability *in vitro* (P_{app}) and the effective permeability *ex vivo* (P_{eff}). A direct linear relationship was found between the two sets of data, with a very good relation ($R^2 = 0.9926$).

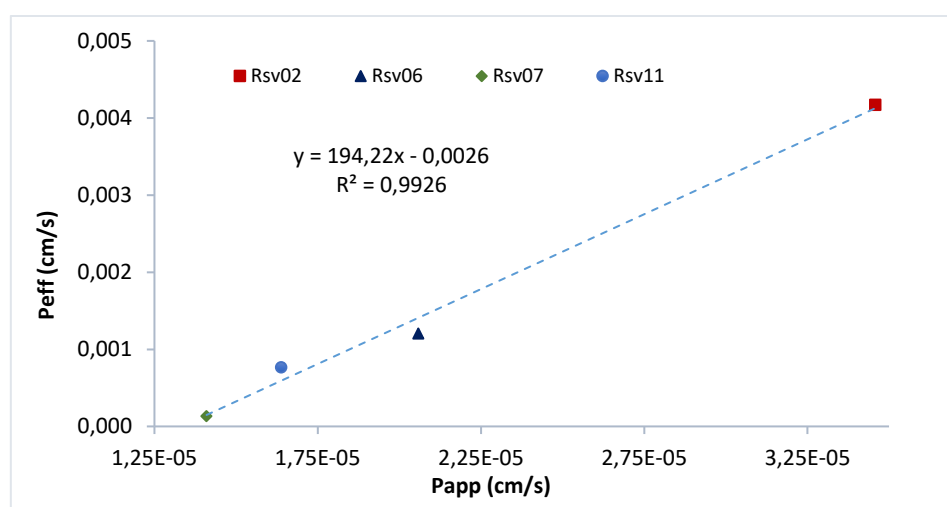


Figure 21 Correlation between *in vitro* permeability (P_{app}) and *ex vivo* permeability (P_{eff}) of four Resveratrol batches

This correlation explains that the major factors influencing permeability are related to the compound and not to other external factors. The two models (*in vitro* and *ex vivo*) match perfectly and may predict the compound's permeability in the human intestine and so, the oral bioavailability.

IV. Conclusion

Resveratrol has been related to many therapeutic properties in humans and its effects are not questionable. However, many factors such as poor aqueous solubility, chemical stability and high metabolism indicate a poor oral bioavailability.

In the nutritional supplement resveratrol is available from synthetic or natural origin and in different proportions (%w/w) as well as modified resveratrol (amorphous water soluble compound). The study of these different products from their chemical structure to their physicochemical and biopharmaceutical properties allowed proving that despite the same structure, the different products exhibit different characteristics related to solubility dissolution and permeability. Thanks to this study, resveratrol can be classified, without ambiguity, as a class II drug in BCS with a low solubility and a high permeability.

Even with a good intestinal permeability, resveratrol presents low bioavailability mainly due to its low solubility and dissolution rate. The different comparisons in this study, on critical quality attributes of resveratrol from different origins and suppliers, clearly highlights the risk on bioavailability. The formulation of oral delivery forms of class II compounds, including resveratrol is a permanent challenge and any change in solubility or dissolution rate could impact absorption and bioavailability. The choice of the active ingredient should be well documented and should include determination of the parameters that directly influence bioavailability: solubility dissolution and permeability.

In fact, determination of biopharmaceutical class for nutraceuticals turns out to be a very useful approach to evaluate the absorbability of ingredients, the prediction of the *in vivo* behavior and a great tool to guide the formulation of new product which could allow the overcoming of the poor bioavailability problems.

V. References

1. EC, Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Food Supplements. OJ L 183, pp. 51-57, 2002.
2. Hilleman DE, Wiggins BS, Bottorff MB. Critical Differences Between Dietary Supplement and Prescription Omega-3 Fatty Acids: A Narrative Review. *Adv Ther.* 1 févr 2020;37(2):656-70.
3. Food and Drug Administration; Center for Food Safety and Applied Nutrition Dietary supplement health and education act of 1994. 1995.
4. Bailey RL. Current regulatory guidelines and resources to support research of dietary supplements in the United States. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 19 janv 2020;60(2):298-309.
5. Schönfeldt, H. C., Pretorius, B., & Hall, N., Bioavailability of Nutrients. *Encyclopedia of Food and Health*, 401–406, 2016, doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00068-4.
6. Ting Y, Zhao Q, Xia C, Huang Q. Using in Vitro and in Vivo Models To Evaluate the Oral Bioavailability of Nutraceuticals. 3 févr 2015
7. Parada J, Aguilera JM. Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science.* 2007;72(2):R21-32.
8. Doogue MP, Polasek TM. The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Therapeutic Advances in Drug Safety.* 1 févr 2013;4(1):5-7.
9. Salvia-Trujillo L, Martín-Belloso O, McClements DJ. Excipient Nanoemulsions for Improving Oral Bioavailability of Bioactives. *Nanomaterials.* janv 2016;6(1):17.
10. D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, C., Scaccocchio, B., & Masella, R. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies, *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1321–1342, 2010, doi.org/10.3390/ijms11041321.
11. Liu L, Guan N, Li J, Shin H, Du G, Chen J. Development of GRAS strains for nutraceutical production using systems and synthetic biology approaches: advances and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology.* 17 févr 2017;37(2):139-50.
12. Kaldas, M. I., Walle, U. K., & Walle, T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *J. Pharmacy Pharmacology*, 55(3), 307–312, 2003, doi:10.1211/002235702612.
13. He, H., Zhang, Q., Li, M., Wang, J.-R., & Mei, X., Modulating the Dissolution and Mechanical Properties of Resveratrol by Cocrystallization. *Crystal Growth & Design*, 17(7), 3989–3996, 2017.. doi:10.1021/acs.cgd.7b00637.
14. Das S, Lin H-S, Ho PC, Ng K-Y. The Impact of Aqueous Solubility and Dose on the Pharmacokinetic Profiles of Resveratrol. *Pharm Res.* 1 nov 2008;25(11):2593-600.

15. Lastra CA de la, Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005;49(5):405-30.
16. Davidov-Pardo G, McClements DJ. Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. *Trends in Food Science & Technology*. 1 août 2014;38(2):88-103.
17. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005;49(5):472-81.
18. Robinson K, Mock C, Liang D. Pre-formulation studies of resveratrol. *Drug Dev Ind Pharm*. sept 2015;41(9):1464-9.
19. Pharmacopée Européenne, Conseil de l'Europe Strasbourg, France, 2.9.3 Essai de dissolution des formes solides, 10ème Ed, 2019.
20. Santos RM. Physicochemical Principles of Pharmacy. *Am J Pharm Educ*. 15 oct 2006;70(5).
21. Martin AN, Sinko PJ. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences*. Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 659 p.
22. Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc*. sept 2007;2(9):2111-9.
23. Ferruzza S, Scacchi M, Scarino ML, Sambuy Y. Iron and copper alter tight junction permeability in human intestinal Caco-2 cells by distinct mechanisms. *Toxicol In Vitro*. août 2002;16(4):399-404.
24. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2 nov 2015;111:A3.B.1-A3.B.3.
25. G Garrait, Jarrige J-F, Blanquet S, Beyssac E, Cardot J-M, Alric M. Gastrointestinal Absorption and Urinary Excretion of trans -Cinnamic and p -Coumaric Acids in Rats. *J Agric Food Chem*. 2006;54(8):2944–50. 2006;
26. Katsagonis A, Atta-Politou J, Koupparis MA. HPLC Method with UV Detection for the Determination of trans-Resveratrol in Plasma. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 1 mai 2005;28(9):1393-405.
27. European Medicines Agency. Guideline investigation bioequivalence Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr **. 2010.
28. Shah VP, Tsong Y, Sathe P, Liu J-P. In Vitro Dissolution Profile Comparison—Statistics and Analysis of the Similarity Factor, f_2 . *Pharm Res*. 1 juin 1998;15(6):889-96.
29. Anderson NH, Bauer M, Boussac N, Khan-Malek R, Munden P, Sardaro M. An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of in vitro dissolution profiles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1 août 1998;17(4):811-22.

30. Simionato LD, Comparison between the dissolution profiles of nine meloxicam tablet brands commercially available in Buenos Aires, Argentina. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 1 mai 2018;26(4):578-84.
31. Nishihira, VSK, Resveratrol inclusion complex with β -cyclodextrin. Characterization and evaluation of toxicity in wistar rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 27, 2016.
32. Nishihira VSK, Characterization of Resveratrol/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin inclusion complex for subsequent application in hyperglycemic rats. *Disciplinarum Scientia | Naturais e Tecnológicas*. 2013;14(1):67-72-72.
33. Mont Kumpugdee-Vollrath, Yvonne Ibold, Pornsak Sriamornsak. Solid state characterization of trans resveratrol complexes with different cyclodextrins. 2019;
34. Sritham E, Gunasekaran S. FTIR spectroscopic evaluation of sucrose-maltodextrin-sodium citrate bioglass. *Food Hydrocolloids*. 1 sept 2017;70:371-82.
35. Commodari F, Khiat A, Ibrahim S, Brizius AR, Kalkstein N. Comparison of the phytoestrogen trans-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) structures from x-ray diffraction and solution NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2005;43(7):567-72.
36. Kamath MS, Ahmed SS, Dhanasekaran M, Santosh SW. Polycaprolactone scaffold engineered for sustained release of resveratrol: therapeutic enhancement in bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 23 déc 2013;9:183-95.
37. Wlodarski K et al. The influence of amorphization methods on the apparent solubility and dissolution rate of tadalafil. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1 oct 2014;62:132-40.
38. PubChem. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Resveratrol, CID=445154, [Internet].<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445154>
39. Saavedra-Leos Z, Leyva-Porras C, Araujo-Díaz SB, Toxqui-Terán A, Borrás-Enríquez AJ. Technological Application of Maltodextrins According to the Degree of Polymerization. *Molecules*. déc 2015;20(12):21067-81.
40. Rams-Baron M, Amorphous Drug Solubility and Absorption Enhancement. In: Rams-Baron M, Jachowicz R, Boldyreva E, Zhou D, Jamroz W, Paluch M, éditeurs. *Amorphous Drugs: Benefits and Challenges*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 41-68.
41. Wen X, Walle T. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metab Dispos*. oct 2006;34(10):1786-92.
42. Santos AC, Veiga F, Ribeiro AJ. New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 1 août 2011;8(8):973-90.
43. Kuhnle G, Spencer JP, Chowrimootoo G, Schroeter H, Debnam ES, Srai SK, et al. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochem Biophys Res Commun*. 27 mai 2000;272(1):212-7.

44. Henry C, Vitrac X, Decendit A, Ennamany R, Krisa S, Mérillon J-M. Cellular Uptake and Efflux of trans-Piceid and Its Aglycone trans-Resveratrol on the Apical Membrane of Human Intestinal Caco-2 Cells. *J Agric Food Chem.* 1 févr 2005;53(3):798-803.
45. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. High Absorption but Very Low Bioavailability of Oral Resveratrol in Humans. *Drug Metab Dispos.* 1 déc 2004;32(12):1377-82.

CHAPITRE V :

Application de la classification biopharmaceutique aux
ingrédients nutritionnels.

Etude de cas : la curcumine

Impact of solubility enhancement of nutritional ingredients from BCS class II or class IV on interchangeability and bioavailability: application to curcumin

I. Introduction

Over the last years, the number of studies focusing on curcuma have increased significantly. Curcuma or also called Tumeric is a well known spice coming from the root of the plant called *Curcuma longa*, it belongs to ginger the family of Zingiberaceae (1). Components of tumeric are curcuminoids, which include curcumin (the main bioactive compound), demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. Curcumin has been used in many ancient cultures because of its large medicinal properties. Nowadays, numerous studies pointed out the health-promoting effects of Curcuma in many actions such as anti-inflammatory properties (2), anti-bacterial (3) anti-oxidant effects (4), antidiabetic properties (5) and more. Efficacy of curcumin requires high dose of product because the bioavailability is very low. In many human studies, high doses of several grams of curcumin per day are given to patients in order to obtain health-promoting effects. The risk of adverse effects, associated with the long-term intake of high-dose of curcumin, could reduce compliance and could limit the application of curcumin for disease prevention (6). The low bioavailability of curcumin results of a combination of poor solubility in aqueous gastrointestinal fluids and low absorption in the gastrointestinal tract (GTI) but other mechanisms, including low chemical stability at physiological pH and rapid metabolism in the GIT and liver (7).

Taking into account its low solubility and low permeability, curcumin could be considered as a class IV drug, using the biopharmaceutical classification system (BCS), used for drugs in pharmaceutical area. Bioavailability is defined as the rate and extent to which the bioactive compound or a drug is absorbed and becomes available at the site of action. It is a complex process involving many different stages. After release from the nutritional supplement and dissolution in the fluids, bioactive compound will be absorbed in the gastrointestinal tract and will reach the systemic circulation. The absorption can be influenced by either the physicochemical properties such as solubility and partition coefficient but also intrinsic properties such as permeability and metabolism. Knowing the factors limiting the

bioavailability is a key step to improve bioavailability. Various approaches such as encapsulation in cyclodextrin, development of amorphous solid dispersion, formulation of self-emulsifying drug delivery systems, liposomes, nanocapsules or nanoparticles, have been tried to enhance curcumin delivery (7, 8) but because of the complexity of bioactive compounds and the variation in absorption mechanisms, enhancing bioavailability is often challenging. Moreover, the impact of formulation change on potential enhancement, both on solubility and permeability, is not always well documented and there is a lack of standardization about the methods employed. In such conditions, there is no real evaluation of the differences between products in term of bioavailability and the risk of potential adverse effects, because of the lack of interchangeability between active compounds and formulation, is of importance. The application of BCS in nutritional ingredients could overcome these problems and give good metrics to prove the impact of formulation on *in vivo* behavior.

The purpose of this work is to compare three different curcumin bioactive compounds, used as raw material in nutritional supplement using physicochemical and biopharmaceutical techniques and the BCs approach to determine the major factors influencing their bioavailability and the impact of enhancement of solubility on interchangeability and bioavailability.

II. Materials and methods

II.1 Curcumin

Three different batches of raw material of curcumin were tested:

- (CN) Natural curcumin (50% curcumin): purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA)
- (CCD) Curcumin-cyclodextrine complex (15% curcumin): purchased from Wacker Chemie AG (Munich, Germany)
- (C-PVP) Curcumin-PVP solid dispersion: (10% curcumin) developed with natural curcumin by Hernandez-Patlan D et al (9)

II.2 Reagent

All chemicals and solvents used in this study were HPLC or laboratory analytical reagent grade. Sodium chloride, Hydrochloric Acid 37%, Acetic Acid, HPLC water, Acetonitrile, Ethyle acetate, Formic acid and Sodium hydroxide were purchased from Fisher Scientific. Sodium Acetate and Clopidogrel Bisulfate (CB; 98-101%) were purchased from Sigma Aldrich and Potassium Phosphate Monobasic was purchased from Acros Organics.

II.3 FTIR analysis

FTIR measurements were performed at room temperature using a Shimadzu iraffinity-1 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). A background signal was acquired by scanning an empty sample because absorption intensity is relative. Resveratrol samples were placed on the top of the diamond ATR sampling unit directly in their powder form. The scanning ranged from 4000 cm^{-1} to 0 cm^{-1} and each spectrum was obtained using 80 scans.

II.4 Powder X-Ray Diffraction

Curcumin samples were analyzed using a Philips X'PERT diffractometer equipped with a "Cu- $K\alpha$ " source, with the 2θ angle set between 5° and 30° and $1,228^\circ/\text{min}$ scanning speed. Radiations were generated at 30mA and 40 kV.

II.5 Particle size measurement

Particle sizing was performed on curcumin raw material using Malvern Mastersizer 3000 laser diffraction particle size analyzer. The measurement was obtained by putting curcumin powder in the Aero S dry powder disperser. The results were volume based and the mean volume diameter D selected to represent the average diameter of particles are Dv10, Dv50 and Dv90. Mastersizer 3000 software was used.

II.6 Solubility and dissolution experiments

II 6.1 Preparation of dissolution media

Dissolution media used in solubility and apparent dissolution rate study were buffer solutions, corresponding to the three pH studied in biopharmaceutical classification system. pH 1.2, pH 4.5 and pH 6.8. These dissolution media were prepared according to the European Pharmacopoeia (10).

II 6.2 Solubility study

Solubility study consists of evaluating the saturation concentration according to the excess substrate addition method (11, 12). An excess amount of curcumin powder from every batch was added to safelight flask of 100 mL, and then filled with either pH 1.2, pH 4.5 or pH 6.8 buffers. Flasks were stirred for 24 hours in a water bath at 37 °C then solutions were centrifuged at 3000 rpm to get the supernatant of each solutions in order to measure the maximal concentration of curcumin dissolved. Each batch was measured in triplicates (n=3).

II 6.3 Dissolution study

Dissolution test was performed using the USP apparatus 4 (CE 7 Smart with CP7 piston pump, Sotax AG, Switzerland) with 12 mm (Sotax part number 8820) flow cells (13). Each cell was prepared by putting a 5 mm ruby bead in the apex of the cone then filled with 1 mm glass beads without exceeding the gauge indicated on the cell, 50 mg of each curcumin sample was put above the glass bead bed in triplicates (n=3) for each batch. The temperature of the flow cell unit was $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ and the flow rate through cells was fixed at 20 mL/min, all in a closed-loop of 500 mL of buffer. Mediums used were pH 1.2, pH 4.5 or pH 6.8 buffers. 1 mL of sample was took at the following times 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min then replaced with media.

II.7 Evaluation of apparent permeability with Caco-2 cells

II 7.1 Cell culture

Caco-2 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). They were cultured on a microporous insert membrane of 0.4 μm pore size. Inserts used in this experiment were 12 wells Transwell® inserts with a polycarbonate membrane of 3 μm and a well's surface area of 1.12 cm^2 .

In every well $5 \cdot 10^5$ cells were seeded at passage 52 then incubated for 21 days with complete DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) supplemented with 15% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine) that was changed every 3 days for two weeks then every day in the last week. After this culture period, cells were differentiated at a maximum level and form a monolayer isolating the upper (Apical) and lower (Basolateral) of the culture chambers.

II 7.2 Caco-2 assay

After complete differentiation of the monolayer Caco-2 cells, complete DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) was replaced with PBS, for analytical reasons, in both sides of the wells, where the basolateral side was filled with 1.5 mL and the apical side containing the cells, was washed 3 times with PBS then filled with curcumin suspensions to be tested.

Suspensions, equivalent to 125 $\mu\text{g/mL}$ of pure curcumin, of each product were prepared in PBS and preheated to 37 $^{\circ}\text{C}$, a volume of 0.5 mL was deposited on the apical side ($n=3$) for each batch. Samples (100 μL) were taken every 15 min for 2 hours from the basolateral side of each well and replaced with 100 μL of fresh PBS to maintain the volume of 1.5 mL. All samples were analyzed with an HPLC validated method.

Results are presented as apparent permeability coefficient P_{app} expressed in ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$) and calculated for the 120 min period of the experiment according to Equation [1]

$$P_{app} (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}) = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{AC_0} \quad [1]$$

Where (dQ/dt) is the flux of the compound across the cells ($\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$),

C_0 is the initial concentration at t_0 ($\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$),

and A is the surface area of the monolayer (1.12 cm^2 in this case).

II 7.3 Evaluation of the membrane integrity and cells viability

II 7 3 a) TEER (Trans Epithelial Electrical Resistance) determination

TEER values of the monolayers were measured using EVOM2 (World Precision Instrument) Volt-Ohm Meter to verify the monolayers confluence and integrity, it informs about the tight junctions formation between cells (14). Cell monolayers with a TEER values at 37°C below 500 Ωcm^2 are discarded (15). TEER measurement was recorded throughout incubation at every sampling time and 48h after the experiment as a measure of cell viability and monolayer integrity. At the end of the experiment, permeability studies were stopped by removing the apical medium and washing the cells three times with PBS. Immediately fresh complete DMEM incubated at 37°C was replaced. The monolayers were allowed to regenerate for 48 h at 37°C in an atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂ at 90% relative humidity

Variation of TEER (%), compared to initial values, is calculated according to Equation [2].

$$TEER (\%) = \frac{TEER (t)}{TEER (t_0)} \times 100 \quad [2]$$

II 7 3 b) Cell viability test

The viability of the cells, in the presence of curcumin suspensions, was evaluated by trypan blue exclusion (final concentration of 0.4% in PBS) (16). Cell viability is calculated as the number of viable cells divided by the total number of cells (Equation [3]), within the grids on the Kova slide using trypan blue exclusion test. Cells were visually quantified under microscope to determine whether they took up or excluded the colorant. The cells that have clear cytoplasm are considered viable cells and the ones that have blue cytoplasm are considered nonviable cells.

$$\% Viability = \frac{(Number\ of\ viable\ cells)}{(Total\ number\ of\ cells)} \times 100 \quad [3]$$

II.8 Analytical methods

II 8.1 High-Performance Liquid Chromatography

The method used to quantify curcumin, for solubility and dissolution experiments, is adapted from the one described by Wichitnithad *et al* (17) and was carried out using VWR-Hitachi HPLC-unit LaChrom Elite. With pump HTA L-2130 and piston flushing. Autosampler L-2200.

DAD-detector L-2450. Column thermostate L-2300. USB-interface. PC/Organizer LaChrom Elite. Keyboard. EZChrom Elite datasystem for Hitachi DAD-system.

Samples were analyzed using an InterChim® C18 column with dimensions of 250 × 4.6 mm packed with 3.5 µm particles at temperature of 33°C. Mobile phase was an isocratic elution of acetonitrile and 2% v/v acetic acid (40:60, v/v) at a flow rate of 2.0 mL/min, and UV detection at 425 nm.

Standard solutions were prepared at 500 µg/mL of pure curcumin by dissolving curcumin in ethanol then diluted with water to have 500, 250, 100, 50, 25 and 10 µg/mL respectively to draw the calibration curve. ($r^2 = 0,9994$). The injection volume was 25 µL.

