



HAL
open science

Méthodes de dosage en milieu physiologique des nouvelles substances actives pour valider les résultats du test hERG

Laurent Lilti

► **To cite this version:**

Laurent Lilti. Méthodes de dosage en milieu physiologique des nouvelles substances actives pour valider les résultats du test hERG. Sciences pharmaceutiques. 2015. hal-01770845

HAL Id: hal-01770845

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01770845>

Submitted on 19 Nov 2020

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2015

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

le 12 juin 2015, sur un sujet dédié à :

Méthodes de dosage en milieu physiologique des nouvelles substances actives pour valider les résultats du test hERG

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Laurent LILTI

né le 2 juillet 1990 à Metz (57)

Membres du Jury

Président : Mr Igor CLAROT, Maître de Conférences

Juges :

Mr Willy BRIÔNE, Responsable scientifique dans l'Industrie pharmaceutique
Mme Isabelle LARTAUD, Professeur des Universités
Mr Thomas WENDLING, Pharmacien dans l'Industrie pharmaceutique

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2014-2015

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Responsables de la filière Industrie

Responsable de la filière Hôpital

Responsable Pharma Plus ENSIC

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Responsable de la Communication

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

Responsables des échanges internationaux

Responsable ERASMUS

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Bertrand RIHN

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Lucien LALLOZ

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Pierre LECTARD
 Vincent LOPPINET
 Marcel MIRJOLET
 Maurice PIERFITTE
 Janine SCHWARTZBROD
 Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
 Annie PAVIS

Françoise HINZELIN
 Marie-Hélène LIVERTOUX
 Bernard MIGNOT
 Jean-Louis MONAL
 Blandine MOREAU
 Dominique NOTTER
 Christine PERDICAKIS
 Marie-France POCHON
 Anne ROVEL
 Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ENSEIGNANTS

Section
 CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86	Droit en Santé
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

Ɖ' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

Ɖ'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

Ɖe ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR ».

Remerciements

A Monsieur Igor Clarot,

Pour avoir accepté de superviser cette thèse,
Et pour le temps que vous avez consacré à sa relecture,
Veuillez trouver en ce travail le témoignage de ma profonde estime.

A Monsieur Willy Briône,

Merci de t'être tant investi dans la rédaction de ma thèse,
Et de m'avoir « poussé » à aller plus loin quand cela était nécessaire.
Un grand merci également pour ta confiance lors de mon stage chez UCB.

A Madame Isabelle Lartaud,

Pour l'aide que vous m'avez apportée dans la définition du sujet de ma thèse,
Et pour l'honneur que vous me faite d'en apprécier la qualité,
Veuillez recevoir l'assurance de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Thomas Wendling,

Pour avoir spontanément accepté de faire partie de ce jury,
Et pour m'avoir permis de faire mes premières armes dans l'Industrie,
Mes plus sincères remerciements.

Merci aux auteurs d'articles et aux fournisseurs qui ont bien voulu répondre à mes sollicitations.

Je remercie particulièrement **Monsieur Frédéric Delaruelle**, expert de la société Waters, pour les informations qu'il a aimablement accepté de me fournir, ainsi que l'aide qu'il m'a apportée durant mes six mois à UCB.

A Bettina Bolliger et Frédéric Oppliger, pour m'avoir, les premiers, fait confiance. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance.

Merci à toute l'équipe du « QC » de Celgene, pour avoir accompagné mes premiers pas dans le monde de l'industrie et égayé les journées de travail.

A Monsieur Éric Schenkel, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe lors de mon stage de sixième année, sans lequel cette thèse n'aurait pu voir le jour.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de « Préfo » pour leur constante bonne humeur et leur accueil chaleureux.

A mes anciens co-stagiaires avec qui j'ai partagé de très bons moments malgré leur passion pour ce « tube ».

A toutes les personnes que j'ai eu le plaisir de côtoyer chez UCB, et notamment Gabrielle sans qui les trajets m'auraient paru bien plus longs.

A Monsieur Christian Des Cilleuls, pharmacien titulaire à Nancy, qui m'a accueilli lors de mon tout premier stage et présenté le fonctionnement d'une officine.