II 8.2 Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS)

A highly specific, sensitive, selective and validated LC-MS method from Dolores et al was used for Caco-2 cell permeability assay (18). Curcumin samples and clopidogrel bisulfate, used as internal standard (IS) were separated on an Acquity UPLC BECH Shield RP 18 column (1.7µm, 2.1 X 100mm) with 0.1% formic acid (FA) in acetonitrile (ACN) and water in proportion of 60:40 (v/v)

Standards solutions in LC-MS were prepared using the mobile phase (H₂O: ACN, 40:60, with 0.1% FA) as the dissolution solvent. For each stock solution, the IS was added equally having a final concentration of 40 ng/mL. After homogenization with vortex, 900 µL from each one, were taken and placed into an Eppendorf, followed by the addition of 100 µL of IS (400 ng/mL), and vortexed for 30 seconds. Liquid-liquid extraction using Ethyl acetate was performed adding 1 mL of solvent and shaking vigorously for 60 seconds in vortex. Extracted samples were centrifuged at 10 000 rpm × 15 min, at 4 °C, and then, 500 µL the upper aqueous layer was transferred to a LC vial and evaporated to dryness at 25 °C. The residue was reconstituted with 500 µL of mobile phase. A detailed scheme for sample preparation is presented in figure 1. Samples from Caco-2 test were treated the same way.

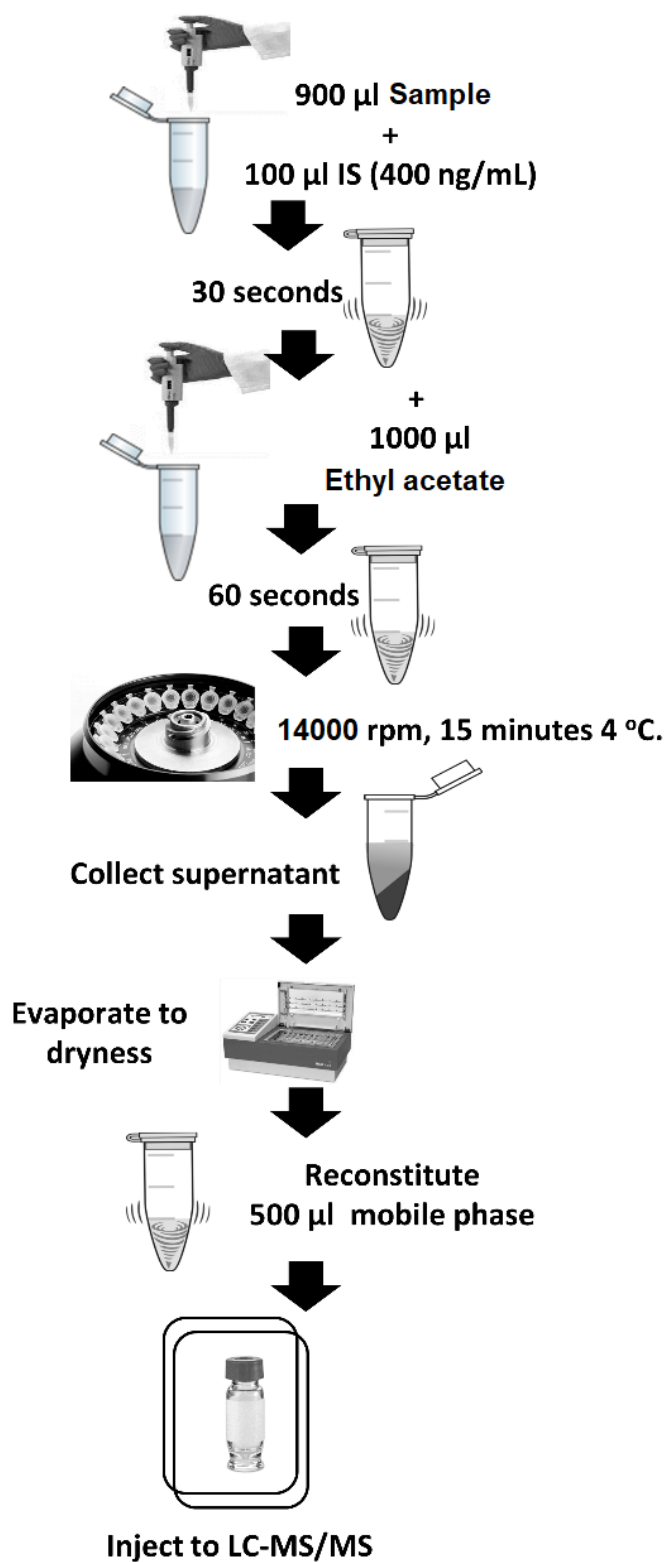


Figure 1 Sample preparation, extraction of curcumin for LC-MS quantification

III. Results

III.1 Rationale of products studied

Curcumin, presented in figure 2.a and 2.b is a phenolic compound of 368,4 g/mol of molecular weight (19). It exhibits keto-enol tautomerism. The enol form is more energetically stable in the solid phase and, depending on the solvent, up to 95% can be in the enol form (20). Curcumin is practically insoluble in water and it has a LogP of 3,2 and its maximum daily dose range from 500 mg to 2000 mg (19).

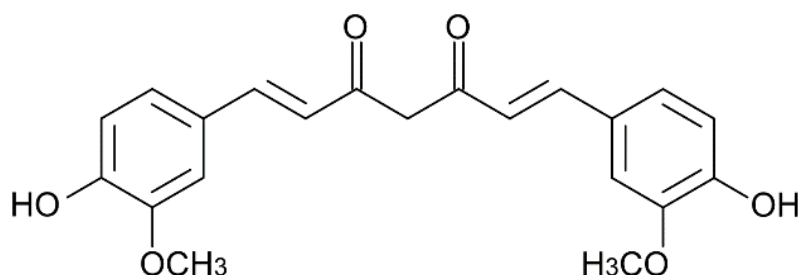


Figure 2.a) Curcumin chemical structure (Ketonic form)

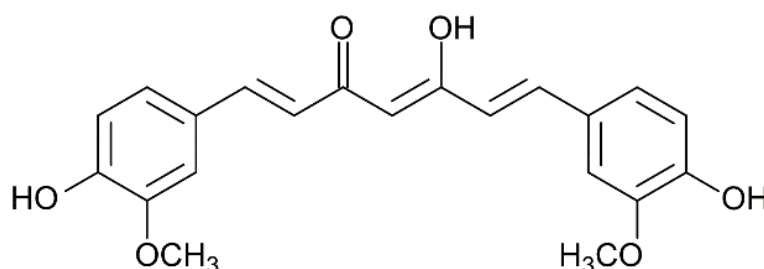


Figure 2.b) Curcumin chemical structure (Enolic form)

Curcumin presents a very poor solubility, but it can be increased by its incorporation in cyclodextrin, as well as development of amorphous solid dispersion. Cyclodextrins (CDs) (figure 3) are cyclic oligomers of glucose that can form water-soluble inclusion complexes with small molecules or fragments of large compounds (21).

CDs are cyclic oligosaccharides with six, seven or eight glucose units linked by α -(1,4)-glucosidic bonds, named, respectively, α -, β - and γ -CD, with a hydrophilic outer surface and lipophilic central cavity. Hydrophilic drug/cyclodextrin complexes are formed by inclusion of lipophilic drug or lipophilic drug moiety in the central cyclodextrin cavity. The lipophilic cavity thus protects the lipophilic guest molecule from aqueous environment, while the polar outer

surface of the CD molecule provides the solubilizing effect (22,23). Commonly used cyclodextrins are β -CD, γ -CD, and derivatives such as hydroxypropyl- β -CD (HP β CD) and methyl β -CD (M β CD). Many studies on enhancement of solubility of curcumin with cyclodextrins have been reported (23).

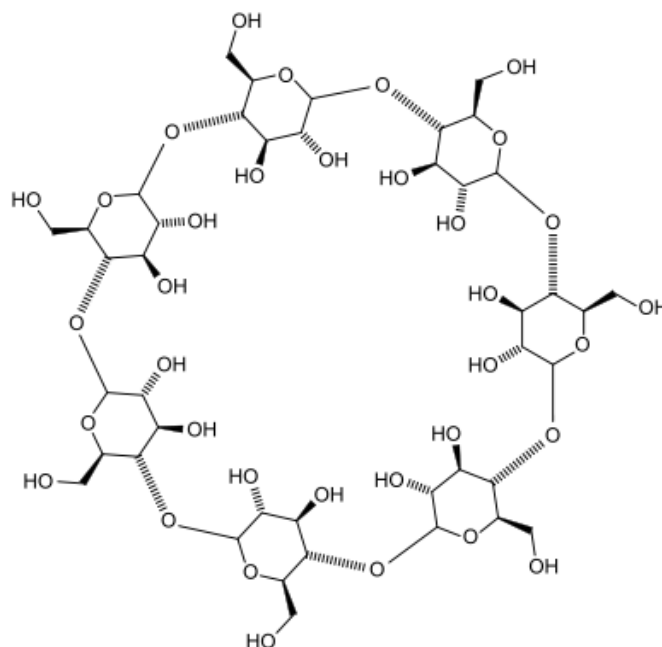


Figure 3 Beta cyclodextrin chemical structure

Curcumin-cyclodextrin complex can be obtained by different methods, freeze-drying is a widely used complexation technique especially useful for heat labile guests, such as curcumin, and water soluble hydroxypropylated cyclodextrin complexes. Considering the elongated, symmetrical shape of curcumin, the stoichiometry between cyclodextrins and curcumin has been reported to be 2:1 (host:guest) molar ratio, in which a CD encapsulates one of the two phenyl rings of curcumin (figure 4) (24). This has been confirmed by fluorescence measurement studies (25).

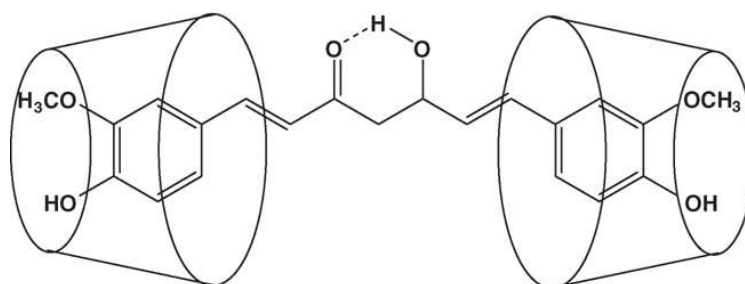


Figure 4 Proposed inclusion complex formation of curcumin with cyclodextrrin. (17)

Amorphous solid dispersion is an approach that is getting increasingly popular attention because its broad applicability for a broad range of poorly water-soluble drugs. Solid dispersion can be described as “the dispersion system containing single or more active ingredients in an inert matrix of carrier that can be prepared by the melting or fusion method, solvent or melting-solvent method” (26). Amorphous solid dispersions can be defined as a molecular mixture of amorphous drug in a polymeric amorphous carrier, which present a drug release profile that is driven by the polymer properties (27). The choice of polymer is important and the polyvinylpyrrolidone (PVP) is among the most commonly used carriers for amorphous solid dispersions. PVP is soluble in both hydrophobic and hydrophilic solvents and presents favorable thermoplastic characteristics. For solid dispersions PVP K12 to K30 (MW 2500-50,000) has been widely used and PVP K30 was applied to improve dissolution of curcumin in 0.1N HCl (28). Among the different Curcumin–PVDK30 ratio (1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10), the best results on *in vitro* dissolution rate was ensured as 1:8 (m:m). Amorphous solid dispersions with PVP generally exhibit increased dissolution rate and higher apparent drug solubility in aqueous solution when compared to the crystalline drug compound (29). The amorphous solid dispersion used in our study is a 1:9 ratio.

III.2 FTIR analysis

FTIR results of the different curcumin forms are presented in figures 5, 6, 8 and 9 corresponding to CN, CCD, C-PVP and pure PVP respectively.

In agreement with Bitch and al. (30), the keto form is found in the solid state and the enol form in solution. In this FTIR analysis, all spectra were obtained with solid state and so spectrums show bands of the diketo form. From the first spectrum of the natural curcumin (figure 5), in the highest frequency region we can identify a first thin band at 3507 cm^{-1} that corresponds to the free O–H stretching followed by a large band at 3337 cm^{-1} that is specific to the linked O–H by the intermolecular hydrogen bonds. In the middle region, the band at 1625 cm^{-1} is assigned to the C=O stretching of the diketo form, then two characteristic bands of the benzene skeleton vibrations at 1600 cm^{-1} and 1506 cm^{-1} and a characteristic band at 1274 cm^{-1} of the plane deformation vibration of the C–CH of phenyl rings. Furthermore, the bands at 1429 cm^{-1} , 1203 cm^{-1} and 1152 cm^{-1} can be attributed the deformation vibration of the two CH_3 groups, the C=C–H bending interring chain and the C–O–C stretching respectively. In the low region, we can observe clear bands at 1024 cm^{-1} , 808 cm^{-1} and 713 cm^{-1} that indicate the C–H deformation out of plane of the aromatic ring. All observed bands are characteristics to the curcumin structure.

In the second FTIR spectrum of Curcumin/Cyclodextrin complex (figure 6), we observe some characteristic bands of the curcumin structure however, other curcumin characteristic bands are hidden under the cyclodextrin bands due to the low concentration of curcumin in this complex. The other bands figuring are typical of the cyclodextrin structure. In the high frequency region, bands at 3299 cm^{-1} and 2922 cm^{-1} indicate the free O–H stretching vibration and C–H stretching present on the cyclodextrin polymer respectively, then in the middle zone, we can find characteristic bands of the stretching vibration of the benzene ring in curcumin at 1624 cm^{-1} and 1512 cm^{-1} . Then we can identify the following strong bands in the low region that indicate the carbohydrate functions present on the cyclodextrin polymer at 1153 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} and 1024 cm^{-1} which correspond to the C–C stretching, the C–O stretching of the secondary alcohol and ether function and to O-H bending respectively. A last band at 840 cm^{-1} indicates the glycosidic linkage between dextrin units (31).

FTIR spectrums of C-PVP solid dispersion (figure 8) and pure PVP (figure 9) show many common bands that are characteristic of the PVP function (figure 7). The only specific band of the curcumin molecule can be observed in the high region at 3406 cm^{-1} that correspond to the free O–H stretching. The specific absorption band at 2953 cm^{-1} is assigned to the asymmetric CH_2 stretching vibration in pyrrolidone, then in the middle region we can clearly identify the bands at 1651 cm^{-1} , 1421 cm^{-1} and 1286 that represent the C=O stretching, the C–H bending and the C–N bending of pyrrolidone (32).

Only in the case of natural curcumin where the characteristic peaks of the curcumin structure appear, however, in the other forms, the peaks are not appearing because of the low purity of curcumin.

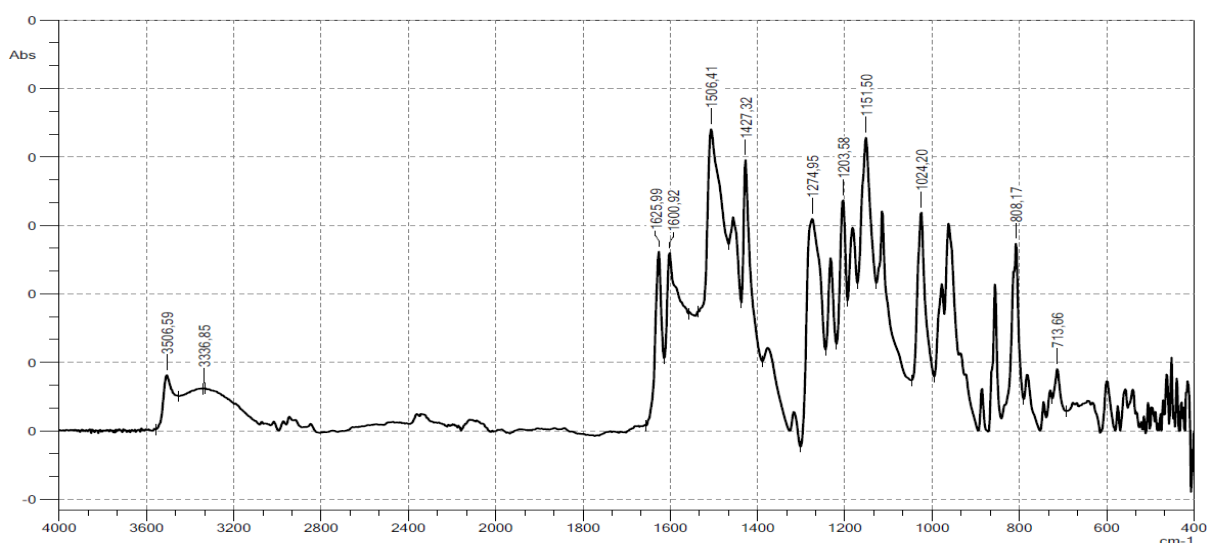


Figure 5 FTIR Spectrum of Natural Curcumin (CN)

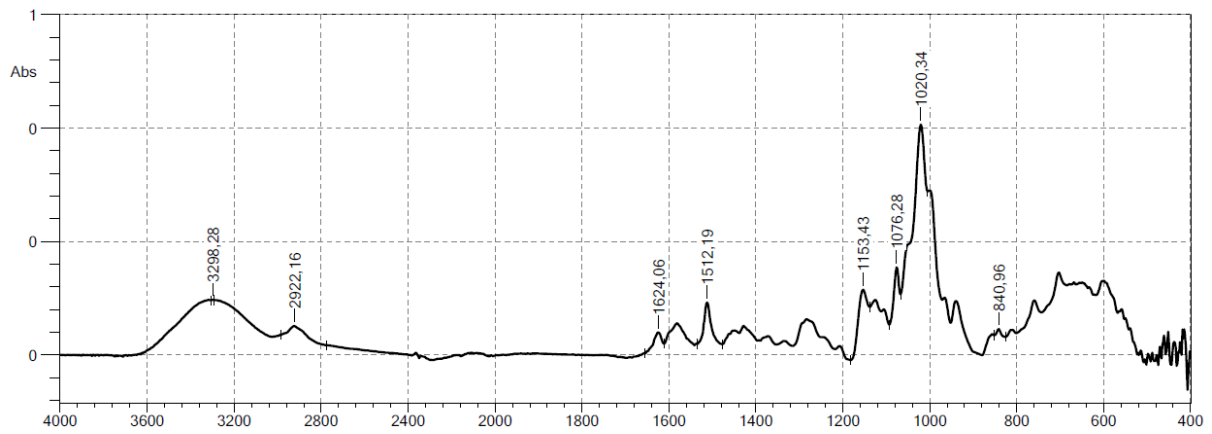


Figure 6 CCD FTIR Spectrum

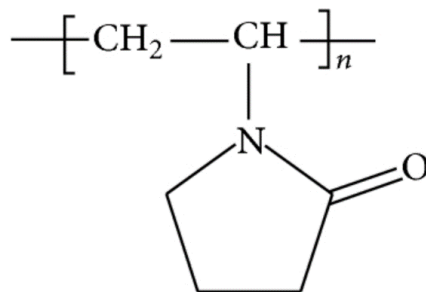


Figure 7 Polyvinylpyrrolidone chemical structure

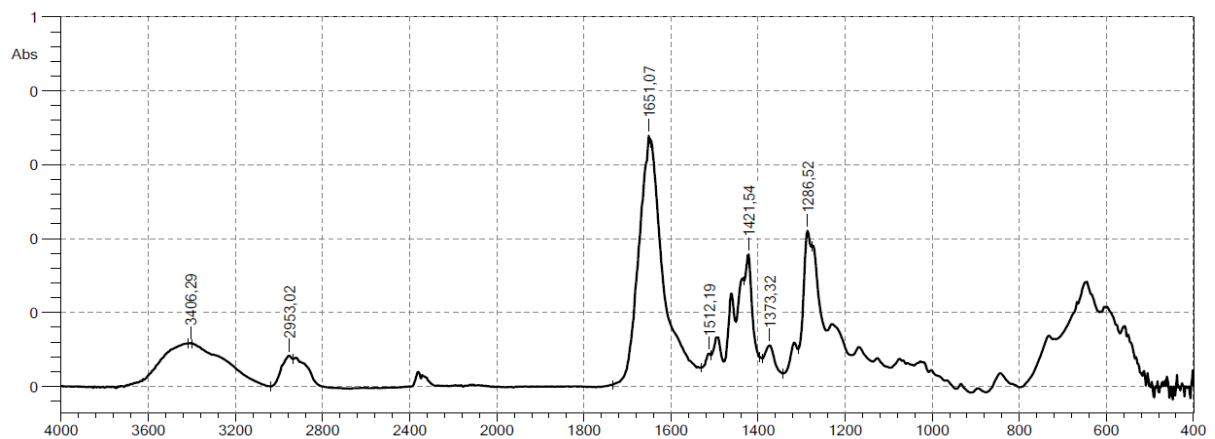


Figure 8 FTIR Spectrum of PVP solid dispersion curcumin (C-PVP)

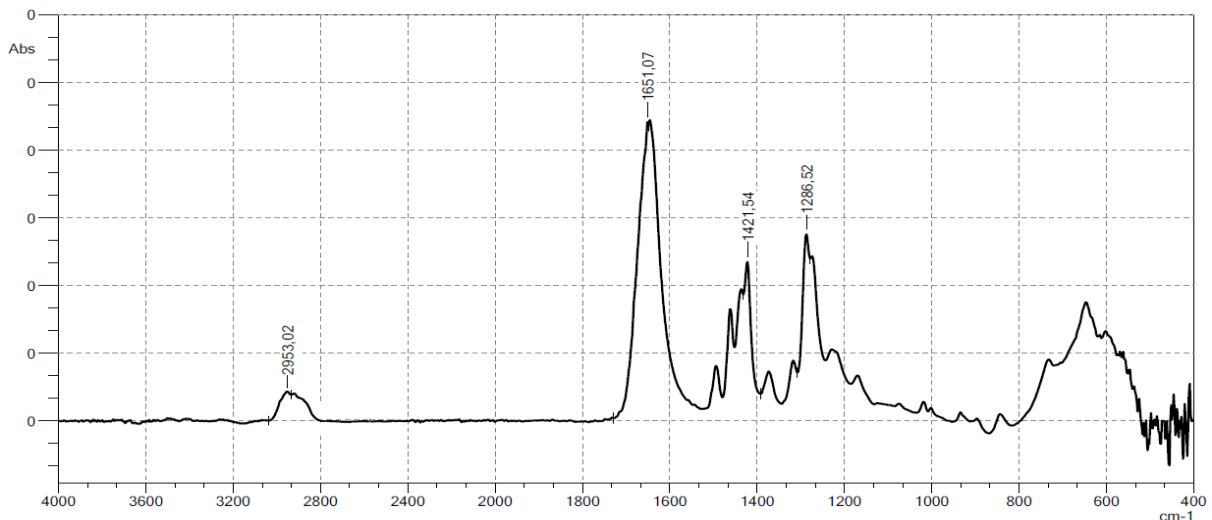


Figure 9 FTIR Spectrum of pure PVP

III.3 Powder X-Ray Diffraction

X-ray diffraction analysis was applied to investigate the crystallinity of the different curcumin powders. Diffractograms, presented in figure 10, show a loss of the crystalline structure going from the standard extract to formulations. CN presents characteristic peaks on diffraction angle of 2θ at 7.90° , 12.3° , 14.6° , 17.35° , 18.2° , 24.7° , 25.7° and 27.5° in agreement with literature data showing good crystalline form (21).

However, the diffractogram of CCD exhibits the disappearance of some of the curcumin spectral lines keeping only common peaks at diffraction angle of 2θ at 12.3° and 14.6° with appearance of some large peaks indicating the presence of new solid crystalline phases that may correspond the curcumin- β -Cyclodextrin complex.

In solid dispersion C-PVP show a flat diffractogram, the CN peaks disappeared C-PVP, confirming a total amorphous structure.

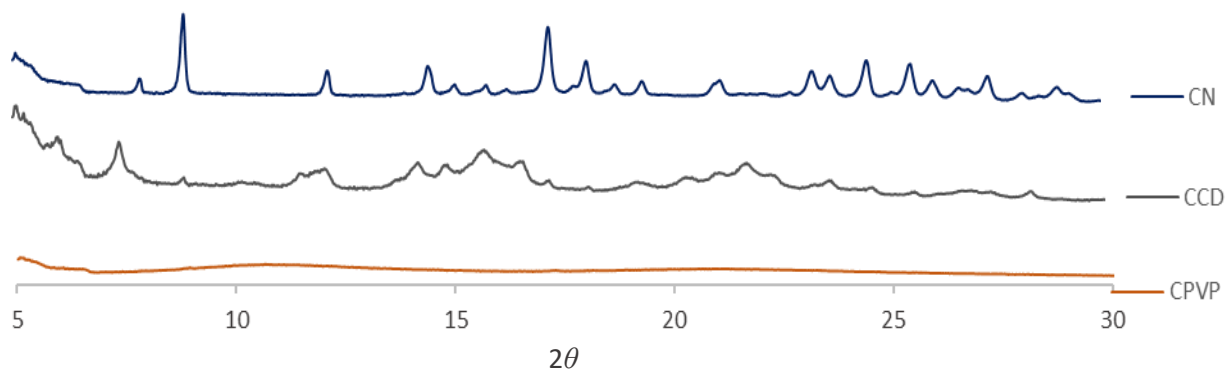


Figure 10 X-ray diffraction pattern of curcumin samples

The modification of CN, either in form of a complex with CD or as an amorphous solid dispersion with PVP, need the combination of different analytical techniques such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry, nuclear magnetic resonance spectroscopy, X-ray diffraction (XRD) spectroscopy, etc... to clearly identify the real change in structure. In our study FTIR and XRD were performed. For the CCD complex, for FTIR analysis, H-O-H deformation bands present in cyclodextrins mask spectral bands in the desired regions of 1600–1700 cm⁻¹. It is difficult to prove formation of inclusion complexes using FTIR spectroscopy. The XRD spectra of CN reveals that the commercial curcumin exists in a crystalline form whereas CD is amorphous in nature. In the case of CCD complex, the spectrum exhibits features of a compound that lacks a well defined crystalline structure. Other techniques, such as Raman spectroscopy could be an excellent tool for studying inclusion complex formation. In case of amorphous solid dispersion, the XRD analyses allows the determination of amorphous state of the solid dispersion. Due to anti-plasticizing activity of PVP, viscosity of the binary system increases, which thereby decreases the diffusion of drug molecules necessary to form crystal lattice. These results highlight the need to combine different analytical techniques when structural modifications such as cyclodextrin or solid dispersion are formulated.

III.4 Particle size measurement

Particle size results are presented in figure 11 (a, b and c). The distribution of the different batches are displayed in % volume of particles. The main parameters of distribution (Dv10, Dv50 and DV90 are gathered in table 1 for the different batches tested.

	<i>CN</i>	<i>CCD</i>	<i>C-PVP</i>
<i>Dv90 (μm)</i>	<i>159</i>	<i>83,3</i>	<i>347</i>
<i>Dv50 (μm)</i>	<i>35,6</i>	<i>11,5</i>	<i>189</i>
<i>Dv10 (μm)</i>	<i>7,2</i>	<i>4,67</i>	<i>81,7</i>

Table 1 Distribution volumes 10, 50 and 90 of curcumin samples

There is a great difference between the different powders in term of particle size distribution. The CN powder presents a wide range with two diameter populations (bimodal). In the CN powder, volumes of the particles that have different sizes is close, this means that there is as much big diameters as smaller ones. Their diameters are situated in the wide range of Dv(10) of 7.20 μm to a Dv(90) of 159 μm. CCD is also bimodal but the volume of the big particles

population is low according to the principal population, its particle sizes range from $D_v(10)$ 4.67 μm to $D_v(90)$ 83.3 μm , which represent smaller particles than CN. The complex formation of CN with CD reduces the size of particles compare to pure CN. This could be related to the spray drying process. C-PVP has bigger particles but only one population with a tight range, from $D_v(10)$ 81.7 μm to $D_v(90)$ 347 μm . The particle size of amorphous solid dispersion are greater the one of CN and PVP respectively, indicating an aggregation of the two compounds between CN and PVP during amorphous solid dispersion preparation.

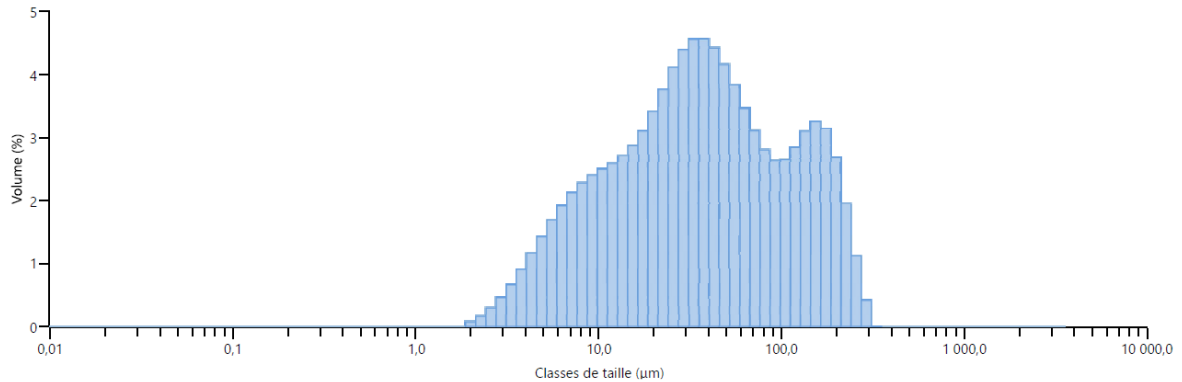


Figure 11.a) Particle size distribution of CN

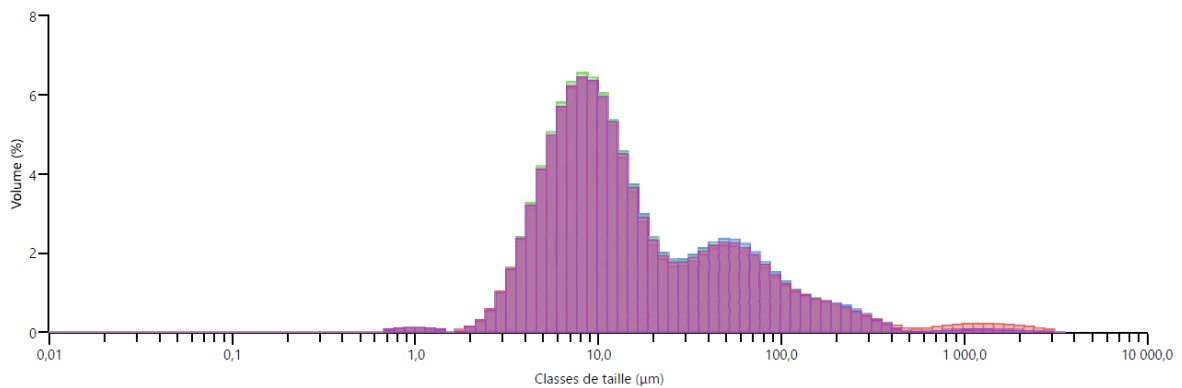


Figure 11.b) Particle size distribution of CCD

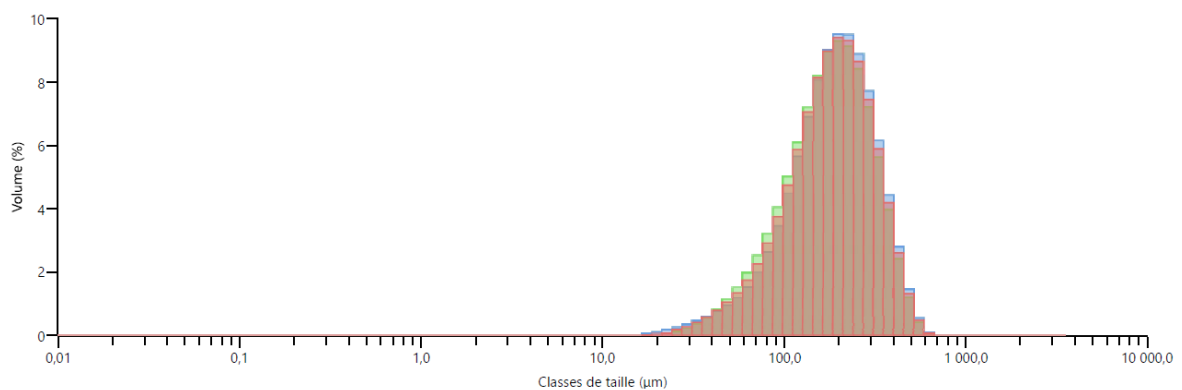


Figure 11.c) Particle size distribution of C-PVP

III.5 Solubility study

Solubility of the different batches of curcumin is presented in figure 12, expressed in $\mu\text{g/ml}$. For the non-modified curcumin (CN), solubility is very low, it ranges from 0.21 $\mu\text{g/ml}$ to 0.35 $\mu\text{g/ml}$ in the different pH. The data are in accordance with those already published, the solubility of curcumin in water was estimated at practically zero in acidic and neutral pH. Curcumin is soluble in alkali, the pKa values for the dissociation of the three acid protons in curcumin have been determined to 7.8, 8.5 and 9.0 respectively and when dissociation takes place, the compound rapidly undergoes hydrolytic degradation, which limits its application (33). As expected, the modifications of curcumin by CD complex formation or amorphous solid dispersion preparation, increase drastically the solubility. For the modified curcumin, CCN represents around 10 times the solubility of the conventional curcumin, it ranges from 46.91 $\mu\text{g/ml}$ to 54.26 $\mu\text{g/ml}$. However, the solubility of the C-PVP is 200 times higher, it ranges from 753.72 $\mu\text{g/ml}$ in pH 6.8 to 1097.48 $\mu\text{g/ml}$ in pH 4.5.

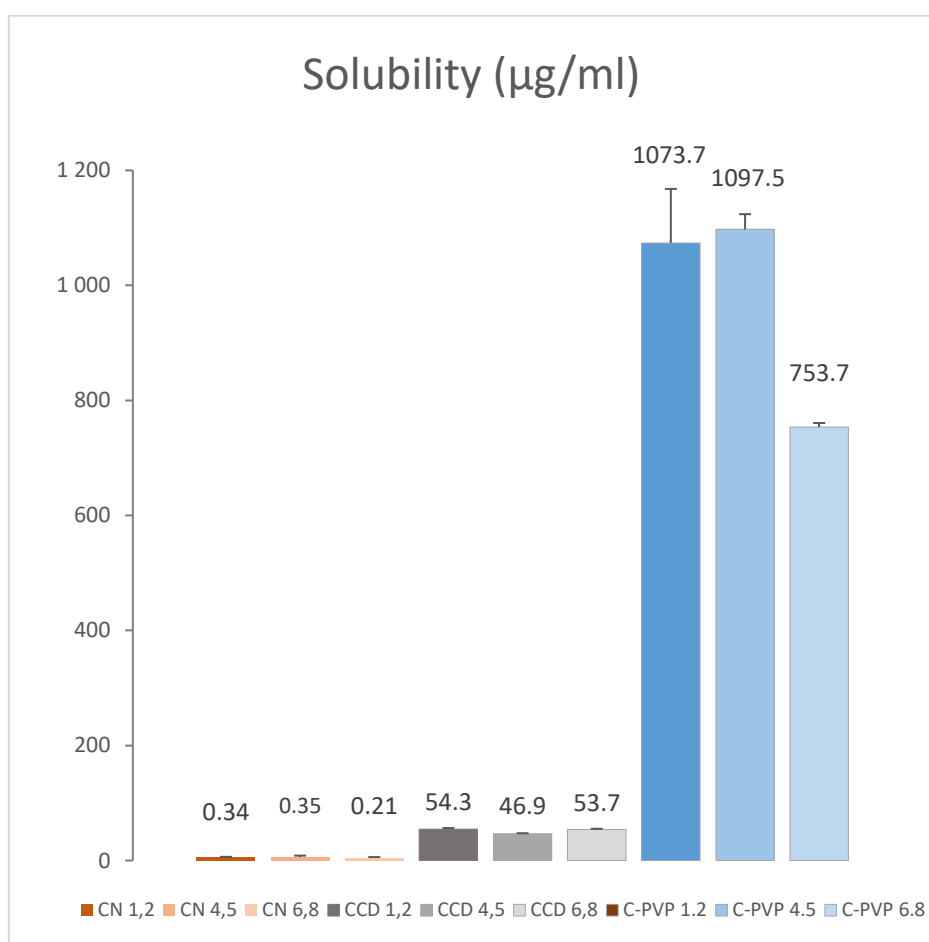


Figure 12 Curcumin solubility in different dissolution media (pH 1.2, pH 4.5 and pH 6.8)

The solubility of curcumin, is very low whatever the pH. Compounds with aqueous solubility lower than 0.1 mg/mL often present dissolutions restricted to absorption (34). Taking into account the large dose of curcumin, maximal dose according to EFSA Journal (35) is 500 mg/day, curcumin can be considered as a poor soluble compound according to the BCS classification. This could justify the need for improving the solubility by a factor of minimum 10 times and the selection of techniques such as CD complex, amorphous solid dispersion or other methods such as self-microemulsifying drug delivery system or nanoparticles formulations.

III.6 Dissolution test

Results of the USP4 dissolution are presented in figure. 13 (a, b and c) as the amount and % dissolved of the different curcumin batches expressed in mg in function of time an. The % dissolved and the amount at 120 min are displayed in table 2.

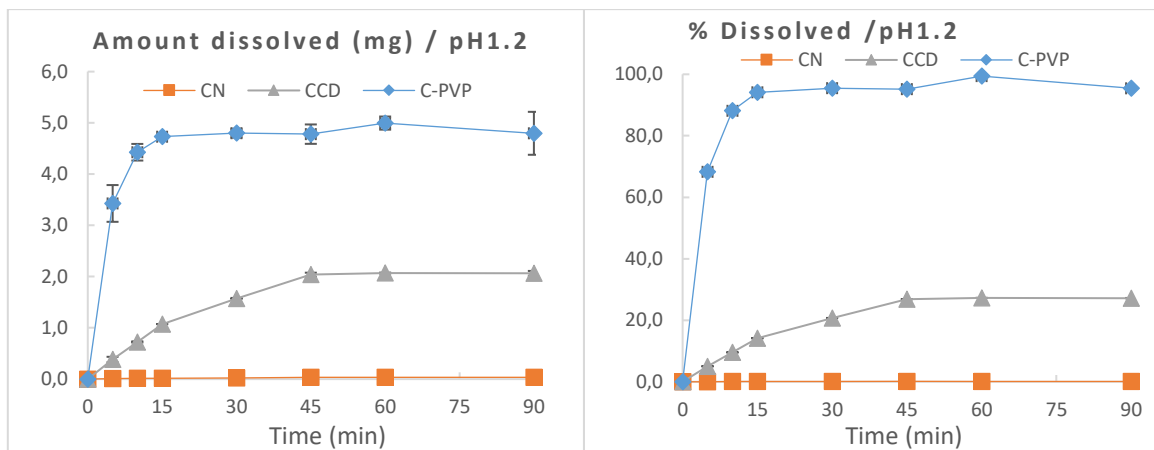


Figure 13.a) Curcumin raw material dissolution in pH 1.2 in amount and percent dissolved expressed in curcumin (n=3)

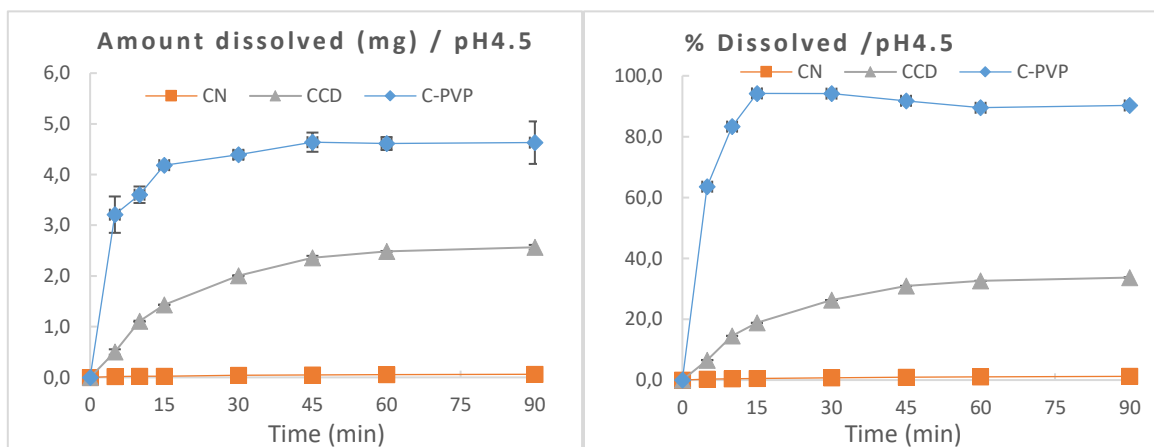


Figure 13.b) Curcumin raw material dissolution in pH 4.5 in amount and percent dissolved expressed in curcumin (n=3)

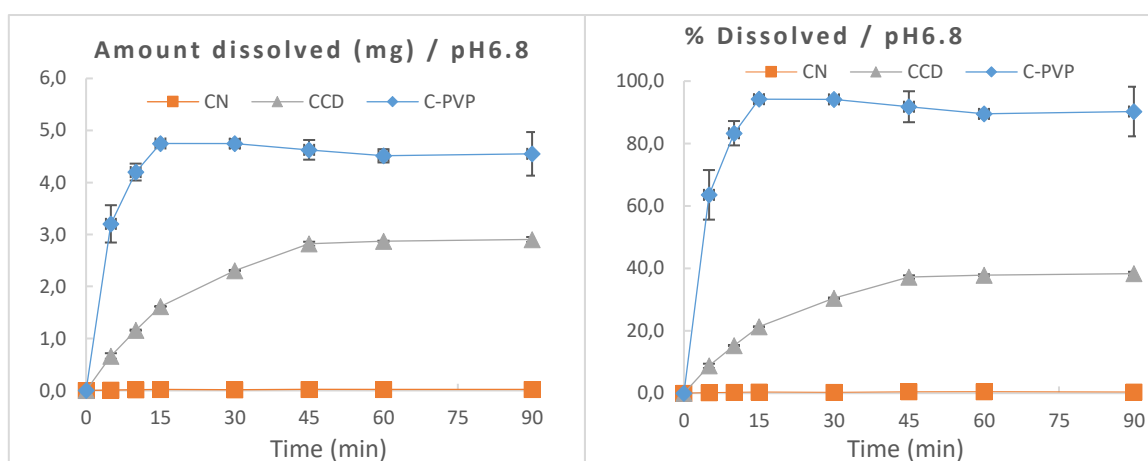


Figure 13.c) Curcumin raw material dissolution in pH 6,8 in amount and percent dissolved expressed in curcumin (n=3)

	<i>CN</i>	<i>CCD</i>	<i>C-PVP</i>
<i>Quantity at 120 min (mg) in pH 1,2</i>	0.03 ± 0.01	2.2 ± 0.1	5.0 ± 0.1
<i>% Dissolved in pH 1,2</i>	0.1 ± 0.0	28.5 ± 1.9	99.6 ± 1.6
<i>Quantity at 120 min (mg) in pH 4,5</i>	0.07 ± 0.01	2.6 ± 0.3	4.7 ± 0.3
<i>% Dissolved in pH 4,5</i>	1.4 ± 0.1	34.5 ± 4.0	92.3 ± 6.0
<i>Quantity at 120 min (mg) in pH 6,8</i>	0.02 ± 0.00	3.0 ± 0.2	4.6 ± 0.3
<i>% Dissolved in pH 6,8</i>	0.5 ± 0.0	40.1 ± 2.4	91.7 ± 5.1

Table 2 Amount released at 120 min and % dissolved of curcumin samples in pH 1.2, 4.5 and 6.8

The amount of curcumin in the 50 mg powder of the three samples studied, taking into account the purity, was 25 mg, 7.5mg and 5.0 mg for the natural curcumin (CN), curcumin-cyclodextrin complex (CDD) and curcumin-PVP solid dispersion (C-PVP) respectively. According to the solubility results, the dissolution was performed in sink conditions for CDD (30% of saturated concentration at maximum dissolution) and C-PVP (1% of saturated concentration at maximum dissolution). The non-sink conditions were applied for CN.

There is a great difference between the dissolution of curcumin from the three samples. Dissolution is correlated to solubility where more the curcumin sample is soluble, the faster it dissolves. As expected, the amount dissolved for CN is very low. As the drug is practically insoluble in buffer pH, the amount and % released are 1% of pure curcumin being dissolved within 120 minutes. The pure curcumin exhibits the slowest dissolution rate because of its

hydrophobicity that causes the powder, to float on the dissolution medium when it enters in the cell, and to stay at the top of the cell in form of large aggregates of powder. This prevents the surface of the particle to enter in contact with the dissolution medium.