A mes parents,

Qui m'ont toujours soutenu. Avoir de tels parents est une chance incroyable. Veuillez trouver dans cette thèse la récompense de votre amour.

A Sophie, ma sœur « préférée »

Pour tout ce que nous avons partagé : les (rares) disputes comme les (fréquentes) joies.
Tous mes vœux de bonheur et de réussite « mon cher Maître » !

A ma famille,

Pour les bons moments passés et à venir !

A mes amis, de Metz, de Nancy, de Bruxelles ou d'ailleurs,
Merci de m'avoir supporté durant toutes ces années.

A Victor,

Je ne pouvais pas achever mes années d'étudiant sans te rendre ce dernier hommage.
Je repense à ces longues séances de TP et ces rapports interminables qu'on a écrits,
Et, plus encore, à ces fous rires qu'on a tous partagés à Nancy grâce à toi.

La maladie t'a cruellement empêché de voir le bout de tes études.

Je te dédie cette thèse.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux.....	5
Liste des abréviations.....	6
INTRODUCTION.....	8
1. CONTEXTE ET FONDEMENT DU SUJET.....	10
1.1. Le test hERG.....	10
1.1.1. Contexte réglementaire et physiologique.....	10
1.1.2. Déroulement du test.....	14
1.2. Facteurs limitants du test <i>in vitro</i>.....	18
1.2.1. Risque de sous-estimation du potentiel inhibiteur.....	18
1.2.2. Solubilité.....	19
1.2.3. Adsorption.....	22
1.3. Rôle support de la chimie analytique.....	25
2. METHODES DE DOSAGE.....	28
2.1. Détection.....	28
2.1.1. Détecteur UV.....	28
2.1.2. Détecteur de fluorescence.....	30
2.1.3. Spectrométrie de masse.....	32
2.1.3.1. Principe et appareillage.....	32
2.1.3.2. Limites de la spectrométrie de masse.....	34
2.1.4. Choix du mode de détection.....	36
2.2. Séparation.....	39
2.2.1. Efficacité et modèle des plateaux théoriques.....	39
2.2.2. Chromatographie liquide ultra-haute performance.....	41
2.2.3. Particules superficiellement poreuses.....	43
2.2.4. Couplage aux méthodes de détection.....	44
2.3. Préparation des échantillons.....	46
2.3.1. Extraction en phase solide (SPE).....	46
2.3.2. Extraction en ligne.....	49
2.4. Limites des méthodes de dosage.....	53
2.4.1. Stabilité.....	53
2.4.2. Adsorption et solubilité.....	55
2.4.3. Détection « en ligne ».....	57

3. PARTIE EXPERIMENTALE.....	59
3.1. Introduction	59
3.2. Matériels et méthodes	63
3.2.1. Solvants et excipients.....	63
3.2.2. Préparation des solutions	63
3.2.3. Equipements	64
3.2.4. Méthodes chromatographiques et spectrométriques.....	65
3.2.5. Traitement de l'échantillon.....	66
3.3. Résultats.....	68
3.3.1. CL-UV.....	68
3.3.1.1. Effet de matrice	68
3.3.1.2. Augmenter le volume d'injection	69
3.3.1.3. Particules superficiellement poreuses (SPP)	71
3.3.1.4. Chromatographie liquide ultra-haute performance (CLUHP).....	74
3.3.1.5. Sensibilité atteinte en CL-UV	75
3.3.2. CL-SM	77
3.3.2.1. Effet de matrice	77
3.3.2.2. Atteindre la sensibilité requise (CLUHP-SM)	79
3.3.2.3. Extraction en phase solide (SPE seule)	81
3.3.2.4. SPE : processus complet	84
3.4. Discussion.....	88
 CONCLUSION.....	 92
 BIBLIOGRAPHIE	 94
Ressources internet.....	99
 ANNEXES	 100
Annexe 1 : Liste non exhaustive des substances actives commercialisées allongeant l'espace QT.....	100
Annexe 2 : Poste de « patch-clamp » manuel et détail de la chambre d'enregistrement	102
Annexe 3 : Conditions analytiques utilisées en CLHP-UV	103
Annexe 4 : Conditions analytiques utilisées en CLUHP-UV	104
Annexe 5 : Conditions analytiques utilisées en CLUHP-SM	105
Annexe 6 : Conditions analytiques utilisées en CLUHP-SM/SM	106
Annexe 7 : Evaluation de l'effet de matrice en CLHP-UV	107
Annexe 8 : Etude des particules superficiellement poreuses en mode isocratique.....	108
Annexe 9 : Linéarité, sensibilité, répétabilité et exactitude en CLUHP-SM.....	109