For the CDD, only 2.2 to 3 mg over the 7.5 mg of curcumin in the powder were dissolved, corresponding to 30 to 40% of the amount available. Despite the sink conditions, whatever the pH studied, more than 60% of curcumin is still undissolved. This could be due to the structure and amount of real complex in the original powder. Even physical mixture of CN with CD leads to solubility enhancement of the drug; this is attributed to the self-aggregation of cyclodextrins in solution (36). The physical mixture is a simpler formulation compared to the complex, obtained generally by spray drying, and seems interesting from a processing viewpoint, since the steps involved in making the complex would be skipped. Nevertheless, studies with physical mixtures have shown that bioavailability enhancement is obtained for inclusion complexes rather than physical mixtures (37). If the powder is a mixture of complex and physical mixture rather than a pure complex, this could impact the gradient concentration between dissolved and undissolved curcumin and lead to an equilibrium in dissolution lower than the one expected in case of pure complex. There is few information from the supplier concerning the process to obtain the complex and the nature of the association between CN and CD. The FTIR analysis and XRD were unable to prove the complex between CN and CD. Additional studies such as DCS or FT-Raman spectroscopy could help to explain the association between CN and CD.

The dissolution rate of C-PVP is remarkably enhanced compared to the pure curcumin. All the amount curcumin (5 mg) of the C-PVP is dissolved in 15 min whatever the pH studied and there is no evidence of supersaturation and precipitation as there is no decrease of the % dissolved over the 2 hours of experiment. It is known that amorphization in the solid-state increases solubility and dissolution rate of a compound especially when it is hydrophobic. Different mechanisms have been proposed to explain the increase in drug dissolution from solid dispersions (27). In our case, the increase in curcumin dissolution from the C-PVP can be i) an improvement of wettability, observed in the cell during dissolution study, since there is a dispersion of the powder with the dissolution medium, ii) an increase in curcumin solubility, as determined during solubility study, iii) the solubilizing effect of the carrier, an absence of aggregation and agglomeration, as observed in particle size analysis and iv) an amorphous state as confirmed XRD. This result is similar to those found in other publications about C-PVP evaluations (28, 38).

III.7 Evaluation of apparent permeability with Caco-2 cells

Caco-2 results, expressed as mean \pm standard error of the amount absorbed (μg), the rate (%), apparent permeability (P_{app}) and the enhancement ratio (R) for the three curcumin samples are presented in figure 14 and table 3.

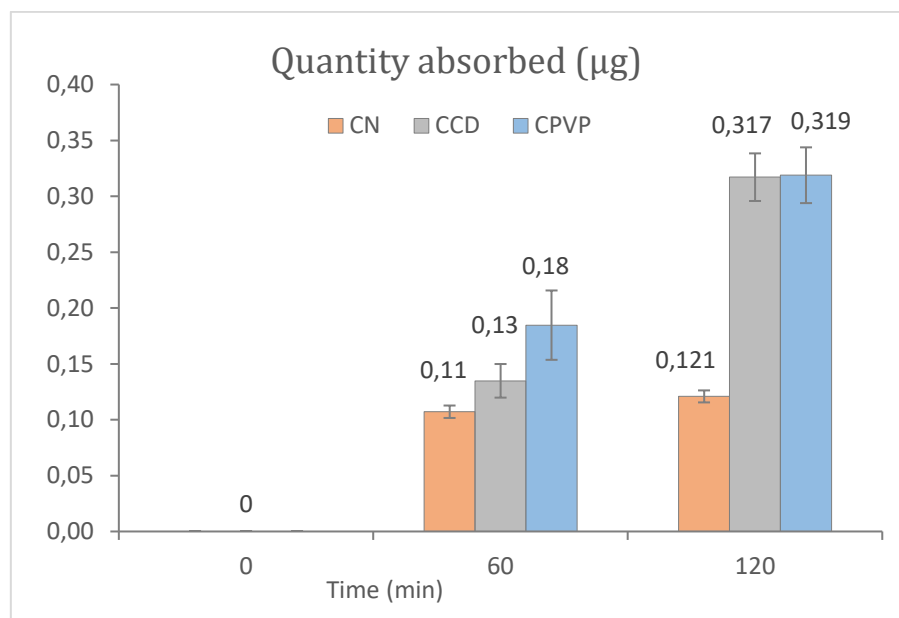


Figure 14 Amount absorbed of curcumin samples on Caco2 cells at 1h and 2h.

Sample	Absorption (at 120 min)		$P_{\text{app}} (\times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1})$	R
	μg	%		
CN	$0,121 \pm 0,005$	$19,34 \pm 0,86$	$1,20 \pm 0,005$	1
CCD	$0,317 \pm 0,021$	$50,74 \pm 3,41$	$3,15 \pm 0,21$	2,62
CPVP	$0,319 \pm 0,025$	$51,02 \pm 3,99$	$3,16 \pm 0,024$	2,64

Table 3 Evaluation of mean apparent permeability (P_{app}) of CN, CCD and CPVP across Caco-2 cell monolayers after 2h incubation.

The absorption of curcuma across the monocellular layer is very low. Less than 20 to 50 % of the amount deposited on the apical side reaches the basolateral side CN and CCD and C-PVP respectively. The suspensions prepared take into account the % of curcumin of each sample (from 50% to CN to 15% for CDD and 10% for C-PVP). As expected, the apparent coefficient of CN is very low. The apparent permeability coefficient, calculated at 120 min is lower than the value of $5 \cdot 10^{-6} \text{ cm/sec}$ defined as the limit of high permeability for drugs in the BCS. In such

conditions, curcumin could be considered as a low permeability product. Caco-2 permeability shows that the modified curcumins (CCD and CPVP) enhance the amount of drug have very in the basolateral site. The two different approaches to enhance bioavailability gave similar results. The apparent permeability is approximatively the same, $P_{app} \approx 3,16 \cdot 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$ and it is 2.6 times greater than the standard natural curcumin extract. The curcumin can be considered as a class IV drug, this means that both solubility and permeability limit the bioavailability of the compound. Any change in solubility, dissolution rate or permeability can enhance the bioavailability; however, in case of class IV drug, the influence can be limited depending of the driving force governing the input of drug in the systemic circulation.

Cell viability at 120 min (figure 15) is not modified in the presence of curcumin suspensions compare to the standard without product. More than 90% of cells are viable after 120 min. The curcumin has no impact on cell mortality, at studied concentrations.

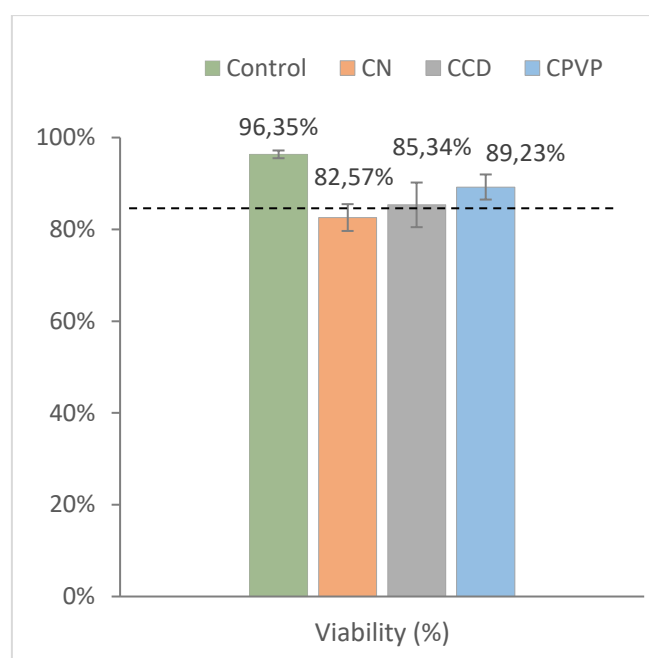


Figure 15 Cell viability (%) of curcumin samples tested on Caco-2.

At T_0 the mean TEER value was superior to $1000 \pm 150 \Omega\text{cm}^2$ for all curcumin samples indicating a good junctional formation of the Caco-2 cell monolayers. After application of the different curcumin solutions on the cells, TEER values decreased significantly according to control reaching at T_{2h} 58% for CN ($p < 0,01$) and 78% and 70% for CCD and C-PVP respectively. After the test, apical samples were removed and replaced with fresh medium, to allow the full recovery of the cells. TEER values monitored increased after 48h to reach 80% of the initial values, indicating the full recovery of the cellular monolayer (figure 16).

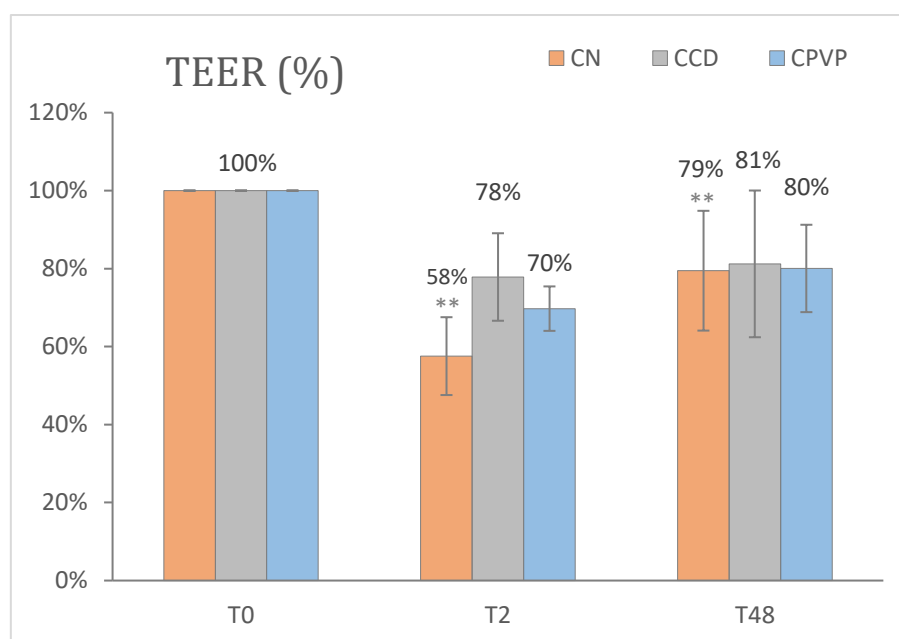


Figure 16 TEER (%) profiles evaluated at T0, T2 and T48. TEER value statistically different from the control * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$.

Previously studies on curcumin absorption reported a passive diffusion with no role played by P-gp efflux on curcumin permeability, confirmed with verapamil (a P-gp inhibitor) (39). The major factors that influence its transport through the Caco-2 cell were the degradation of curcumin in alkaline buffer used, metabolism and accumulation within the cells. Pharmacokinetic studies suggest that the poor absorption, the high metabolism rate and/or the rapid curcumin elimination are the major reasons for its poor bioavailability. In the most cases in the literature, curcumin is detected as glucuronide and sulphate conjugates in plasma after oral dosing in humans (40). It is noteworthy to clarify whether the bioactivity of curcumin result from the initial compound or from its metabolites (41). Some studies, on rat intestine model, present conflicting absorption results. A first study showed that less than 3% of curcumin was found in the intestinal tissues after 3 h of incubation (42), while the second one found about 40 to 80% of curcumin absorbed, arguing that difference with the previous research may be due to the improved sensitivity of the analytical methods (43). After a dosage of 10–400 mg [^3H] curcumin in animals, the primary route to eliminating curcumin was through feces, suggesting poor absorption of curcumin (44).

IV. Conclusion

Curcumin is a natural compound having big scientific research attention, showing over the past years big variety of pharmacological activities without producing any toxicity in many clinical trials. Curcumin is marketed as a food supplement in many countries but cannot be licensed as a drug, surely because of the limitations such as lower water solubility and absorption levels as well as its multi-target property.

In agreement with the published data, curcumin is a poorly water-soluble drug and given its low permeability it can be considered as a class IV on the biopharmaceutical classification, making it hard to estimate a real bioefficacy and a stable bioavailability. All these findings indicate that curcumin has high potential in human health, but need an effective improvement. Results obtained in this study, characterizing three types of curcumin, clearly demonstrate that the characterization and biopharmaceutical evaluation of the compound are great quality control and bioavailability prediction tools, highlighting the main factors limiting bioavailability such as low aqueous solubility and low permeability in the case of curcumin.

Modified curcumin product such as cyclodextrin complex, solid dispersion but also self-emulsifying products or nanoparticles can be used in food supplements manufacturing. This raises questions and indicates that marketed nutritional supplement could be very different and that bioavailability can drastically varies from one product to another. In our case, we can clearly predict that the modified ingredients, which are waters soluble products (cyclodextrin complex or solid dispersion), will have better *in vivo* bioefficacy and bioavailability over the phytostandard extract's. A standardized development method should be considered in the field of nutritional supplements in order to develop good quality products.

V. References

- 1 - Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin: getting back to the roots. *Ann.N. Y. Acad. Sci.* 1056:206–217, 2005.
- 2 - Cronin JR. Curcumin: Old Spice Is a New Medicine. *Altern Complement Ther.*, 9(1):34-8, 2003.
- 3 - Khattak S, Saeed-ur-Rehman null, Ullah Shah H, Ahmad W, Ahmad M. Biological effects of indigenous medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galanga*. *Fitoterapia*, 76(2):254-7, 2005.
- 4 - Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Green CJ. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.*, 28(8):1303-12, 2000.
- 5 - Nishiyama T et al. Curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) suppress an increase in blood glucose level in type 2 diabetic KK-Ay mice. *J Agric Food Chem.*, 53(4):959-63, 2005.
- 6 - Vareed SK, Kakarala M, Ruffin MT, Crowell JA, Normolle DP, et al., Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 17:1411–1417, 2008.
- 7 - Sanidad, K. Z., Sukamtoh, E., Xiao, H., McClements, D. J., & Zhang, G., Curcumin: Recent Advances in the Development of Strategies to Improve Oral Bioavailability. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 2019.
- 8 - Mohamed, S.A.; El-Shishtawy, R.M.; Al-Bar, O.A.M.; Al-Najada, A.R. Chemical modification of curcumin: Solubility and antioxidant capacity. *Int. J. Food Prop.*, 20, 718–724, 2017.
- 9 - Hernandez-Patlan, et al, Evaluation of a Solid Dispersion of Curcumin With Polyvinylpyrrolidone and Boric Acid Against *Salmonella Enteritidis* Infection and Intestinal Permeability in Broiler Chickens: A Pilot Study. *Frontiers in Microbiology*, 9. 2018
- 10 - Pharmacopée Européenne, Conseil de l'Europe Strasbourg, France, 2.9.3 Essai de dissolution des formes solides, 10ème Ed, 2019
- 11 - Santos RM. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. *Am J Pharm Educ.*, 70(5). 2006.

- 12 - Martin AN, Sinko PJ. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences*. Lippincott Williams & Wilkins, 659 p, 2011
- 13 - Beyssac E, Lavigne J. Dissolution study of active pharmaceutical ingredients using the flow through apparatus USP 4. *Dissolution Technol*, 2005; 12(2):23-25.
- 14 - Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc*, 2(9):2111-9, 2007
- 15 – Ferruzza, S., Scacchi, M., Scarino, M.L., Sambuy, Y., Iron and copper alter tight junction permeability in human intestinal Caco-2 cells by distinct mechanisms. *Toxicol. In Vitro* 2002.
- 16 - Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2 nov 2015;111:A3.B.1-A3.B.3.
- 17 - Wichitnithad W, Jongaroonngamsang N, Pummangura S, Rojsitthisak P. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochem Anal*. 1 juill 2009;20(4):314-9.
- 18 - Dolores M, Villaseñor A, Vázquez AR, Jung H, Rios VHS, López-Arellano R. Full validation of curcumin analytical method by LC-MS/MS points out that the degree of hemolysis in plasma affects the quantitation: application in dog plasma study. *J Mex Chem Soc* 62(4), 2018.
- 19 - PubChem D. National Center for Biotechnology Information. Curcumin, CID=969516, [Internet] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>.
- 20 - Manolova Y, Deneva V, Antonov L, Drakalska E, Momekova D and Lambov N: The effect of the water on the curcumin tautomerism: A quantitative approach. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 132: 815-820, 2014.
- 21 - Mangolim C.S., Moriwaki C., Nogueira A.C., Sato F., Baesso M.L., Neto A.M., Matioli G. Curcumin-beta-cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FTIR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chem.*, 153:361–370, 2014,
- 22 - Yadav, V. R., Suresh, S., Devi, K., & Yadav, S. Effect of Cyclodextrin Complexation of Curcumin on its Solubility and Antiangiogenic and Anti-inflammatory Activity in Rat Colitis Model. *AAPS PharmSciTech*, 10(3), 752–762, 2009. Doi10.1208/s12249-009-9264-8

- 23 - Marcolino V.A., Zanin G.M., Durrant L.R., Benassi M.D.T., Matioli G. Interaction of curcumin and bixin with beta-cyclodextrin: Complexation methods, stability, and applications in food. *J. Agric. Food Chem.* 2011.
- 24 - Mohan, P. R. K., Sreelakshmi, G., Muraleedharan, C. V., & Joseph, R. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 2012.
- 25 - Baglole, K. N., Boland, P. G., & Wagner, B. D. Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into parent and modified cyclodextrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 173(3), 230–237, 2005.
- 26 - Saneja, A., Panda, A. K., & Lichtfouse, E. (Eds.). *Sustainable Agriculture Reviews 43. Sustainable Agriculture Reviews*, 2020.
- 27 - Vasconcelos, T., Sarmiento, B., & Costa, P., Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today*, 12(23-24), 1068–1075, 2007.
- 28 - Paradkar, A., Ambike, A. A., Jadhav, B. K., & Mahadik, K. R. Characterization of curcumin–PVP solid dispersion obtained by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 271(1-2), 281–286, 2004.
- 29 - Knopp, M. M., Nguyen, J. H., Becker, C., Francke, N. M., Jørgensen, E. B., Holm, P., ... Langguth, P. (2016). Influence of polymer molecular weight on in vitro dissolution behavior and in vivo performance of celecoxib:PVP amorphous solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 101, 145–151, 2016.
- 30 - Bich VT, Thuy NT, Binh NT, Huong NTM, Yen PND, Luong TT. Structural and Spectral Properties of Curcumin and Metal- Curcumin Complex Derived from Turmeric (*Curcuma longa*). In: Cat DT, Pucci A, Wandelt K, éditeurs. *Physics and Engineering of New Materials*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009. p. 271-8.
- 31 - Chen J, Qin X, Zhong S, Chen S, Su W, Liu Y. Characterization of Curcumin/Cyclodextrin Polymer Inclusion Complex and Investigation on Its Antioxidant and Antiproliferative Activities. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem* 23(5), 2018:
- 32 - Safo IA, Werheid M, Dosche C, Oezaslan M. The role of polyvinylpyrrolidone (PVP) as a capping and structure-directing agent in the formation of Pt nanocubes. *Nanoscale Adv.* 2019.

- 33 - Tønnesen, H. H., Másson, M., & Loftsson, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 244(1-2), 127–135. 2002.
- 34 – Hörter, D., & Dressman, J. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 75–87. 2001.
- 35 - EFSA Journal 2010; 8(9):1679. Scientific Opinion on the re-evaluation of curcumin (E 100) as a food additive. 2010;8(9):1679.
- 36 - Loftsson, T., Magnúsdóttir, A., Másson, M., & Sigurjónsdóttir, J. F., Self-Association and Cyclodextrin Solubilization of Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(11), 2307–2316, 2002. doi:10.1002/jps.10226
- 37 - Carrier, R. L., Miller, L. A., & Ahmed, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, 123(2), 78–99, 2007.
- 38 – Kaewnopparat, N., Kaewnopparat, S., Jangwang, A., Maneenaun, D., Chuchome, T., Panichayupakaranant, P., Increased solubility, dissolution and physicochemical studies of curcumin-polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions, *World Acad. Sci. Eng. Technol.*, 31, 225-230, 2009.
- 39 - Wahlang B, Pawar YB, Bansal AK. Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model. *Eur J Pharm Biopharm.*,77(2):275-82, 2011.
- 40 - Vareed SK, Kakarala M, Ruffin MT, Crowell JA, Normolle DP, Djuric Z, et al. Pharmacokinetics of Curcumin Conjugate Metabolites in Healthy Human Subjects. *Cancer Epidemiol Prev Biomark*, 17(6):1411-7, 2008.
- 41 - Salem M, Rohani S, Gillies ER. Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: a review of its chemical properties, bioactivity and approaches to cancer cell delivery. *RSC Adv.*;4(21):10815-29, 2014.
- 42 - Ravindranath V, Chandrasekhara N. In vitro studies on the intestinal absorption of curcumin in rats. *Toxicology.*;20(2):251-7, 1981.
- 43 - Suresh D, Srinivasan K. Studies on the in vitro absorption of spice principles – Curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. *Food Chem Toxicol*, 45(8):1437-42, 2007.
- 44 - Ravindranath V, Chandrasekhara N., Metabolism of curcumin-studies with [3H] curcumin. *Toxicology*, p 337-344, Volume 22, 1981

CHAPITRE VI

Proposition d'une classification originale, basée sur la BCS, appliquée
aux ingrédients nutritionnels

Proposition d'une classification originale, basée sur la BCS, appliquée aux ingrédients nutritionnels

I. Introduction

Le terme « biodisponibilité » est utilisé pour les SA pharmaceutiques et la biodisponibilité relative sont des facteurs primordiaux dans le développement et la mise sur le marché des formes pharmaceutiques (génériques ou autre). La biodisponibilité, quantité de substance qui atteint la circulation générale et la vitesse à laquelle se produit le phénomène, est sous la dépendance, à la fois de la substance active mais aussi de la forme d'administration. La biodisponibilité orale des nutriments est définie comme la fraction de la dose de nutriment administrée, qui est absorbée par la muqueuse intestinale et qui est efficace pour l'organisme. Elle résulte de la mise à disposition des nutriments à partir de la matrice d'administration (capacité de solubilisation dans les liquides du tractus gastrointestinal), des interactions/dégradations potentielles dans l'environnement digestif (premier passage intestinal) et du passage à travers la paroi intestinale dans la circulation sanguine ou lymphatique (capacité d'absorption). Cette biodisponibilité est régie par de nombreux facteurs externes, liée à la matrice d'administration et à des facteurs internes liés directement aux patients (sexe, âge, statut nutritionnel...). La biodisponibilité est un facteur extrêmement important quant à l'efficacité et la sécurité des compléments alimentaires. Tous les compléments alimentaires ne sont pas équivalents et des formulations qualitatives et quantitatives identiques ne peuvent garantir une biodisponibilité équivalente.