Liste des figures

Figure 1 : Processus de Recherche et Développement d'un nouveau médicament.....	10
Figure 2 : ECG normal (a) et torsades de pointe (b)	11
Figure 3 : Potentiel d'action « à plateau calcique » observé au niveau des cellules contractiles du myocarde et principaux flux d'ions correspondants.....	12
Figure 4 : Schéma du système de perfusion utilisé dans les études hERG	14
Figure 5 : Etude <i>in vitro</i> de l'effet de concentrations croissantes de kétoconazole sur le courant potassique I_{Kr} . Détermination de la CI_{50}	15
Figure 6 : Exemple d'une surestimation de la concentration réelle entraînant une sous-estimation du potentiel inhibiteur	18
Figure 7 : Effet inhibiteur de différents agents de solubilisation sur le courant I_{Kr} en fonction de leur teneur et effet résiduel après rinçage.....	21
Figure 8 : Perte de substance active sur le système de perfusion par adsorption en fonction de la concentration	23
Figure 9 : Schéma simplifié d'un détecteur UV monochromatique.....	29
Figure 10 : Schéma simplifié d'un détecteur à barrette de diodes.....	30
Figure 11 : Exemples de composés fluorescents et de leur rendement quantique de fluorescence.....	31
Figure 12 : Schéma simplifié du fonctionnement d'un spectromètre de masse	32
Figure 13 : Principe de l'ionisation électrospray (ESI) et formation d'ions désolvatés.....	33
Figure 14 : Schéma d'un spectromètre de masse en tandem (SM/SM) à triple quadripôle.....	34
Figure 15 : Affinement du pic chromatographique par amélioration de l'efficacité de la séparation ..	39
Figure 16 : Représentation graphique de l'équation de Knox et contribution des termes A, B et C en fonction de la vitesse linéaire.	40
Figure 17 : Vue d'une particule superficiellement poreuse (2,7 μ m) par microscopie électronique à transmission.....	44
Figure 18 : Principe de l'extraction en phase solide pour la purification des échantillons hERG	47
Figure 19 : Description du fonctionnement d'un système d'extraction en ligne : chargement et extraction du composé (a), suivis de son élution et de sa détection (b).....	50
Figure 20 : Stabilité de trente-cinq composés en milieu hERG à température ambiante et après congélation et décongélation	54
Figure 21 : Schéma du déroulement de l'étude expérimentale	60
Figure 22 : Procédé d'extraction en phase solide et identification des fractions récoltées	66
Figure 23 : Taux de recouvrement (%) de solutions hERG par rapport à une solution « Cal » de même concentration en CLHP-UV	69
Figure 24 : Injections de 5 à 100 μ L d'une solution de composé B à 5 μ g/mL en CLHP-UV	70

Figure 25 : Solution de composé C 5µg/mL injectée sur colonne C18 classique et sur colonne « SPP » en mode isocratique.....	73
Figure 26 : Effet d'une dilution au 1/10 ^{ème} de l'échantillon hERG dans un solvant organique sur la réponse en CL-SM/SM.....	78
Figure 27 : Coefficients de variation sur trois injections de solutions Cal en CL-SM.....	79
Figure 28 : Taux de recouvrement moyen sur trois injections de solutions QC en CL-SM.....	80
Figure 29 : Taux de récupération après SPE seule à basse concentration.....	83
Figure 30 : Chromatogrammes à 200nm des différentes fractions extraites d'une solution échantillon de composé H (10µg/mL)	83
Figure 31 : Comparaison des rendements d'extraction calculés en CL-UV et CL-SM.....	86
Figure 32 : Comparaison des limites de quantification atteintes selon le mode de détection	88
Figure 33 : Arbre décisionnel pour orienter le développement d'une nouvelle méthode	90