La biodisponibilité peut être affectée par plusieurs paramètres qui sont souvent liés à la SA et sa matrice d'administration, et/ou liés à l'environnement digestif. La biodisponibilité est donc un facteur extrêmement important quant à l'efficacité et la qualité des compléments alimentaires. A cause du manque de réglementation, tous les compléments alimentaires ne peuvent pas être bioéquivalents même avec des formulations qualitatives et quantitatives identiques. De nombreux ingrédients nutritionnels, actuellement sur le marché sous forme de suppléments nutritionnels peuvent avoir une efficacité non-optimale en raison de leur faible solubilité et/ou biodisponibilité. Dans ces conditions, il peut être particulièrement pertinent de disposer de méthodes simples, standardisées permettant de fournir une approche in vitro valide et fiable pour prédire ces paramètres, afin d'assurer l'efficacité des compléments nutritionnels. Ce type d'approche pourrait aider à restreindre l'utilisation de compléments alimentaires non-efficaces et améliorer la qualité et l'efficacité des suppléments actuellement commercialisés.

Contrôler les facteurs influençant la biodisponibilité permet de garantir une biodisponibilité optimale des substances contenues dans les compléments alimentaires et limiter la variabilité. Il est donc nécessaire de développer des produits sur une base rationnelle et scientifique, et de disposer, en parallèle, de méthodes standardisées permettant de garantir la biodisponibilité des actifs à partir des matrices d'administrations formulées.

Dans cette partie, l'accent sera mis sur les types de substances autorisés dans les compléments alimentaires d'un point de vue réglementaires et sur l'illustration de de la proposition d'une méthode de développement standardisée appelée « **FoSStand** » (**F**ood **S**upplément **S**tandardized **D**evelopment,) qui repose sur les méthodes utilisées pour le développement des médicaments c'est à dire, adapter la classification BCS aux compléments alimentaires et utiliser les mêmes techniques *in vitro* et/ou *ex vivo* pour prédire leur biodisponibilité.

II. Ingrédients autorisés en compléments alimentaires et contexte réglementaire

Pour créer un complément alimentaire, les industriels partent d'une liste d'ingrédients spécifiques qui leur permet d'aboutir à une forme de présentation pharmaceutique présentée dans un packaging et qualifiée par une allégation et qui doivent conduire à la préparation d'un produit sûr et non néfaste à la santé des consommateurs.

La commercialisation des compléments alimentaires est gouvernée par la DGCCRF (Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes). Sur le site internet de la direction, figurent des informations relatives aux compléments alimentaires à savoir i) la définition d'un complément alimentaire, ii) le ingrédients autorisés, iii) la réglementation de l'étiquetage, iv) la sécurité et la qualité des compléments alimentaires, v) La déclaration de mise sur le marché, et vi) La nutrivigilance.

L'article 4 du décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires (1) stipule les ingrédients qui peuvent être autorisés dans la fabrication des compléments alimentaires. Ils sont regroupés en 4 grandes familles (figure 1) qui sont les i) nutriments (vitamines, les minéraux, définis au 2° de l'article 2), ii) les plantes et préparations de plantes (définis au 4° de l'article 2), iii) les substances à but nutritionnel ou physiologique (définies au 3° de l'article 2), iv) les autres ingrédients (les additifs, les arômes et les auxiliaires technologiques dont l'emploi est autorisé en alimentation humaine) (2)

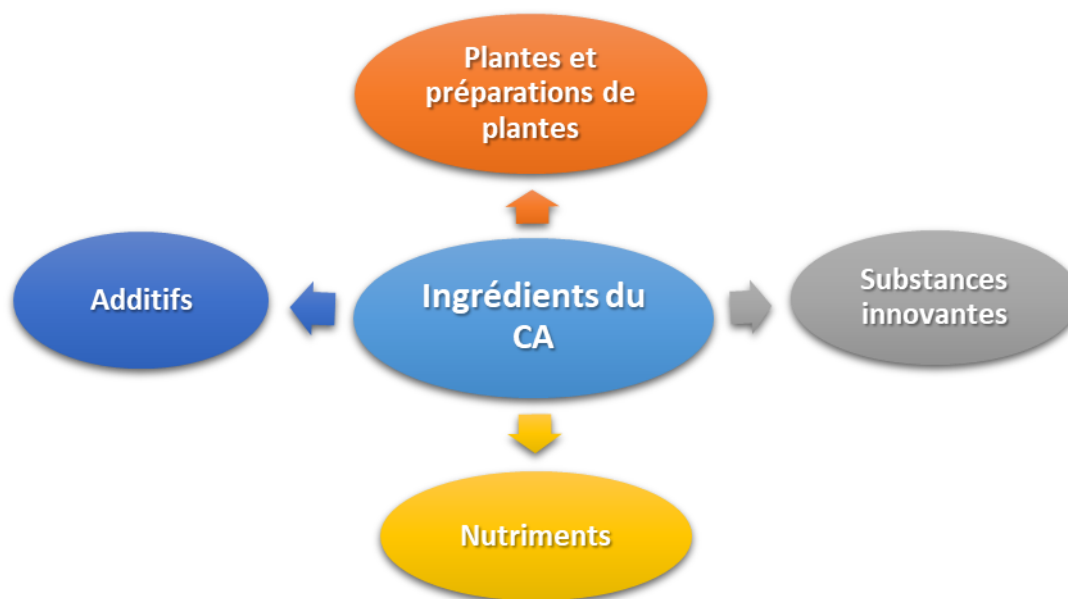


Figure 1 Les grandes familles d'ingrédients utilisés dans les compléments alimentaires

II.1 Les nutriments

Les nutriments sont les substances minérales ou organiques, assimilables directement sans avoir à subir les processus de dégradation de la digestion qui sont les minéraux et les vitamines.

L'utilisation des nutriments est harmonisée au niveau européen par la commission, elle se charge de fixer les critères de pureté, les teneurs maximales et minimales autorisées pour ces substances.

La directive 2002/46/CE (3) limite la notion des nutriments aux vitamines et minéraux seulement. Elle établit dans l'annexe I la liste exhaustive de 13 vitamines et de 17 minéraux qui peuvent être utilisés dans la fabrication des compléments alimentaires. L'annexe II de cette directive précise les formes d'apport qui peuvent être employées.

Au niveau national, les doses journalières maximales ont été fixées par l'arrêté du 9 mai 2006.(4), par exemple : les vitamines (la vitamine A: 800 µg, la vitamine C: 180 mg et la vitamine B12: 3 µg) ; les minéraux (Calcium: 800 mg. Potassium: 80 mg. Iode: 150 µg. Manganèse: 3,5 mg).

II.2 Les substances à but nutritionnel ou physiologique

Les substances à but nutritionnel ou physiologique sont définies dans le décret n° 2006-352 du 20 mars 2006 (1) relatif aux compléments alimentaires : « Substances chimiquement définies possédant des propriétés nutritionnelles ou physiologiques, à l'exception des nutriments (vitamines et minéraux) et des substances possédant des propriétés exclusivement pharmacologiques (médicaments). » Par exemple les substances purifiées de plusieurs origines comme la caféine, la glucosamine ou encore la mélatonine.

II.3 Les plantes et préparation de plantes

L'article 2 du même décret de 2006 (1) définit les plantes et préparations de plantes comme : « Ingrédients composés de végétaux ou isolés à partir de ceux-ci, à l'exception des nutriments (vitamines et minéraux) et des substances à but nutritionnel ou physiologique, possédant des propriétés nutritionnelles ou physiologiques, à l'exclusion des plantes ou des préparations de plantes possédant des propriétés pharmacologiques et destinés à un usage exclusivement thérapeutique (médicament) ».

Les plantes peuvent être utilisées i) de façon traditionnelle, généralement sous forme de poudre, d'extraits secs ou d'extraits aqueux ; ii) sous forme de substances isolées des plantes après

validation scientifique. Exemple : La lutéine ou le lycopène, extraits du tagète et de la tomate, sont ainsi utilisées pour leurs propriétés physiologiques antioxydantes...).

II.4 Autres ingrédients ou Novel Food

Connus sous le nom de « Novel Food » ou « nouvel aliment », les autres ingrédients regroupent tous les ingrédients dont l'utilisation en alimentation humaine est traditionnelle ou reconnue comme telle au sens du règlement (CE) n° 258/97 du Parlement Européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires (5). Par exemple : i) les ingrédients d'origine animale non purifiés comme les produits de la ruche comme la gelée royale et la propolis ou bien les huiles de poissons riches en oméga 3 ; ii) les ingrédients d'origine végétale comme l'extrait d'écorce de magnolia, la gomme de guar, la pulpe déshydratée du fruit de baobab.

Le système d'autorisation Novel food est centralisé et pris en charge par la Commission européenne qui demande une évaluation scientifique à l'EFSA. Sur la base de l'avis de l'EFSA, la Commission décidera de l'autorisation ou non du Novel Food.

II.5 Additifs, arômes et auxiliaires technologiques

Selon l'ANSES, les additifs, arômes et auxiliaires technologiques dont l'emploi est autorisé en alimentation humaine, sont ajoutés en petites quantités aux aliments lors de leur fabrication ou dans le produit fini dans un but technologique : améliorer leur conservation, masquer leur goût, réduire les phénomènes d'oxydation, colorer les denrées. Ils sont définis dans l'article 4 du décret de 2006 (1).

II.6 Classification des ingrédients

Les ingrédients autorisés dans les compléments alimentaires peuvent être classés selon plusieurs critères, i) selon leurs structures chimiques comme les acides aminés, les vitamines et autres (composants bioactifs), ii) selon leurs effets nutritionnels ou physiologiques (fonction) comme les antioxydants, les réducteurs de fatigue etc. iii) selon leurs origines (source nutritionnelle). (Figure 2).

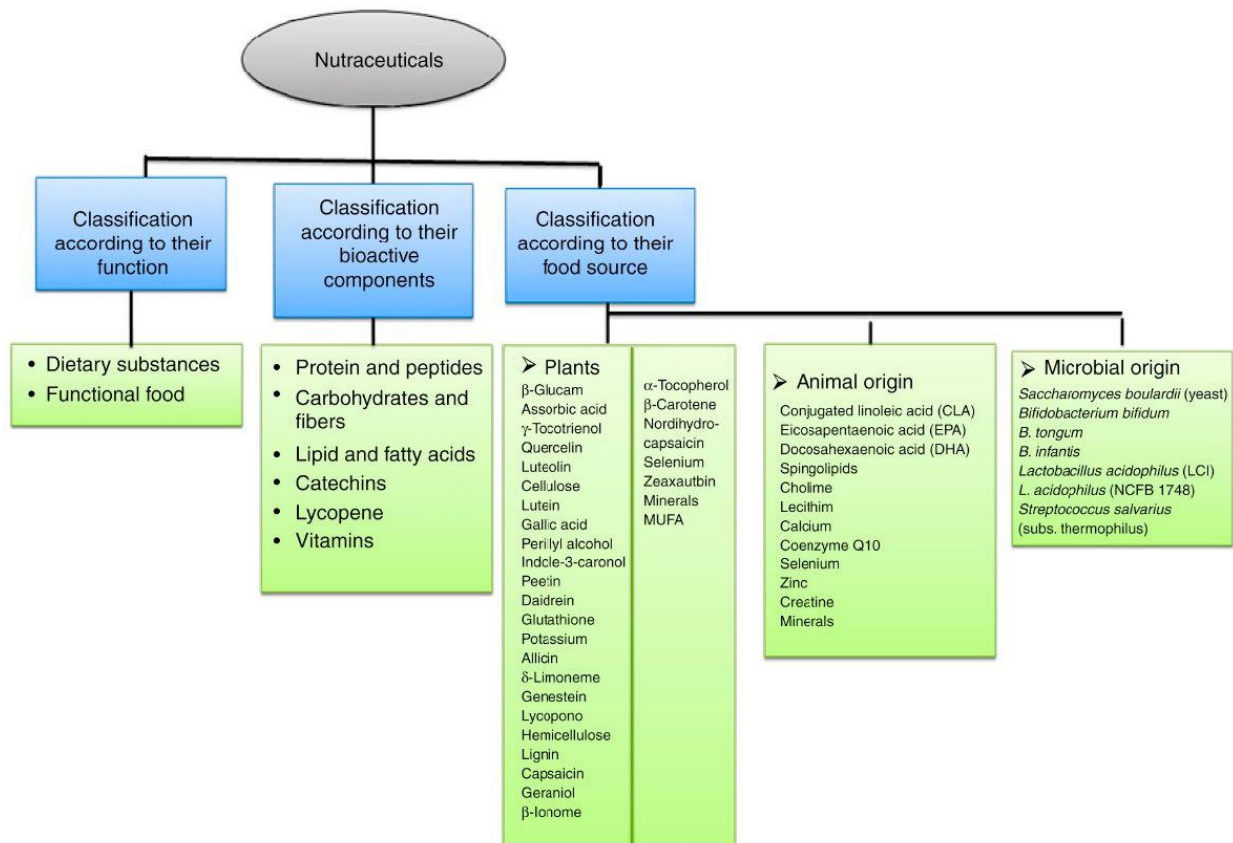


Figure 2 Classification des nutraceutiques sur la base de trois grands aspects: fonction, composant bioactif et source nutritionnelle. (6)

Toutefois, dans le but du développement et de formulation de compléments alimentaires, l'intérêt est de pouvoir classer les ingrédients nutritionnels selon leurs propriétés physicochimiques en tenant compte des trois facteurs majeurs influençant leur **biodisponibilité** à savoir la solubilité, la vitesse de dissolution et la perméabilité.

III. Rappel des systèmes de classifications biopharmaceutiques

Il existe plusieurs systèmes de classification biopharmaceutique des substances actives, appliqués aux médicaments à usage humain ou bien vétérinaire et même un système pour les nutraceutiques, dans cette partie, les principaux systèmes existants, servant de base à notre classification, seront présentés.

III.1 BCS

Pour les médicaments, de nombreux systèmes de classification existent, le plus couramment utilisé est la BCS (figure 3), c'est un modèle expérimental créé par la FDA en 1995 (7), il divise les substances actives en quatre grandes classes, en fonction de leur solubilité et de leur perméabilité dans les conditions prescrites.

Classe I - haute perméabilité, haute solubilité ;

Classe II - haute perméabilité, faible solubilité ;

Classe III - faible perméabilité, haute solubilité ;

Classe IV - faible perméabilité, faible solubilité. (Fig. 3)

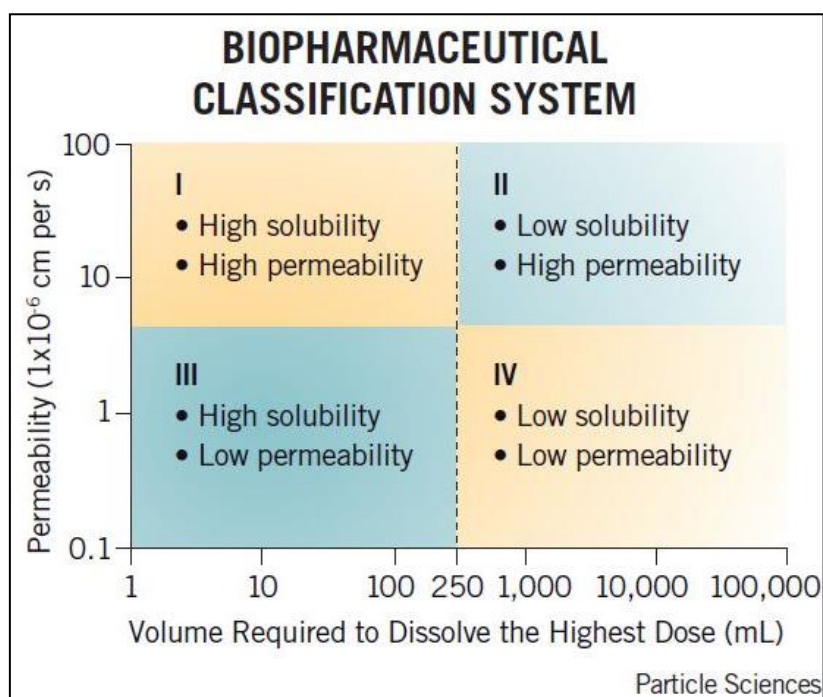


Figure 3 Biopharmaceutical Classification System (8)

Une substance médicamenteuse est considérée comme « hautement soluble » lorsque la dose thérapeutique la plus élevée est soluble dans 250 ml ou moins de milieu aqueux sur une plage de pH de 1 à 7,5 à 37 ° C.

Une substance médicamenteuse est considérée comme « hautement perméable » lorsque le taux d'absorption (médicament parent plus métabolites) chez l'homme est déterminé à $\geq 90\%$ d'une dose administrée sur la base d'une détermination du bilan massique ou par rapport à une dose de référence intraveineuse (8).

La perméabilité peut être déterminée de plusieurs façons, mais elle se fait principalement à l'aide de cellules Caco-2. Le système concerne uniquement l'administration de médicaments par voie orale, car la majorité des médicaments sont et restent administrés par cette voie. Son objectif principal est d'aider dans la réglementation des génériques et des modifications après autorisation, basés uniquement sur des données *in vitro* en utilisant des biowaivers.

Les biowaivers sont une permission de substituer des études de bioéquivalence *in vivo* sur des produits qui remplissent certaines conditions de solubilité et de perméabilité. Par la suite, les industries pharmaceutiques utilisent la BCS comme un outil pour orienter le développement de médicaments en utilisant la stratégie de formulation appropriée (9).

III.2 The Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme

Le système NuBACS est analogue à la BCS, il classe les nutraceutiques en trois grandes classes, en fonction des principaux facteurs limitant la biodisponibilité orale des nutraceutiques dans la matrice alimentaire, à savoir la bioaccessibilité (B*), l'absorption (A*) et la transformation (T*).(10) (figure 4).

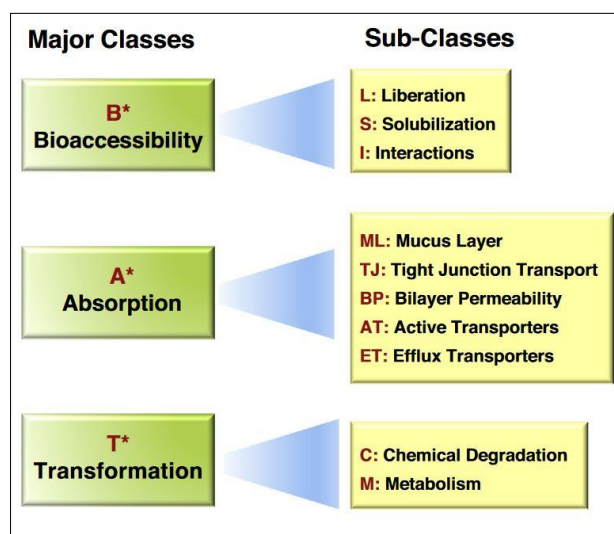


Figure 4 NuBACS the Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme (11)

Il a été étendu et modifié à partir de la BCS pour le rendre apte à la classification des nutraceutiques, compte tenu des facteurs limitant leur biodisponibilité. NuBACS est basé sur les trois mécanismes physicochimiques ou physiologiques spécifiques qui influencent la biodisponibilité et les nutraceutiques sont désignés en conséquence (12).

La bioaccessibilité (B *) peut être limitée par la libération, la solubilisation ou les interactions du nutraceutique dans le milieu gastrique.

L'absorption (A*) peut être limitée par un ou plusieurs facteurs, en fonction des caractéristiques moléculaires et physico-chimiques du nutraceutique ainsi, l'absorption peut être également limitée par le transport à travers la couche de mucus, la perméabilité via la bicouche épithéliale, le transport via les jonctions serrées, les transporteurs actifs ou les transporteurs d'efflux

La transformation (T *) peut limiter la biodisponibilité des nutraceutiques par la dégradation chimique dans le tractus gastro-intestinal, le métabolisme ou les deux, respectivement.

Dans le NuBACS, si plus de 75% de B * et A * les nutraceutiques sont considérés comme «élevés» (bioaccessibles et absorbables) et désignés par le signe (+), et si moins de 75% alors ils sont considérés comme «faibles» et désignés par le signe (-), et vice versa pour T *. D'autres sous-classes affectant la biodisponibilité sont ajoutées en tant que suffixe (12).

Selon McClements, la BCS ne convient pas aux compléments alimentaires car il existe divers facteurs de complication qui affectent la biodisponibilité des nutraceutiques présents dans les matrices alimentaires, ce qui limite l'utilité de la BCS pour les composants alimentaires (12).

IV. Proposition d'une classification appliquée aux nutraceutiques

IV.1 FoSStand (Food Supplement Standardized Development).

Comme son nom l'indique, il s'agit d'une méthode standardisée pour développer des compléments alimentaires, conçue pour garantir une biodisponibilité optimale des nutraceutiques. Basée sur la classification BCS, elle permet de créer une classification adaptée aux ingrédients nutritionnels selon leur solubilité dans l'eau et leur perméabilité intestinale afin de pouvoir faciliter et orienter la formulation et le développement de nouveaux compléments alimentaires

IV 1.1 Adaptation de la classification BCS aux compléments alimentaires

Dans les réglementations harmonisées au niveau européen gérées par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), les ingrédients autorisés dans les compléments alimentaires sont répertoriés tels que : vitamines, minéraux ou plantes (plus de 200 composés bioactifs),

Cette méthode de développement standardisée sera applicable à ces composés bioactifs spécifiques. Pour cela, nous avons d'abord répertorié les ingrédients potentiels les plus utilisés sur le marché des compléments alimentaires et créé leur base de données de propriétés physicochimiques pour procéder à la création d'une nouvelle classification appelée **FoSStand** (**F**ood **S**upplement **S**tandardized **D**evelopment).

Dans FoSStand, nous utiliserons les facteurs les plus importants et communs à tous les systèmes de développement vus auparavant, à savoir la solubilité et la perméabilité d'un ingrédient nutritionnel. Par conséquent, FoSStand sera principalement basée sur la BCS avec quatre classes différentes mais adaptée aux ingrédients nutraceutiques, c'est-à-dire, les limites de solubilité et de perméabilité seront différentes de celle utilisées pour les médicaments.

IV 1 1 a) Adaptation des paramètres de la dose et de la solubilité

Contrairement aux médicaments où l'on parle de dose thérapeutique, dans les compléments alimentaires la dose est dite physiologique, à part les nutriments (vitamines et minéraux) qui ont un Apport Diététique Recommandé (RDA), les autres composés bioactifs ont des doses différentes en fonction de l'effet recherché, nous avons donc décidé de prendre la dose maximale autorisée selon l'EFSA.