Liste des tableaux

Tableau I : Répartition des principaux ions de part et d'autre de la membrane plasmique	12
Tableau II : Valeurs approximatives de concentration inhibitrice 50 (CI_{50}), de concentration plasmatique maximale thérapeutique (C_{max}) et marge de sécurité correspondante pour un panel de dix molécules anciennement ou actuellement commercialisées.....	25
Tableau III : Avantages et inconvénients des détecteurs UV, fluorimétriques et des spectromètres de masse pour le dosage des échantillons hERG	36
Tableau IV : Approches permettant d'augmenter la sensibilité en CLHP-UV.....	38
Tableau V : Comparaison des avantages et inconvénients des méthodes d'extraction en phase solide en ligne et en différé.....	52
Tableau VI : Paramètres étudiés et critères d'acceptation internes.....	61
Tableau VII : Essais d'augmentation du volume en CLHP-UV.....	70
Tableau VIII : Effet de l'utilisation des particules superficiellement poreuses en mode gradient.....	71
Tableau IX : Effet de l'utilisation des particules superficiellement poreuses en mode isocratique.....	72
Tableau X : Comparaison de l'efficacité et de la sensibilité en CLHP-UV et CLUHP-UV.....	74
Tableau XI : Sensibilité atteinte en CL-UV et conditions analytiques correspondantes	76
Tableau XII : Etude de l'effet de matrice en CL-SM/SM pour les composés B et C.....	77
Tableau XIII : Taux de récupération par fraction après SPE seule à haute concentration	82
Tableau XIV : Taux de recouvrement moyen (%) après processus complet.....	85
Tableau XV : Reproductibilité des rendements d'extraction sur trois répliques (CV%).....	85
Tableau XVI : Taux de recouvrement après extraction seule dans une fiole jaugée de 2,0mL	87

Liste des abréviations

λ	Longueur d'onde
ACN	Acétonitrile
BPL	Bonnes Pratiques de Laboratoire
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumine de sérum bovin)
Cal	<i>Calibration</i> (Solutions standards d'étalonnage)
CI₅₀	Concentration inhibitrice 50
CL	Chromatographie Liquide
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CL-SM	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
CL-SM/SM	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
CLUHP	Chromatographie Liquide Ultra-Haute Performance
CL-UV	Chromatographie Liquide couplée à la détection UV
C_{max}	Concentration plasmatique thérapeutique maximale
CV	Coefficient de Variation
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECG	Electrocardiogramme
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agence européenne du médicament)
ESI	Ionisation électrospray / Ionisation par Electronébulisation
FDA	<i>Food & Drug Administration</i> (Agence américaine du médicament)
H	Hauteur équivalente à un plateau théorique
h	Hauteur de plateau réduite
HEK	<i>Human Embryonic Kidney cells</i> (Cellules embryonnaires de rein)
HEPES	Acide 4-(2-Hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique
hERG	<i>human Ether-a-gogo Related Gene</i>
HP-β-CD	2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> (Conférence internationale pour l'harmonisation des exigences réglementaires)
I_{Kr}	Courant potassique rapide de rectification retardée
K_v(r)	Canal potassique rapide de rectification retardée
LQ	Limite de Quantification
m/z	Rapport masse/charge
MeOH	Méthanol
N	Nombre de plateaux théoriques
N/A	Non Applicable
ND	Non Déterminé
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
PDA	<i>Photodiode-Array detector</i> (Détecteur à barrette de diodes)
QC	<i>Quality Control</i> (Solutions de Contrôle Qualité)

<i>r</i>	Taux de recouvrement
R	Coefficient de corrélation
R&D	Recherche et Développement
S/N	<i>Signal to noise ratio</i> (Rapport signal/bruit)
SI	Standard Interne
SM	Spectrométrie de masse
SM/SM	Spectrométrie de masse en tandem
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extraction en phase solide)
SPP	<i>Superficially Porous Particles</i> (Particules superficiellement poreuses)
UV	Ultraviolet