Nous définissons donc un ingrédient nutritionnel « hautement soluble » si 75% de sa dose maximale est soluble dans 250 ml d'eau ou moins.

IV 1 1 b) Adaptation du paramètre de l'absorption (perméabilité)

Dans la BCS, un médicament est considéré comme hautement perméable si plus de 90% de sa dose administrée est absorbée. Cependant, en raison du manque d'information sur la perméabilité intestinale des nutraceutiques dans la littérature, nous avons choisi de remplacer la perméabilité apparente (P_{app}) par le coefficient de partage (LogP) afin de l'utiliser comme un outil pour prédire les classes, en considérant, dans un premier temps, que les ingrédients nutritionnels qui possèdent une valeur de LogP supérieure à 1 auront une perméabilité élevée à travers les membranes des cellules de l'épithélium (30). Par la suite, au fur et à mesure des expérimentations, il sera possible de remplacer ce paramètre par la perméabilité apparente et de constituer une base de données des valeurs de P_{app} calculées à l'aide du teste de perméabilité *in vitro* sur des lignes de cellules Caco2.

Pour la classification, les limites prises pour classer un composé « très perméable » sont une valeur de P_{app} supérieure à 5×10^{-5} cm.sec⁻¹ et si 75% de la dose maximale est absorbée.

IV 1.2 Construction de la base de données

La base de données a été construite sous forme de tableau en listant les principaux ingrédients nutritionnels, leurs caractéristiques physico-chimiques et les paramètres relatifs à la classification. Elle a été créée dans le but d'avoir une vue panoramique sur la répartition des ingrédients nutritionnels dans la classification BCS, aider à la sélection des ingrédients et faciliter l'orientation du développement du complément alimentaire.

Elle comprend 52 ingrédients nutritionnels, avec plusieurs types de sels pour ceux disponibles en plusieurs formes sur le marché, par exemple pour la vitamine A, il existe trois types de sels différents (rétinol acétate, rétinol palmitate et trans-rétinol) et cinq types dans le cas du calcium (citrate, carbonate, glutionate, gluceptate et acétate). La base de données compte une totalité de 82 éléments (Annexe I).

Les informations comme : la solubilité dans l'eau à 25 C°, dans d'autres solvants, la stabilité, la dose...etc, ont été recueillies en se basant sur les données de la littérature ou à partir d'autres base de données chimiques tels que : PubChem database, DrugBank database ou encore, à partir des monographies comme le Merck Index.

Dans FoSStand, la détermination de la classe se base sur les deux paramètres suivants :

La solubilité : s'effectue en calculant le ratio dose/solubilité « R » qui représente le volume (mL) nécessaire pour dissoudre la dose. Si $R < 250$ mL le nutraceutique est considéré « très soluble », sinon, « peu soluble »

La perméabilité : se base sur la valeur du LogP, si $\text{LogP} < 1$, le nutraceutique est « peu perméable », sinon, « très perméable ».

Sur les 82 ingrédients nutritionnels inscrits, environ la moitié font partie de la classe III (haute solubilité ; faible perméabilité), suivie de Classe I et II (22%) et seulement 2% de Classe IV. (Tableau 1 ; figure 5).

La répartition des ingrédients nutritionnels en fonction de leur solubilité et perméabilité est représentée dans la figure 6 pour l'ensemble des ingrédients nutritionnels étudiés. La figure 7 donne la classification biopharmaceutique des ingrédients possédant au moins une allégation santé, la figure 8 la classification biopharmaceutique des vitamines et la figure 9 la classification biopharmaceutique des minéraux.

Classes	Nombre d'éléments	Pourcentage
Classe I	18	22%
Classe II	18	22%
Classe III	42	51,2%
Classe IV	2	2,4%
Not available	2	2,4%
Total	82	100%

Tableau 1 Proportions des classes des ingrédients nutritionnels dans la base de données

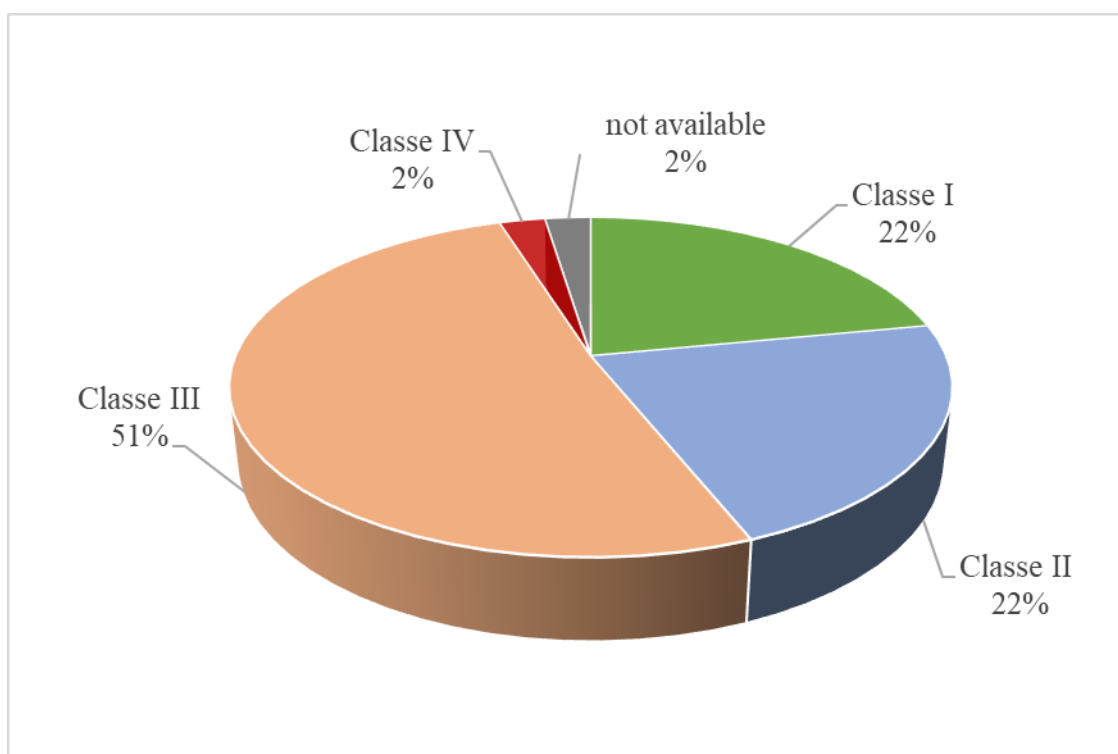


Figure 5 Représentation graphique des proportions des différentes classes dans la base de données

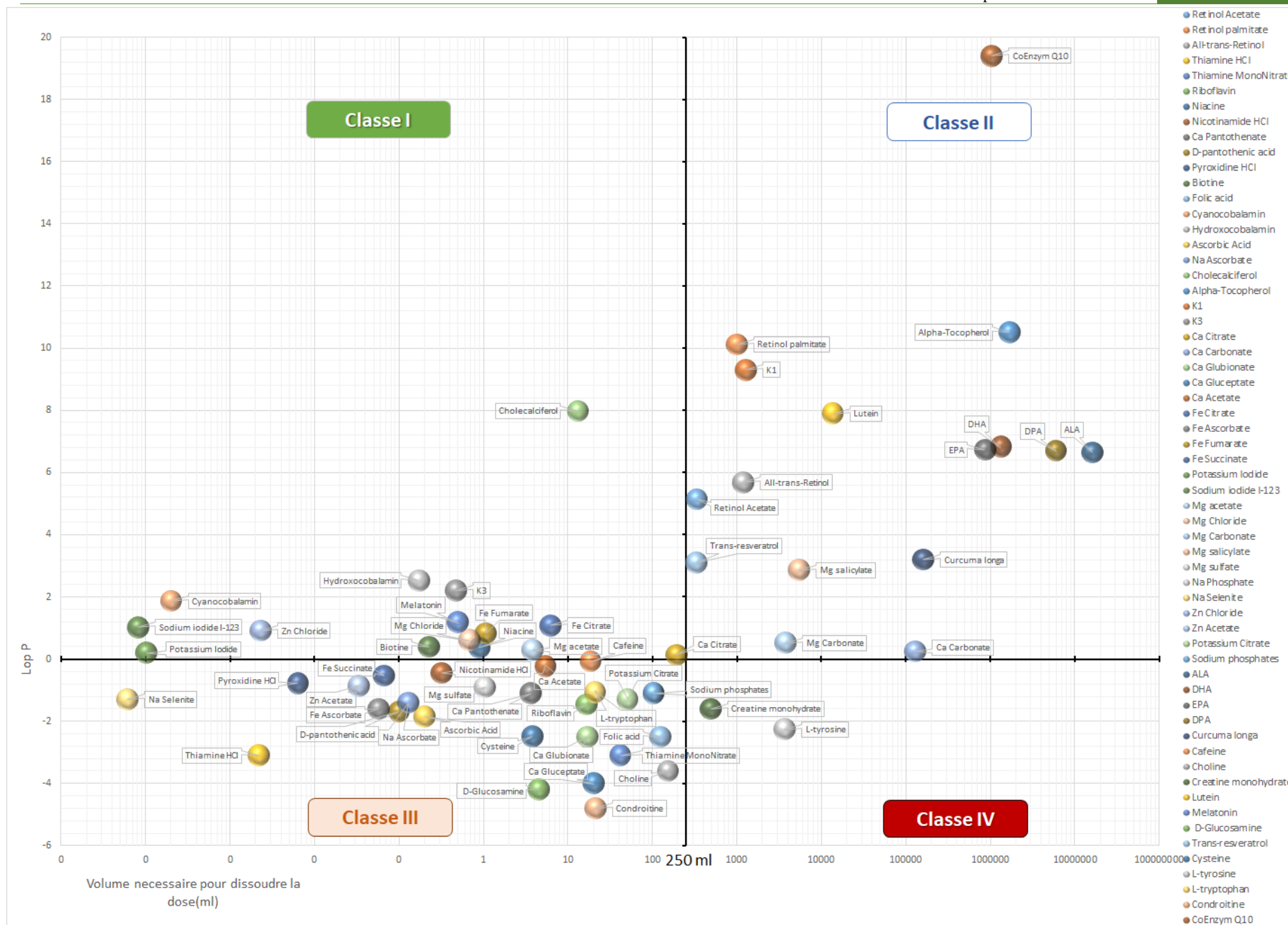


Figure 6 Représentation graphique de tous les éléments

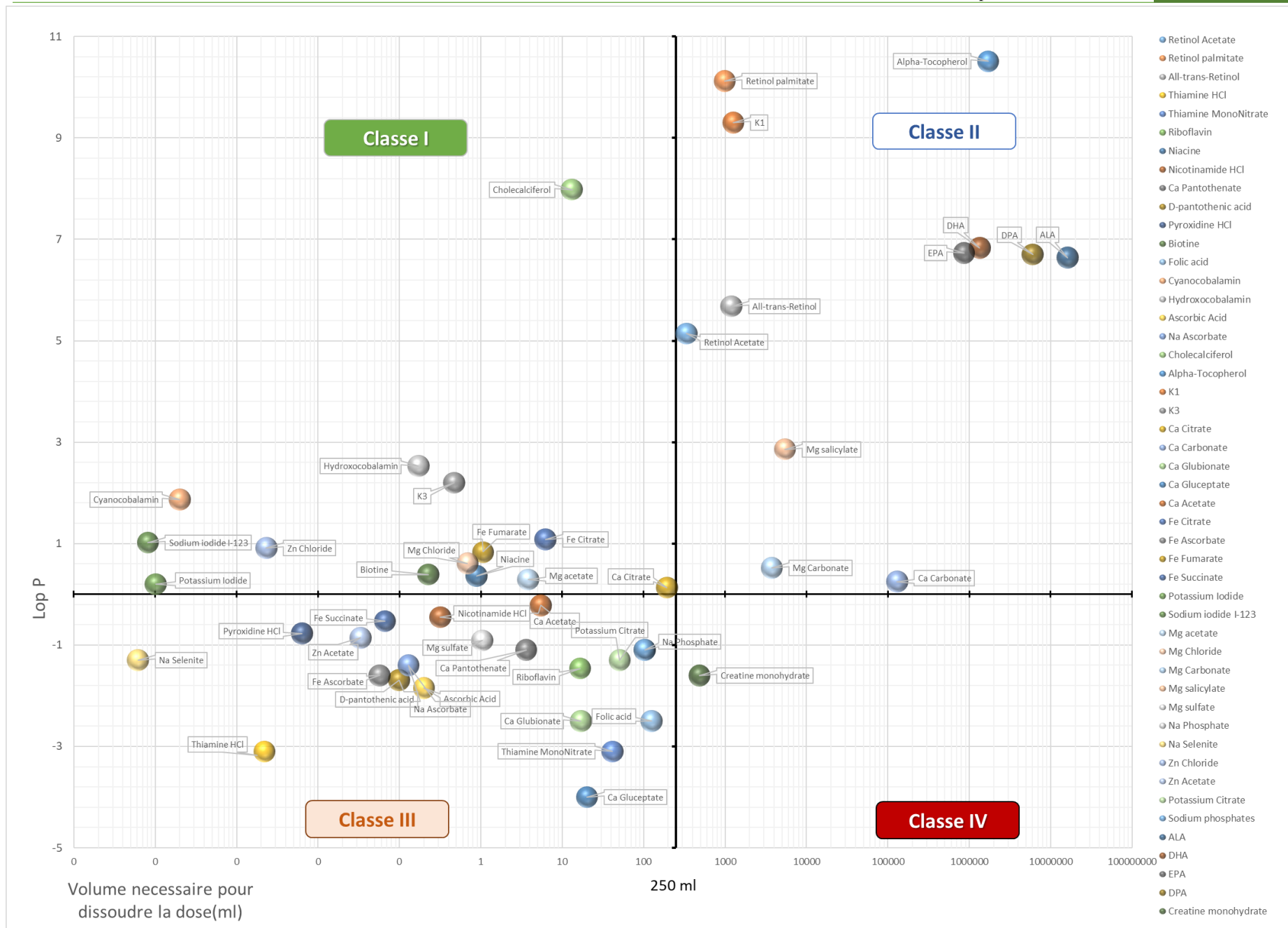


Figure 7 Représentation graphique des éléments possédant au moins une allégation santé

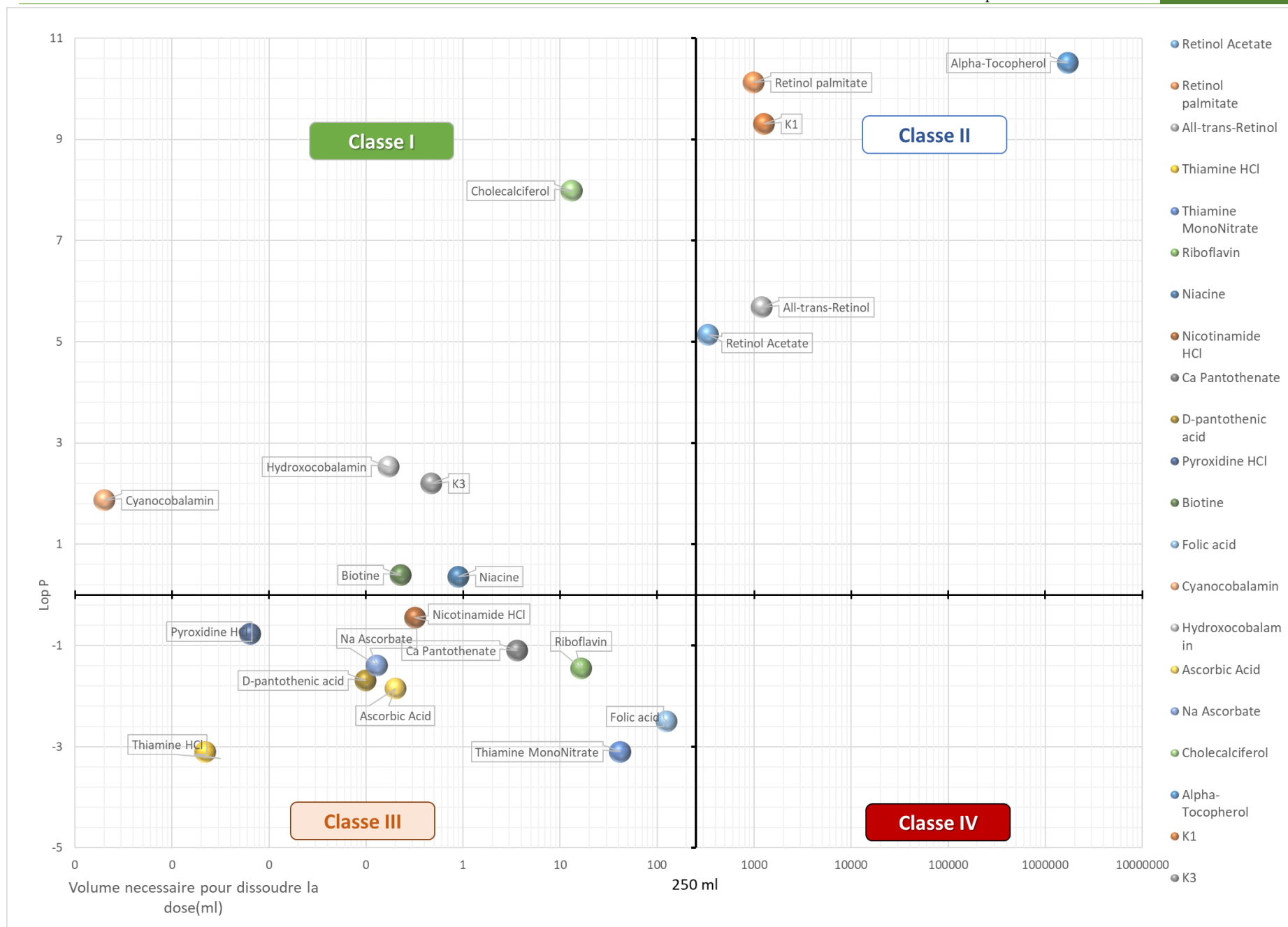


Figure 8 Représentation graphique des vitamines



Figure 9 Représentation graphique des minéraux

V. Conclusion

Cette première classification permet de séparer clairement les ingrédients nutritionnels en 4 classes différentes en fonction des critères primaires qui influencent la biodisponibilité. Comme dans le cas des substances actives, cette classification peut permettre d'identifier et de déterminer, par des méthodes standardisées, pour chaque ingrédient nutritionnel, la classe qui lui correspond et orienter ainsi le développement.

Cette classification peut ainsi permettre de définir, en fonction de la classe des produits qui composent la formulation, le niveau de risque lié à une différence de biodisponibilité entre différents produits. Par exemple pour une formulation à libération immédiate, contenant exclusivement des produits de classe 1 et de classe 3, le risque de « non biodisponibilité » est limité, si les critères qualité des ingrédients nutritionnels sont contrôlés et si la vitesse de dissolution de la substance active à partir de la formulation est très rapide (par exemple $\geq 85\%$ en 15 minutes). Cette classification pourrait ouvrir la voie à la notion d'exemption de biodisponibilité (biowaiver) pour certains produits ou la garantie de « biodisponibilité maximale ».

Cette classification peut aussi permettre d'identifier les produits de classe 2 et de classe 4, et de définir la stratégie galénique la plus appropriée pour améliorer la biodisponibilité et justifier le choix de la technologie retenue. L'utilisation de la notion de classe de produit pourrait permettre d'argumenter le rationnel/décisionnel d'une formulation permettant de garantir une « meilleure biodisponibilité » ou à une libération ciblée.

VI. Références

1. Décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires. 2006-352 mars 20, 2006.
2. Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires
3. Directive 2002/46/CE du Parlement européen et du Conseil du 10 juin 2002 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les compléments alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)
4. Arrêté du 9 mai 2006 relatif aux nutriments pouvant être employés dans la fabrication des compléments alimentaires | Legifrance [
5. Règlement (UE) 2015/2283 du Parlement européen et du Conseil du 25 novembre 2015 relatif aux nouveaux aliments, modifiant le règlement (UE) n° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant le règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n° 1852/2001 de la Commission (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)
6. Mihai Grumezescu A. Nutraceuticals [Internet]. 1st éd. Vol. 1. Elsevier; 2016 [cité 10 févr 2020]. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20150010462>
7. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research*. 1995;12(3):413-20.
8. Particle Sciences - Technical Brief: 2011: Volume 9. Biopharmaceutical Classification System and Formulation Development [Internet]. 2011. Disponible sur: <https://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2011/biopharmaceutical-classification-system.html>
9. Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 25 nov 2011;420(1):1-10.
10. McClements DJ. Enhancing nutraceutical bioavailability through food matrix design. *Current Opinion in Food Science*. août 2015;4:1-6.
11. McClements DJ, Li F, Xiao H. The Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme: Classifying Nutraceuticals According to Factors Limiting their Oral Bioavailability. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2015;6:299-327.
12. McClements DJ, Li F, Xiao H. The Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme: Classifying Nutraceuticals According to Factors Limiting their Oral Bioavailability. *Annual Review of Food Science and Technology*. 10 avr 2015;6(1):299-327.

CAPITRE VII

Conclusion générale et perspectives

I. Conclusion générale

Actuellement, les laboratoires de recherche s'intéressent de plus en plus aux ingrédients nutritionnels qui ne cessent de montrer un réel potentiel dans diverses applications pharmacologiques. Depuis quelques années, notre unité de recherche travaille sur i) la libération des substances actives à partir de différentes formulations, ii) l'utilisation des excipients d'origine naturelle comme les polymères naturels (alginates, protéines de lactosérum.) dans le cadre d'une administration orale, iii) l'impact de la formulation sur la biodisponibilité et iv) les méthodes d'étude *in vitro* de dissolution et *ex vivo* et *in vivo* de perméabilité.

En association avec la société clermontoise RecoverLab, spécialisée dans le conseil, le développement et la fabrication de compléments alimentaires, une collaboration a été mise en place pour tenter de proposer une démarche rationnelle pour le développement des compléments alimentaires et des méthodes standardisées et reconnues au niveau réglementaire pharmaceutique pour caractériser les composés actifs et les formulations. Cette collaboration « Projet CALC » pour Complément Alimentaire à Libération Ciblée a obtenu le soutien de la région dans le cadre d'une bourse innovation transfert de technologie. Cette collaboration permet d'étendre les connaissances et le savoir-faire dans le développement des médicaments au secteur des compléments alimentaires et également d'appliquer les principes de la classification biopharmaceutique des médicaments aux compléments alimentaires en proposant une classification originale permettant d'identifier les variables critiques dans le développement et la fabrication d'un complément alimentaire et de sélectionner la formulation idéale permettant d'optimiser la biodisponibilité.