INTRODUCTION

Depuis les années 90, de nombreuses molécules sans relation structurale et n'appartenant pas aux mêmes classe thérapeutiques ont été reconnues comme susceptibles de provoquer des torsades de pointes, un trouble du rythme cardiaque potentiellement léthal. [Hancox *et al.*, 2008 ; Richard et Dejean, 2014] Par la suite, le canal potassique Kv(r) ou hERG (human Ether-a-gogo Related Gene) a été identifié comme la cible préférentielle de ces médicaments. Le blocage de ce canal, suffisamment large pour accueillir les petites molécules pharmaceutiques, induit une prolongation de la repolarisation des ventricules cardiaques. Ce retard se traduit, sur l'électrocardiogramme, par un allongement de l'intervalle QT et expose à un risque d'arythmie cardiaque grave. Ainsi, la survenue de torsades de pointes a été la cause du retrait de plusieurs médicaments depuis vingt ans. La mise en lumière de ce phénomène a abouti à la mise en place de directives internationales (ICH S7A et S7B) visant à étudier la prolongation de l'intervalle QT à dose thérapeutique dès le développement non-clinique et avant toute administration à l'Homme. [Redfern *et al.*, 2003 ; Vandenberg *et al.*, 2001]

L'étude *in vitro* de cette cible secondaire repose sur la mesure du courant potassique transitant par le canal hERG lors de la repolarisation ventriculaire. Elle est encadrée par la directive ICH S7B. Comme la plupart des essais de pharmacologie de sécurité, elle consiste en une seule administration à chaque niveau de concentration. Le test hERG a pour objectif l'établissement d'une relation effet-concentration et le calcul de la concentration en substance active inhibant le courant potassique de 50% (CI₅₀). [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Yao *et al.*, 2005] Une molécule ayant une CI₅₀ inférieure à 1µM est ainsi considérée comme très inhibitrice. [Rampe et Brown, 2013] En parallèle, chaque solution utilisée lors du test *in vitro* est échantillonnée. Pour assurer la validité des résultats, la concentration en substance active dans ces formulations est ensuite dosée par une méthode analytique adéquate. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Qu *et al.*, 2011]

Le développement et la validation de telles méthodes se heurtent à certaines difficultés, dépendantes du potentiel inhibiteur de la substance active. Les concentrations de la gamme étudiée peuvent ainsi varier de 0,01µM à 100µM. Selon l'étude, l'analyste peut donc être confronté à la détection de très faibles concentrations (de l'ordre du ng/mL) ou à une faible solubilité dans le milieu physiologique aqueux des composés apolaires. Ce véhicule peut aussi générer un effet de matrice conséquent selon le type de détecteur utilisé. Traditionnellement, le choix de la méthode s'est porté sur la chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à la détection UV ou la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM). [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Herron *et al.*, 2004 ; Qu *et al.*, 2011]

Cependant, de nouvelles avancées technologiques sont apparues ou se sont développées au cours des dix dernières années. Ainsi, la chromatographie liquide ultra-haute performance (CLUHP) ou les colonnes remplies de particules superficiellement poreuses peuvent améliorer l'efficacité de la séparation des analytes et augmenter la sensibilité de certains types

de détecteurs (notamment l'UV et les spectromètres de masse à simple quadripôle). [Guillarme, 2014] Les détecteurs UV à long trajet optique permettent, pour leur part, d'élargir le spectre d'utilisation de la spectrophotométrie UV vers de plus basses concentrations. Dans la deuxième partie de cette thèse, nous présenterons ces techniques et étudierons leur applicabilité au dosage des échantillons en milieu hERG. Par ailleurs, un prétraitement des échantillons avant analyse chromatographique peut être nécessaire pour le concentrer ou éviter un effet de matrice dû aux composants non-volatils du milieu physiologique. [Rouessac et Rouessac, 2009] L'extraction en phase solide (SPE) est une méthode très utilisée en Bioanalyse pour la purification d'échantillons aqueux. La SPE peut aussi s'effectuer « en ligne », c'est-à-dire couplée au système chromatographique.