Dans un premier temps, le travail a été initié par une recherche bibliographique afin faire le tour sur les différents enjeux liés au sujet. La recherche était centrée sur la voie orale et ses contraintes, voie d'administration unique des compléments alimentaires, ainsi que sur le devenir des médicaments dans l'organisme après administration orale, afin de définir les facteurs influençant la biodisponibilité (liés aux caractéristiques de la substance active, à la matrice d'administration ou à la physiologie du tube digestif). Cette étude bibliographique a été complétée par la compilation des méthodes reconnues et officielles permettant d'évaluer les facteurs primaires qui influencent la biodisponibilité.

Dans un second temps, cette recherche bibliographique a été complétée par l'étude des différents ingrédients nutritionnels disponibles afin de réaliser la base de données qui comporte toutes les informations essentielles pour établir la classification des ingrédients actifs.

Cette compilation a permis de choisir parmi les différents composés ceux qui sont le plus pertinent d'un point de vue industriel et qui permettent de valider les choix méthodologiques.

Ainsi des composés nutritionnels de différentes classes ont été choisis dont la caféine, la glucosamine, le resveratrol et la curcumine afin d'effectuer des études de cas avec une caractérisation physicochimique et biopharmaceutique et d'évaluer la variabilité et l'interchangeabilité liée à la source de matière première.

Les tests ont été réalisés sur les composés sélectionnés, basés sur des méthodes appliquées aux médicaments et décrites dans les différentes pharmacopées ou textes réglementaires dont la dissolution *in vitro* et la perméabilité afin de déterminer la classe des ingrédients sélectionnés et mettre en évidence les facteurs clés qui conditionnent et influencent la formulation et la biodisponibilité.

Dans le cas de la caféine et la glucosamine, la variabilité entre les différents lots de produit obtenue n'était pas significative, puisque les composés sont hydrosolubles (classe 1 et 3). Pour la caféine qui possède une bonne perméabilité intestinale ceci se traduit par l'absence de différence démontrée entre une origine naturelle ou synthétique. Pour la glucosamine dont la perméabilité est faible, la mise en place d'un essai de dissolution sur les formulations permet, pour des formes à libération immédiate, de limiter le risque d'avoir des produits de biodisponibilité différents.

Dans le cas du resveratrol composés de classe 2 la caractérisation chimique n'a pas démontré de différence significative entre les lots par rapport à la forme ou à l'origine de la poudre. Dans le cas de la curcumine, la caractérisation chimique permet de mettre en évidence les modifications apportées à l'ingrédient actif et l'impact potentiel sur la biodisponibilité. De plus, l'évaluation biopharmaceutique a démontré une réelle liaison entre la solubilité et la quantité absorbée.

Compte tenu de ces résultats, une classification a été proposée en adaptant les paramètres appliqués pour les médicaments aux ingrédients nutritionnels, FoSStand a ainsi été proposée et optimisée pour décrire une méthodologie standard qui sera applicable à l'ensemble des ingrédients autorisés dans les compléments alimentaires et être un support au développement de nouvelles formes. Elle permettra de proposer, en fonction des produits, des associations de nutriments et des allégations, des formes à libération immédiate et ou modifiée dont le devenir *in vivo* après administration orale sera défini.

II. Perspectives

FoSStanD constitue un excellent outil de développement pour les compléments alimentaires, elle rassemble des données bibliographiques sur les ingrédients nutritionnels, comprenant les informations préliminaires liées à la molécule (tolérance, toxicité, activité biologique...), les paramètres essentiels à la classification comme la dose maximale et toutes informations relatives au développement du complément alimentaire tels que la solubilité, la stabilité, les mécanismes d'absorption...etc. Toutefois, il faudrait l'enrichir avec des données expérimentales de perméabilité apparente afin de prendre cette dernière comme le paramètre déterminant la classe à la place du LogP utilisé actuellement. La démarche FoSStanD est illustrée dans le logigramme présenté dans la figure 1, elle suit un chemin composé de :

II.1 Etudes de pré-formulation

II 1.1 Caractérisations physico chimiques

- Permet de vérifier et de valider les spécifications délivrées par le fournisseur (Structure, pureté...), en utilisant des méthodes d'identification (FTIR, RMN, HPLC...)
- Caractérisation physique de la poudre : mesure de la taille des particules, polymorphisme (DRX)

II 1.2 Etudes biopharmaceutiques :

- Étude de solubilité à saturation permet de déterminer l'échantillon le plus soluble et éventuellement une influence du pH sur la stabilité
- Etude de dissolution *in vitro* : permet d'obtenir les mécanismes de libération du nutraceutique à partir de la poudre ou de la matrice, les quantités dissoutes et les vitesses de dissolution.
- Etude de perméabilité sur des cellules Caco-2 permet de calculer la Papp.

II 1.3 Classification et sélection du meilleur ingrédient nutritionnel pour les études de développement

Après le sourcing des ingrédients nutritionnels avec différentes spécifications (origine, forme, pureté...) chez plusieurs fournisseurs, l'étude de pré-formulation permet le screening de ces matières premières et le choix de la meilleure qualité pour le développement à savoir, la

solubilité la plus élevée, la dissolution la plus rapide avec un taux de dissolution élevé, la meilleure perméabilité...etc.

II.2 Formulation et développement de compléments alimentaires

Après la classification et le choix des meilleures qualités de matières premières, de nombreuses techniques peuvent être effectuées dans le but de développer un complément alimentaire, allant du développement de formes à libération immédiate en compression directe pour les nutraceutiques de classe 1, jusqu'à des formulations assez complexes favorisant l'amélioration de la solubilité (classe 2), la perméabilité (classe 3) ou les deux à la fois (classe 4).

Exemples de techniques visant l'amélioration de la solubilité (notamment dans le cas de BCS classe 2) :

- Formation de sel : cette approche est couramment utilisée dans les industries pharmaceutiques pour les molécules ionisables telles que les acides carboxyliques en changeant le proton perdu par un ion positif comme le sodium ou le potassium.

- Forme posologique avec tensioactif : l'utilisation de tensioactif dans les formulations peut améliorer la biodisponibilité orale des composés peu solubles dans l'eau en formant différents types d'émulsions lorsqu'ils sont dispersés en phase aqueuse

- Réduction de la taille des particules : cette technique est largement utilisée pour augmenter la vitesse de dissolution, il est connu que la vitesse de dissolution est proportionnellement augmentée par l'augmentation de la surface des particules composées.

- Amorphisation : les formulations amorphes peuvent être obtenues par de nombreuses techniques telles que la dispersion solide amorphe, le séchage par atomisation, la lyophilisation et autres. Il est connu que la solubilité d'un composé amorphe est supérieure à celle des composés cristallins ; cette solubilité plus élevée peut améliorer la biodisponibilité.

- Cristallisation : de nombreuses techniques de cristallisation ont retenu l'attention ces dernières années comme la formulation de cocristaux (mettre un matériau cristallin entre deux composants différents) ou les nanocristaux (réduction de la taille des particules) peuvent améliorer la vitesse de dissolution des composés peu solubles dans l'eau et ainsi améliorer la biodisponibilité.

- Complexation : la formation d'un complexe d'inclusion entre un composé peu soluble dans l'eau et la cyclodextrine ou ses dérivés, peut augmenter la solubilité apparente et ainsi améliorer la biodisponibilité orale.

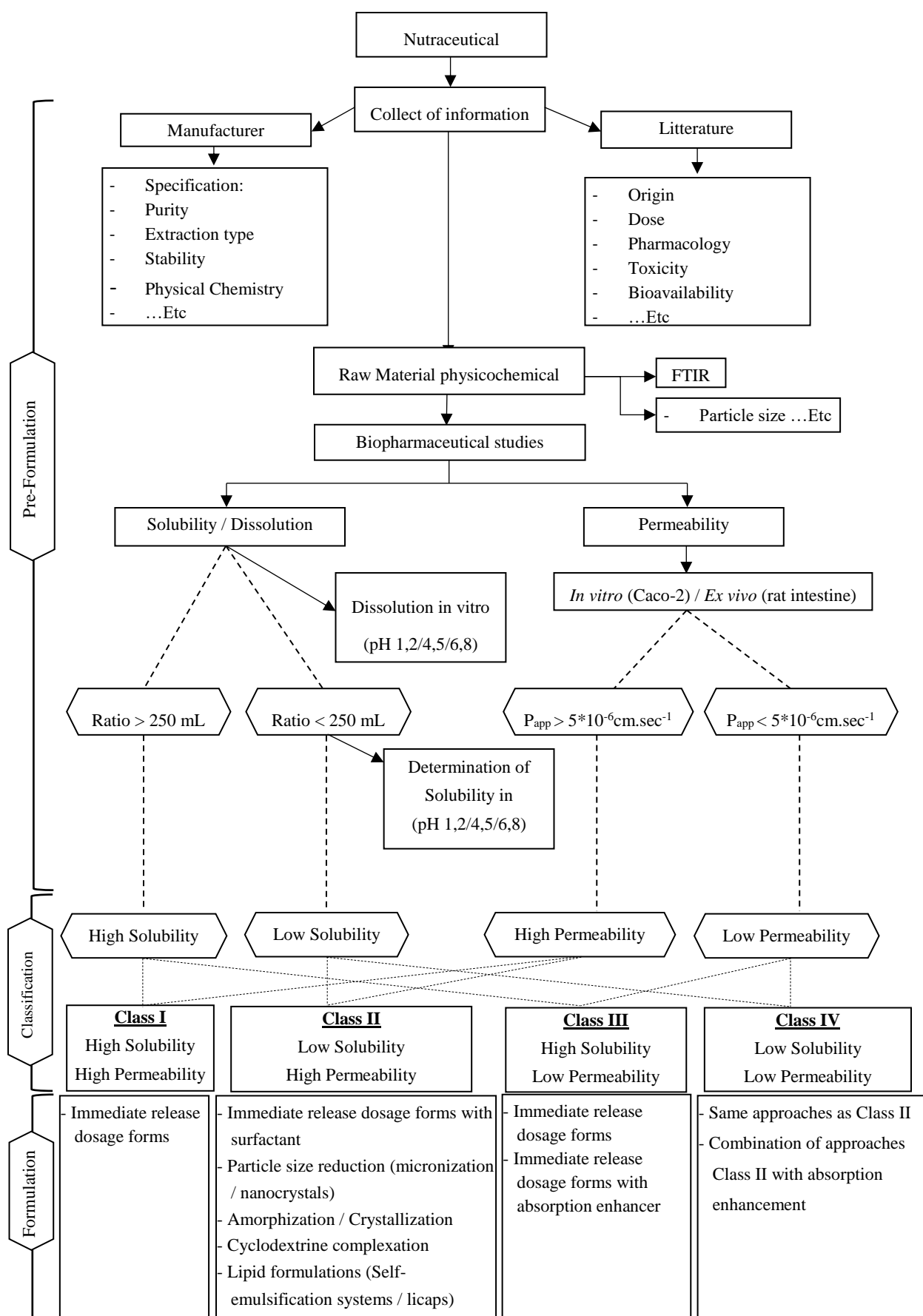


Figure 1 Logigramme de la méthode FoSStand

ANNEXE I

Base de données des paramètres BCS de 82 nutraceutiques.

	Chemical and Physical Properties										BCS Classe			References
	Nutrient	Salt	Allegation	Dose or RDI (mg/day)	Solubility in water at 25 C° (mg/ml)	Solubility in other solvents	Stability	Log P	R = Dose/Solubilité (ml)	250ml/R	Solubility	Perméabilité	Classe	Citations
1	Vitamin A	retinol acetate	Yes	0,8	0,00238			5,14	336,134	0,7	Low	High	Classe II	
2	Vitamin A	retinol palmitate	Yes	0,8	0,000807			10,12	991,326	0,3	Low	High	Classe II	
3	Vitamin A	All-trans-Retinol	Yes	0,8	0,000671	Practically insoluble in water or glycerol ; Soluble in absolute alcohol, methanol, chloroform, ether, fats and oils, ethanol, acetone and benzene	Free alcohol is sensitive to air-oxidation, but oil solutions of it are quite stable; UV light inactivates Vitamin A. [2] Not readily destroyed by heat but is easily oxidized and is less stable in acid than in alkaline soln.[3]	5,68	1192,250	0,2	Low	High	Classe II	[1] O'Neil, M.J. (ed.). The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p. 1785 [2] Budavari, S. (ed.). The Merck Index - Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Rahway, NJ: Merck and Co., Inc., 1983, p. 1576 [3] Osol, A. and J.E. Hoover, et al. (eds.). Remington's Pharmaceutical Sciences. 15th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co., 1975, p. 333
4	Vitamin B1	thiamine hydrochloride	Yes	1,1	500	Soluble in glycerol (1 g/18 ml), 95% ethanol (1 g/100 ml), absolute ethanol (1 g/315 ml). It is practically insoluble in ether, benzene, hexane, and chloroform . [1]	Stable under normal storage conditions; its degradation in neutral and alkaline solutions (even at room temp) Stability in frozen drink concentrate, in low pH fruit drinks and in dry products is excellent Light has no effect on thiamine stability during bread storage Strongly acid solution which is fairly stable to oxidation and not available	-3,1	0,002	113636,4	High	Low	Classe III	[1] Sigma-Aldrich Co. LLC. Catalog Number T4625 [2] Furtis, T.E. (ed.), CRC Handbook of Food Additives, 2nd ed. Cleveland: The Chemical Rubber Co., 1972, p. 83, p.38, p. 39, p. 104, p. 105
5	Vitamin B1	thiamine mononitrate	Yes	1,1	0,0265	not available	not available	-3,1	41,509	5,0	High	Low	Classe III	
6	Vitamin B2	Riboflavin	Yes	1,4	0,0847	Insoluble in ethyl ether, acetone, chloroform, benzene ; slightly soluble in ethanol, cyclohexanol, amyl acetate and benzyl alcohol, phenol [1] Soluble in sodium chloride solutions ; 0.0045 g/100 mL of absolute ethanol at 27.5 deg C; very soluble in dilute alkalis (with decomposition) [2]	*Crystalline riboflavin shows no evidence of decomposition under ordinary conditions, but protection from light is advisable "Solutions undergo decomp under the influence of visible or ultraviolet light" "In neutral solution it is relatively heat stable if protected from light" "Stable in acid solution and in the presence of oxidizing agents, but very sensitive to alkali and light" "Stable in most food applications" "Visible or UV irradiation of alkaline solutions causes formation of lumiflavin [3]	-1,46	16,529	15,1	High	Low	Classe III	[1] Lide, D.R. CRC Handbook of Chemistry and Physics: 80TH Edition 2007-2008. CRC Press: Taylor & Francis, Boca Raton, FL 2007, p. 3-456 [2] O'Neil, M.J. (ed.). The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2006, p. 1413 [3] Source: HSDB Record Name: Riboflavin
7	Vitamin B3	niacin (nicotinic acid)	Yes	16	18	Soluble in alcohol, insoluble in most lipid solvents, Slightly soluble in ethanol and ethyl ether. [1]	STABLE IN AIR, GENERALLY STABLE IN FOODS, STABLE TO HEAT, ACIDS & ALKALI [2]	0,36	0,889	281,3	High	High	Classe I	[1] Source: HSDB Record Name: NICOTINIC ACID [2] Furtis, T.E. (ed.), CRC Handbook of Food Additives, 2nd ed. Cleveland: The Chemical Rubber Co., 1972, p. 83, p.100
8	Vitamin B3	nicotinamide hydrochloride	Yes	16	50,1	not available	not available	-0,45	0,319	782,8	High	Low	Classe III	
9	Vitamin B5	Calcium pantothenate	Yes	6	1,67	not available	not available	-1,1	3,593	69,6	High	Low	Classe III	
10	Vitamin B5	D-pantothenic acid	Yes	6	60,5	Freely soluble in water, ethyl acetate, dioxane, glacial acetic acid ; Moderately soluble in ether, amyl alcohol . Practically insoluble in benzene, chloroform .	Unstable... easily destroyed by acids, bases, heat, Pantothenic acid occurs as an unstable, hygroscopic, viscous oil which is freely soluble in water.	-1,69	0,099	2520,8	High	Low	Classe III	Source: HSDB Record Name: D-Pantothenic Acid
11	Vitamin B6	pyridoxine hydrochloride	Yes	1,4	220	1g/90ml alcohol ; sol in propylene glycol ; sparingly sol in acetone ; insol in ether, chloroform [1]	UNDER MOST CONDITIONS OF PROCESSING & STORAGE OF FOOD & PHARMACEUTICALS, VITAMIN IS WELL RETAINED [2] EASILY DESTROYED BY HEAT STERILIZATION [3] Pyridoxine hydrochloride is photosensitive and will degrade slowly when exposed to light, its preparations should be protected from light and stored in well-closed containers at a temperature less than 40 deg C, preferably between 15-30 deg C; freezing of the injection should be avoided. [4]	-0,77	0,006	39285,7	High	Low	Classe III	[1] Budavari, S. (ed.). The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 1996, p. 1972 [2] Osol, A. and J.E. Hoover, et al. (eds.). Remington's Pharmaceutical Sciences. 15th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co., 1975, p. 352 [3] Rozzoff, I.S. Handbook of Veterinary Drugs. New York: Springer Publishing Company, 1974, p. 647 [4] McEvoy, G.K. (ed.). American Hospital Formulary Service - Drug Information 2000 Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists, Inc. 2000 (Plus Supplements), p. 3318
12	Vitamin B8	biotine	Yes	0,05	0,22	Insol in naphtha [1], Slightly sol in chloroform and ether [2].	Pure compd is stable to air & temp; moderately acid to neutral soln are stable several mo; alkaline reasonably stable to ph 9 [3] Unstable in strong acids [4] Dry crystalline d-biotin is fairly stable to air, daylight, and heat, but is gradually destroyed by UV; aq soln are relatively stable if weakly acidic or alkaline, but the biological activity is destroyed by heating in strongly acidic or alkaline soln. [5] Stability in dry products is excellent; pharmaceutical liq products indicate losses of 0-8% @ ph 5-8 after 1yr @ room temp Pharmaceutical liq losses: 6-12% @ ph 4.1-4.3, 15-20% @ ph 3.3-3.6 after 1yr @ room temp [6]	0,39	0,227	1100,0	High	High	Classe I	[3] The Merck Index. 9th ed. Rahway, New Jersey: Merck & Co., Inc., 1976, p. 161 [4] Osol, A. and J.E. Hoover, et al. (eds.). Remington's Pharmaceutical Sciences. 15th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co., 1975, p. 348 [5] Fime M2, Cosmetic Ingredient Review Expert Panel; Int J Toxicol 20 (Suppl 4):11-12 (2001) [6] Furtis, T.E. (ed.), CRC Handbook of Food Additives, 2nd ed. Cleveland: The Chemical Rubber Co., 1972, p. 106, p. 108
13	Vitamin B9	Folic acid	Yes	0,2	0,0016	Slightly sol in methanol , less in ethanol and butanol ; insol in acetone, chloroform, ether, benzene ; relatively sol in acetic acid, phenol, pyridine , and soln of alkali hydroxides and carbonates . Soluble in hot dil HCl and H2SO4 . [1]	Aqueous solutions of folic acid are heat sensitive and decompose rapidly in the presence of light and for riboflavin; solutions should be protected from light. [2] Inactivated by light with formation of xanthopteraldehyde; crystalline is stable at 4 deg C. Crystalline folic acid is relatively stable in alkaline solutions; less stable in acid solutions [3]	-2,5	125,000	2,0	High	Low	Classe III	[1] The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p. 749 [2] McEvoy, G.K. (ed.). American Hospital Formulary Service - Drug Information 2000. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists, Inc. 2005 (Plus Supplements), p. 3622 [3] Bergmeyer, H.V. (ed.). Methods of Enzymatic Analysis. 2nd English ed. New York, NY: Academic Press, 1974, p. 633
14	Vitamin B12	Cyanocobalamin	Yes	0,0025	12,5	<-- [1] Soluble in alcohol ; insoluble in acetone, chloroform, ether . [2]	Hydrated crystals are stable to air, max stability in ph range 4.5-5 [3] Solutions of cyanocobalamin in water or 0.3% sodium chloride are stable and can be autoclaved for short periods of time (15-20 minutes) at 121 deg C. [4] Cyanocobalamin is light sensitive. Exposure to light results in the organometallic bond being cleaved, with the extent of degradation generally incr with incr light intensity. [5] Cyanocobalamin with ascorbic acid can be stored for 24 hours at room temperature protected from light without loss of activity. [6]	1,87	0,000	1250000,0	High	High	Classe I	[1] The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 1996, p. 1710 [2] The Merck Index. 10th ed. Rahway, New Jersey: Merck Co., Inc., 1983, p. 1435 [3] McEvoy, G.K. (ed.). American Hospital Formulary Service - Drug Information 2000 Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists, Inc. 2000 (Plus Supplements), p. 3325 [4] Triebel, L.A. Handbook on Injectable Drugs. 9th ed. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists' Product Development, 1996, p. 238 [5] Triebel, L.A. Handbook on Injectable Drugs. 9th ed. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists' Product Development, 1996, p. 238 [6] Triebel, L.A. Handbook on Injectable Drugs. 9th ed. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists' Product Development, 1996, p. 238

17	Vitamin B12	Hydroxocobalamin	Yes	0,0025	0,0146	Moderately sol lower aliphatic alcohols ; practically insoluble in acetone, ether, petroleum ether, halogenated hydrocarbons, benzene, chloroform [1]	not available	2,53	0,171	1460,0	High	High	Classe I	[1] The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2006, p. 833
18	Vitamin C	Ascorbic Acid	Yes	80	400	Insoluble in ether, chloroform, benzene, petroleum ether, oils, fats, fat solvents [1]	Stable to air when dry; impure preparation and in many natural products vitamin oxidizes on exposure to air and light. Aqueous solutions are rapidly oxidized by air, accelerated by alkalis, iron, copper [2]	-1,85	0,200	1250,0	High	Low	Classe III	[1] The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2006, p. 136 [2] The Merck Index: 9th ed. Rahway, New Jersey: Merck & Co., Inc., 1976, p. 111
19	Vitamin C	Sodium ascorbate	Yes	80	620	Very slightly soluble in alcohol ; insoluble in chloroform, ether [1]	Aqueous solutions are unstable and subject to quick oxidation by air at pH > 6.0 [2]. Solutions of ascorbic acid are rapidly oxidized in air and in alkaline media; the drug should be protected from air and light. [3]	-1,4	0,129	1937,5	High	Low	Classe III	[1] Lewis, R.J. Sr. (ed) Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. 10th Edition. Wiley-Interscience, Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, 2004, p. V2: 310 [2] The Merck Index: 9th ed. Rahway, New Jersey: Merck & Co., Inc., 1976, p. 1103 [3] American Society of Health System Pharmacists; AHFS Drug Information 2003. Bethesda, MD, (2003)
20	Vitamin D3	Cholecalciferol	Yes	0,005	0,00038	Sol in the usual org solvents ; slightly sol in vegetable oils [1]	Affected by light and air. [2] In dry propylene glycol, therapeutic concentrations are stored in amber screw cap bottles at 38 deg C no change after 36 mo [3] While vitamin D is generally regarded as stable it deteriorates rapidly in presence of minerals. [4] Vitamin-D3 is somewhat more stable than vitamin-D2, possibly because it has one less double bond [5] Oxidized and inactivated by moist air within few days. Deterioration of pure crystal vitamin D3 is negligible after storage of 1yr in amber evacuated ampuls at refrigerator temperatures. [6]	7,98	13,158	19,0	High	High	Classe I	[1] The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p. 1786 [2] Osool, A. and J.E. Hoover, et al. (eds.), Remington's Pharmaceutical Sciences. 15th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co., 1975, p. 343 In corn oil no loss in potency during 30 months at 38 deg C [3] The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. 8th ed. Rahway, New Jersey: Merck and Co., Inc., 1968, p. 114 [4] Osool, A., and R. Pratt, (eds.), The United States Dispensatory. 27th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1973, p. 478 [5] Furia, T.E. (ed.) CRC Handbook of Food Additives. 2nd ed. Cleveland: The Chemical Rubber Co., 1972, p. 92 [6] O'Neil, M.J. (ed.) The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p. 1786, p. 1787
21	Vitamin E	alpha-tocopherol	Yes	12	0,00000704	Insoluble in water , but water-dispersible . Soluble in alcohol, ether, acetone, chloroform [1]	Unstable to UV light, alkalis, and oxidation. Stable to heat in the absence of oxygen, to strong acids, and to visible light. [2] Stable under recommended storage conditions. [3]	10,51	1704545,455	0,0	Low	High	Classe II	[1] Handbook of Chemistry and Physics. 95th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton: FL 2014-2015, p. 3-548 [2] Lewis, R.J. Sr.; Hawley's Condensed Chemical Dictionary 15th Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY 2007, p. 1243 [3] Sigma-Aldrich; Safety Data Sheet for (+)-alpha-Tocopherol. Product Number: T1833, Version 3.4 (Revision Date: 07/01/2014)
22	Vitamin K	K 1 (phytomenadione)	Yes	0,075	0,0000592	sparingly soluble in methanol ; sol in ethanol ; sol in acetone, benzene, petroleum ether, hexane, and dioxane ; sol in chloroform , and other fat solvents ; sol in vegetable oils [1]	Stable to air & moisture, but decomp in sunlight; Unaffected by dil acids, destroyed by alkali hydroxides & reducing agents [2] Stable in quinone form [3] Phytanadione is stable to heat and moisture and may be autoclaved. [4]	9,3	1266,892	0,2	Low	High	Classe II	[1] Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p. 1322 [2] The Merck Index: 9th ed. Rahway, New Jersey: merck & co., inc., 1976, p. 1291 [3] Osool, A. and J.E. Hoover, et al. (eds.), Remington's pharmaceutical sciences. 15th ed. Easton, Pennsylvania: mack publishing co., 1975, p. 343 [4] Mccreay, g.h. (ed.), American hospital formulary service- drug information 2002. Bethesda, md: american society of health-system pharmacists, inc. 2002 (plus supplements), p. 3566
23	Vitamin K	K 2 (menaquinone)	Yes	0,075	INSOL IN WATER; SOL IN FAT SOLVENTS	Slightly less soluble than vitamin K1 in the same organic solvents [1]	not available	14,5	#VALEUR!	#VALEUR!	Low	High	Classe II	[1] The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2006, p. 1008
24	Vitamin K	K 3 (menadione)	Yes	0,075	0,16	Slightly soluble in ethanol, acetic acid , and ligroin . Moderately soluble in chloroform, carbon tetrachloride . Soluble in ethyl ether, benzene, chloroform, aromatic solvents, acetone and sulfuric acid . 1g dissolves in about 60 ml alcohol , in 10 ml benzene , in 50 ml vegetable oils [1]	Stable in air; decomp by sunlight. ... Destroyed by alkalis and reducing agents. [2] STABLE IN QUINONE FORM [3] Solns may be heated to 120 deg C without decomp. [4]	2,2	0,469	533,3	High	High	Classe I	[1] Lide, D.R., G.W.A. Milne (eds.), Handbook of Data on Organic Compounds, Volume I. 3rd ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, 1994, p. V4: 3534 [2] O'Neil, M.J. (ed.), The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p. 1042 [3] Osool, A. and J.E. Hoover, et al. (eds.), Remington's Pharmaceutical Sciences. 15th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co., 1975, p. 343 [4] O'Neil, M.J. (ed.) The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p. 1042
25	Calcium	Calcium citrate	Yes	800	4,12	Not available	Not available	0,13	194,175	1,3	High	High	Classe I	
26	Calcium	Calcium carbonate	Yes	800	0,00617	<---[1] In water, 0.0013/100 g H2O at: 18 deg C/Calcite/ [2] Alkali hydroxide reduces its solubility; Solub in H2O incr by ammonium salt & by CO2; insol in alcohol [3]	No rapid reaction with air No rapid reaction with water [4]	0,25	129659,643	0,0	Low	High	Classe II	[1] en.wikipedia.org/wiki/Solubility_table [2] Carr FP, Frederick DK: Calcium Carbonate. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. (1999-2013). New York, NY: John Wiley & Sons. Online Posting Date: 18 Jul 2003 [3] Osool, A. and J.E. Hoover, et al. (eds.), Remington's Pharmaceutical Sciences. 15th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co., 1975, p. 133 [4] Source: CAMEO Chemicals Record Name: Calcium carbonate
27	Calcium	Calcium gluconate	Yes	800	47,2	Not available	Not available	-2,5	16,949	14,8	High	Low	Classe III	
28	Calcium	Calcium Gluceptate	Yes	800	39,8	Not available	Not available	-4	20,101	12,4	High	Low	Classe III	
29	Calcium	Calcium Acetate	Yes	800	147	Practically insol in acetone and benzene [1]	VERY HYGROSCOPIC [1]	-0,22	5,442	45,9	High	Low	Classe III	[1] Budavari, S. (ed.) The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 1996, p. 270
30	Iron	Ferric Citrate	Yes	14	2,25	Not available	Not available	1,08	6,222	40,2	High	High	Classe I	
31	Iron	ferrous ascorbate	Yes	14	245	Not available	Not available	-1,6	0,057	4375,0	High	Low	Classe III	
32	Iron	ferrous fumarate	Yes	14	13,1	Not available	Not available	0,83	1,069	233,9	High	High	Classe I	
33	Iron	ferrous succinate	Yes	14	211	Not available	Not available	-0,53	0,066	3767,9	High	Low	Classe III	

34	Iodine	Potassium Iodide	Yes	0,15	1480	188 alcohol ; 1,31 acetone (g/100ml @ 25°c) Sol in ether, ammonia ; slightly soluble in ethanol	Stable in dry air; Light and moisture accelerate decompn; volatilizes at higher temp.	0,2	0,000	2466666,7	High	High	Class I	O'Neil, M.J. (ed.) The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p. 1370
35	Iodine	Sodium iodide I-123	Yes	0,15	1840	42,57 alcohol ; 33,9 acetone ; 0,01 glycerol (g/100ml @ 25°c) Not available	It is made slightly alkaline to render it more stable	1,02	0,000	3066666,7	High	High	Class I	The Merck Index. 9th ed. Rahway, New Jersey: Merck & Co., Inc., 1976, p. 1116
36	Magnesium	Mg acetate	Yes	375	98,2	Not available	Not available	0,29	3,819	65,5	High	High	Class I	
37	Magnesium	Mg Carbonate	Yes	375	0,1	Sol in acid, aq carbon dioxide ; insol in acetone, ammonia [1] Insoluble in alcohol [2]	Stable in air [3]	0,52	3750,000	0,1	Low	High	Class II	[1] Lide, DR (ed.) CRC Handbook of Chemistry and Physics. 71st ed. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1990-1991, p. 4-76 [2] Lewis, R.J., Sr (Ed.) Hawley's Condensed Chemical Dictionary. 13th ed. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc. 1997, p. 690 [3] Orzol, A. and J.E. Hoover, et al. (eds.). Remington's Pharmaceutical Sciences. 15th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co., 1975, p. 735
38	Magnesium	Mg Chloride	Yes	375	546	7,40 g/100 ml of alcohol @ 20 deg C [1] In methanol , 15,5 g/100 g @ 0 deg C, 20,4 g/100 g @ 60 deg C; in ethanol , 3,61 g/100 g @ 0 deg C, 15,89 g/100 g @ 60 deg C [2]		0,61	0,687	364,0	High	High	Class I	[1] West, R.C. (ed.) Handbook of Chemistry and Physics. 60th ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1978, p. B-33 [2] Gerhartz, V. (exec ed.) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 5th ed. Vol A1: Deerfield Beach, FL: VCH Publishers, 1985 to Present., p. VA15 (1991) 531
39	Magnesium	Mg sulfate	Yes	375	360	In ether, 1,16 g/100 ml at 18 deg C; insoluble in acetone; soluble in alcohol and glycerin [1]	On exposure to dry air at ordinary temp it loses about 1H2O; at 70-80 deg c loses about 4 H2O; at 100 deg c loses 5 H2O; at 120 deg c loses 6 H2O; rapidly reabsorbing water when exposed to moist air; loses the last mol of water at about 250 deg c (heptahydrate) [2]	-0,91	1,042	240,0	High	Low	Class III	[1] West, R.C. (ed.) Handbook of Chemistry and Physics. 60th ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1978, p. B-95 [2] O'Neil, M.J. (ed.) The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p. 1018
40	Magnesium	Mg salicylate	Yes	375	0,0686	Not available	Not available	2,86	5466,472	0,0	Low	High	Class II	
41	Phosphorus	Potassium dihydrogen phosphate	Yes	700	226	insoluble in alcohol , Slightly soluble in ethanol [1]	Not available	-1	3,097	80,7	High	Low	Class III	[1] Handbook of Chemistry and Physics 86TH Edition 2005-2006. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, FL 2005, p. 4-79
42	Phosphorus	Sodium phosphates	Yes	700	6,78		Not available	-1,1	103,245	2,4	High	Low	Class III	
43	Selenium	Sodium selenite	Yes	0,055	898	Insoluble in alcohol	Stable in air	-1,3	0,000	4081818,2	High	Low	Class III	
44	Zinc	Zinc chloride	Yes	10	4320	1 gram dissolves in 0,25 mL 2% hydrochloric acid , 1,3 mL alcohol , 2 mL glycerol ; freely soluble in acetone [1], 100g/100 cc alcohol at 12,5 deg C [2]	In weak aqueous solution has tendency to form insoluble basic salt by hydrolysis; about 1/2 its weight of ammonium chloride has been used for stabilization ... Stable in the vapor phase up to 300 deg C	0,91	0,002	108000,0	High	High	Class I	[1] O'Neil, M.J. (ed.) The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p. 1910 [2] West, R.C. (ed.) Handbook of Chemistry and Physics. 60th ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1981-1988, p. B-144
45	Zinc	Zinc acetate	Yes	10	300		Not available	-0,86	0,033	7500,0	High	Low	Class III	
46	Potassium	Potassium sulfate	Yes	2000	120,48	insol in acetate , carbon disulfide [1]	1g/75ml glycerol ; practically insol in saturated soln of ammonium sulfate ; insol in alc [2]	-0,84	16,600	15,1	High	Low	Class III	[1] West, R.C. (ed.) Handbook of Chemistry and Physics. 60th ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1978, p. B-115 [2] The Merck Index. 9th ed. Rahway, New Jersey: Merck & Co., Inc., 1976, p. 334
47	Potassium	Potassium Citrate	Yes	2000	39,4	1g dissolves very slowly in 2,5 ml glycerol almost insol in alcohol [1]	Not available	-1,3	50,761	4,9	High	Low	Class III	[1] The Merck Index. 9th ed. Rahway, New Jersey: Merck & Co., Inc., 1976, p. 330
48	Chlorure	Sodium Chloride	Yes	800	350		Not available	-0,77	2,222	112,5	High	Low	Class III	
49	Chlorure	Potassium Chloride	Yes	800	355	[1] Soluble in diethyl ether ; Sparingly soluble in ethanol , 1g/14mL glycerol , about 250mL alcohol . Insoluble in ether, acetone , addition of hydrochloric acid , or sodium chloride , or magnesium chloride , diminishes its solubility in water	Hygroscopic. Water soluble. Non-Redox-Active Inorganic Compounds	0,2	2,254	110,9	High	High	Class I	[1] O'Neil, M.J. (ed.) The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013, p. 1418 [2] Lewis, R.J. Sr. (ed) Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. 12th Edition, Wiley-Interscience, Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2012, p. 3271
50	Copper	Copper chloride	Yes	1	730	Soluble in acetone , Hot Sulfuric Acid , 53 g/100 cc alcohol @ 15° C, 68 g/100 cc methanol @ 15° C [1]	Forms dihydrate in moist air.	0,52	0,001	182500,0	High	High	Class I	[1] West, R.C. (ed.) Handbook of Chemistry and Physics. 60th ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1981-1988, p. B-88
51	Manganese	Manganese chloride	Yes	2	1470	Soluble in pyridine, ethanol ; insoluble in ether .	Not available	0,82	0,001	183750,0	High	High	Class I	
52	Manganese	Manganese sulfate	Yes	2	623	Slightly soluble in methanol . SOL IN ALCOHOL; INSOL IN ETHER	Not available	-0,84	0,003	78625,0	High	Low	Class III	
53	Chrome	Chromic chloride hexahydrate	Yes	0,04	5,83	not available	not available	-0,65	0,007	36437,5	High	Low	Class III	
54	Molybdene	Sodium molybdate dihydrate	Yes	0,05	653	not available	not available	2,22	0,000	3265000,0	High	High	Class I	
55	Molybdene	Calcium molybdate	Yes	0,05	0,05	not available	not available	1,000	0,000	2500,0	High			
56	Molybdene	Magnesium molybdate	Yes	0,05	137	not available	not available	0,000	0,000	685000,0	High			
57	ALA	Alpha-Linolenic acid	Yes	2000	0,000124		Oxidizes in air to form peroxides, which spontaneously ignite. Insoluble in water. Sensitive to heat and moisture. [1]	6,64	16129032,258	0,0	Low	High	Class II	[1] Source: CAMEO Chemicals Record Name: Linolenic acid
58	DHA	Docosahexaenoic acid	Yes	250	0,000186	<-- [1]		6,83	1344086,022	0,0	Low	High	Class II	[1] DrugBank Accession Number: DB03756
59	DPA	Docosapentaenoic acid	Yes	250	0,0000416			6,7	6009615,385	0,0	Low	High	Class II	
60	EPA	Eicosapentaenoic acid	Yes	250	0,000289			6,73	865051,903	0,0	Low	High	Class II	
61	Retaine		Yes	2000	611	(g/100 g solvent): methanol , 55; ethanol , 8,7. Sparingly soluble in ether .		-4,9	3,273	76,4	High	Low	Class III	
62	Curcumin	Curcuma longa	No	500	0,00312	Insoluble in ether ; soluble in alcohol, glacial acetic acid [1]	Stable under recommended storage conditions. [2] Orange-yellow turmeric will hold shade better than lemon-yellow when exposed directly or indirectly to sunlight [3]	3,2	160256,410	0,0	Low	High	Class II	[1] The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013, p. 474 [2] Sigma Aldrich; Material Safety Data Sheet for Curcumin (CAS RN 458-37-7); Available from, as of November 6, 2013: [3] Merory, J. Food Flavoring: Composition, Manufacture, and Use. 2nd ed. Westport, Conn.: Avi Publishing Co., 1968, p. 118
63	Cafeine		No	400	21,6	1gm dissolves in 46 mL water , 5,5 mL water at 80 deg C, 1,5 mL boiling water , 66 mL alcohol , 22 mL alcohol at 60 deg C, 50 mL acetone , 5,5 mL chloroform , 530 mL ether , 100 mL benzene , 22 mL boiling benzene . [1]		-0,07	18,519	13,5	High	Low	Class III	[1] O'Neil, M.J. (ed.) The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013, p. 283
64	Choline		Yes	550	3,61			-3,6	152,355	1,6	High	Low	Class III	
65	Creatine	Creatine monohydrate	Yes	2000	4,11	Slightly soluble in ether and ethanol , insoluble in ether		-1,6	486,618	0,5	Low	Low	Class IV	
66	Lutein		No	10	0,000732			7,9	13661,202	0,0	Low	High	Class II	
67	Melatonin		Yes	1	2			1,18	0,500	500,0	High	Low	Class III	
68	CoEnzym Q10		No	200	0,000193			19,4	1036269,430	0,0	Low	High	Class II	
69	Chondroine	Chondroitin sulphate	No	1200	57,1			-4,8	21,016	11,9	High	Low	Class III	

Author: Ali BEGAG

Title: Application of the biopharmaceutical classification of drugs to the development of food supplements, and evaluation of the quality impact of the ingredients on the bioavailability.

University thesis director: Pr. Éric BEYSSAC

Industrial thesis director: M. Frédéric BARBALAT

Place and date of the defense: Turing²² auditorium, Clermont-Ferrand, 08/09/2020

Abstract

This research work is part of CALC project (Targeted Release Food Supplement), which relates to the application of the biopharmaceutical classification of drugs to the development of food supplements. In line with the development of drugs, applied to the pharmaceutical industry, reflections are emerging in terms of food supplements, both from authorities or from players in the sector (manufacturers and researchers). These major points of reflection are related to i) the quality of the sources of raw materials, ii) their physicochemical characteristics and their functional properties, iii) the impact of the administration matrix on the “bioaccessibility” of the active ingredients and iv) the bioavailability and interchangeability of food supplements available on the market. These lines of research aim to improve the quality and safety of products, to guarantee an optimum efficiency and safety for the consumer. Recognizing that the dissolution and gastrointestinal permeability of a chemical molecule are the basic parameters that control its rate of absorption and its quantity absorbed, the biopharmaceutical classification scheme for drugs is adopted by the EMA and the FDA in similar texts. The aim of the work is to propose a classification for food supplements allowing to improve the quality and bioavailability of the ingredients they contain.

The work consisted of i) studying the physicochemical and biopharmaceutical properties of various nutritional ingredients including caffeine, glucosamine, resveratrol and curcumin ii) Evaluating the impact of physicochemical and biopharmaceutical properties on the interchangeability of products and their bioavailability iii) Propose an original classification for nutritional ingredients to develop a galenic strategy for reasoned development.

Keywords: Food supplement, Dissolution, Permeability, Bioavailability

Doctoral School: Life Sciences, Health, Agronomy and Environment (ED SVSAE)

Research unit: UMR MEDiS 454 - Laboratory of Biopharmacy and Pharmaceutical Technologies. Clermont Auvergne University (UCA), Bât CBRV
28 Place Henri Dunant, 63033 Clermont-Ferrand Cedex 01

Auteur : Ali BEGAG

Titre : Application de la classification biopharmaceutique des médicaments au développement de compléments nutritionnels et évaluation de l'impact de la qualité des ingrédients sur la biodisponibilité

Directeur de thèse universitaire : Pr. Éric BEYSSAC

Directeur de thèse industriel : M. Frédéric BARBALAT

Lieu et date de soutenance : Auditorium Turing²², Clermont-Ferrand, le 08/09/2020

Résumé

Ce travail de recherche fait partie du projet CALC (Complément Alimentaire à Libération Ciblée), qui porte sur l'application de la classification biopharmaceutique des médicaments au développement des compléments nutritionnels. Dans la lignée du développement des médicaments, appliquée à l'industrie pharmaceutique, des réflexions émergent au niveau des compléments alimentaires aussi bien de la part des autorités que des acteurs du secteur (industriels et chercheurs). Ces points de réflexion majeurs portent sur i) la qualité des sources de matières premières, ii) leurs caractéristiques physico-chimiques et leurs propriétés fonctionnelles, iii) l'impact de la matrice d'administration sur la « bioaccessibilité » des actifs et iv) la biodisponibilité et l'interchangeabilité des compléments alimentaires disponibles sur le marché. Ces pistes de recherche visent à améliorer la qualité et la sécurité des produits pour garantir une efficacité optimale et une innocuité réduite au consommateur. En reconnaissant que la dissolution et la perméabilité gastro-intestinale d'une molécule chimique sont les paramètres fondamentaux qui contrôlent sa vitesse d'absorption et sa quantité absorbée, le schéma de classification biopharmaceutique pour les médicaments est adopté par l'EMA et la FDA dans des textes similaires. Le but du travail est de proposer une classification pour les compléments nutritionnels permettant d'améliorer la qualité et la biodisponibilité des ingrédients qu'ils contiennent.

Le travail a consisté i) à étudier les propriétés physico-chimiques et biopharmaceutiques de différents ingrédients nutritionnels dont la caféine, la glucosamine, le resveratrol et la curcumine ii) Evaluer l'impact des propriétés physico-chimiques et biopharmaceutiques sur l'interchangeabilité des produits et leur biodisponibilité iii) Proposer une classification originale des ingrédients nutritionnels permettant d'élaborer une stratégie galénique de développement raisonnée.

Mots clés : Complément Alimentaire, Dissolution, Perméabilité, Biodisponibilité

École Doctorale : des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement (ED SVSAE)

Unité de recherche : UMR MEDiS 454 – Laboratoire de Biopharmacie et Technologies Pharmaceutiques. Université Clermont Auvergne (UCA), Bât CBRV
28 Place Henri Dunant, 63033 Clermont-Ferrand Cedex 01