Pour finir, certaines de ces approches analytiques seront évaluées expérimentalement dans une dernière partie. Cette étude reprend les principaux résultats d'un travail de stage de six mois réalisé au sein du laboratoire de « *Preformulation and Non-clinical Formulation* » d'UCB Pharma, à Braine-l'Alleud. Si le temps dédié à la validation d'une méthode de dosage est incompressible, celui consacré à son développement peut être réduit. L'idée de ce projet est d'optimiser le développement de la méthode analytique en réduisant le nombre de tests à effectuer. Les performances de différentes techniques analytiques, parmi lesquelles la détection UV, la spectrométrie de masse, la CLUHP ou l'extraction en phase solide, sont évaluées au regard des objectifs de développement d'une méthode de dosage des échantillons hERG. Nous avons pour cela travaillé sur un panel représentatif de dix molécules. Le but final de ce projet expérimental est d'établir un arbre décisionnel permettant de limiter les tests à effectuer lors du développement de méthode pour une nouvelle substance active et d'orienter rapidement le choix de l'analyste vers la technique la plus adéquate.

1. CONTEXTE ET FONDEMENT DU SUJET

Le processus de Recherche et Développement (R&D) d'un nouveau médicament à usage humain représente un travail de dix à douze ans jusqu'à sa mise sur le marché pour un investissement estimé à environ un milliard d'euros. [leem.org] Partie essentielle de ce processus, le développement non-clinique regroupe les études de pharmacologie, toxicologie et pharmacocinétique, réalisées *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal. Cette investigation permet de prédire et de caractériser de potentiels effets indésirables chez l'Homme afin de déterminer une dose initiale efficace et sûre pour les essais cliniques (**Figure 1**). [ICH S7A, 2000]

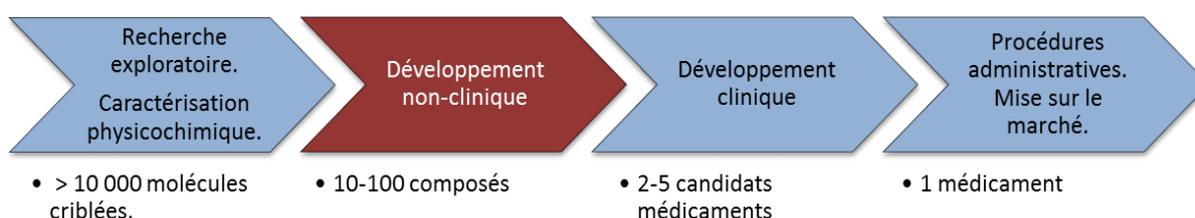


Figure 1 : Processus de Recherche et Développement d'un nouveau médicament [D'après leem.org]

1.1. Le test hERG

1.1.1. Contexte réglementaire et physiologique

Les études de pharmacologie de sécurité sont une part importante et obligatoire du développement non-clinique, et doivent être réalisées avant la première administration chez l'Homme. Elles sont définies comme les études qui investiguent les potentiels effets indésirables pharmacodynamiques d'une substance sur les fonctions physiologiques lors d'une exposition à des doses thérapeutiques. Elles sont généralement menées en une seule administration. Les fonctions vitales (système cardio-vasculaire, système respiratoire et système nerveux central), sont obligatoirement étudiées et constituent le « Core Battery ». Pour assurer leur qualité et leur fiabilité, ces études sont soumises aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). [ICH S7A, 2000]

L'étude de l'allongement de la repolarisation du ventricule cardiaque est un élément majeur des études de pharmacologie de sécurité. Elle fait l'objet, depuis 2005, d'une directive spécifique (ICH S7B), destinée à harmoniser les essais menés et à établir une stratégie d'étude. Sur un électrocardiogramme (ECG) normal (**Figure 2a**), l'onde P traduit la dépolarisation de l'oreillette, le complexe QRS correspond à la dépolarisation du ventricule et l'onde T à sa repolarisation. L'intervalle QT d'un électrocardiogramme mesure donc le temps

écoulé entre la dépolarisation et la repolarisation ventriculaire. Quand cette durée (0,3 à 0,4s en temps normal chez l'Homme) est augmentée, le risque d'arythmie ventriculaire augmente, caractérisé sur l'ECG par des torsades de pointe (**Figure 2b**). Celles-ci sont généralement transitoires mais peuvent, dans de rares cas, dégénérer en fibrillation ventriculaire qui engage le pronostic vital à court terme. [HAS, 2009 ; ICH S7B, 2005 ; Landry et Gies, 2009 ; Vandenberg *et al.*, 2001]

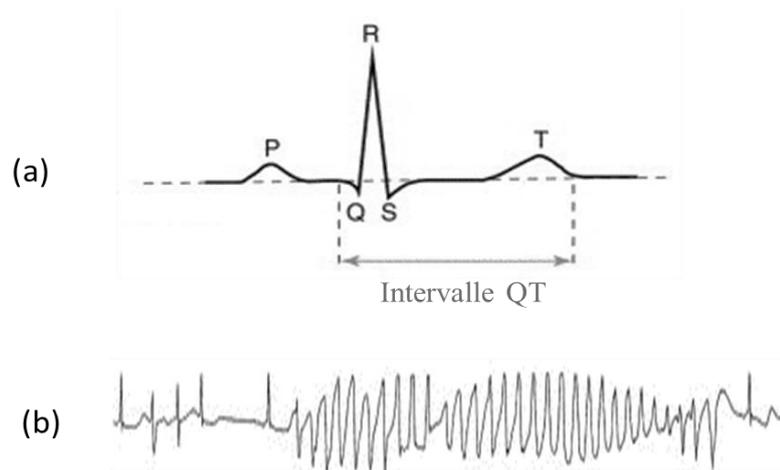


Figure 2 : ECG normal (a) et torsades de pointe (b)

[Vandenberg *et al.*, 2001]

La directive ICH S7B recommande deux essais complémentaires afin d'étudier la capacité d'une substance active, et éventuellement de ses métabolites, à allonger la repolarisation ventriculaire. Le premier est un test d'électrophysiologie *in vitro* étudiant l'inhibition du courant potassique responsable de la repolarisation. Le second essai investigate directement, chez l'animal, l'allongement de l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme. L'étude *in vitro* permet cependant d'établir plus aisément un éventuel rapport effet-concentration, alors que l'étude *in vivo* est soumise à de nombreux facteurs, tels que la pharmacocinétique du composé ou la fréquence cardiaque. Les résultats des deux tests sont à prendre en compte pour le choix de la dose à administrer à l'Homme. [ICH S7B, 2005 ; Redfern *et al.*, 2003]

Au niveau des cellules contractiles du myocarde, l'activité électrique se caractérise par un potentiel d'action. Celui-ci s'explique par le fonctionnement (ouverture / fermeture) de canaux ioniques transmembranaires en réponse à des stimuli extracellulaires. Le potentiel de repos de ces cellules est d'environ -80mV. L'activité électrique provient d'une différence de concentration ionique entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme (**Tableau I**), les échanges entre les deux milieux se faisant par l'intermédiaire des canaux ioniques. Ainsi, les ions potassium (K^+), plus concentrés à l'intérieur de la cellule, tendent à en sortir selon leur gradient chimique. [Guénard, 2001 ; Landry et Gies, 2009]

Tableau I : Répartition des principaux ions de part et d'autre de la membrane plasmique
[Guénard, 2001 ; Landry et Gies, 2009]

Ion	Concentration intracellulaire (mM)	Concentration extracellulaire (mM)
Sodium (Na^+)	14	140
Potassium (K^+)	160	4
Calcium (Ca^{2+})	10^{-4}	1,7
Chlorures (Cl^-)	14	150
Magnésium (Mg^{2+})	0,5	1

Le potentiel d'action des cellules contractiles du myocarde se décompose en cinq phases (**Figure 3**). Dans un premier temps, la dépolarisation (phase 0) correspond à l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants provoquant l'entrée rapide d'ions sodium (Na^+) selon leur gradient chimique (cf. **Tableau I**). La phase 1 correspond à la fermeture de ces canaux sodiques et l'ouverture de canaux potassiques, puis la phase 2, le plateau calcique, correspond à l'ouverture de canaux calciques et une entrée d'ions Calcium (Ca^{2+}). Enfin, la repolarisation (phase 3) est assurée par l'ouverture de canaux potassiques voltage-dépendants, également appelés canaux de rectification retardée. Le potentiel de repos de la membrane cellulaire est retrouvé en phase 4. [ICH S7B, 2005 ; Landry et Gies, 2009]

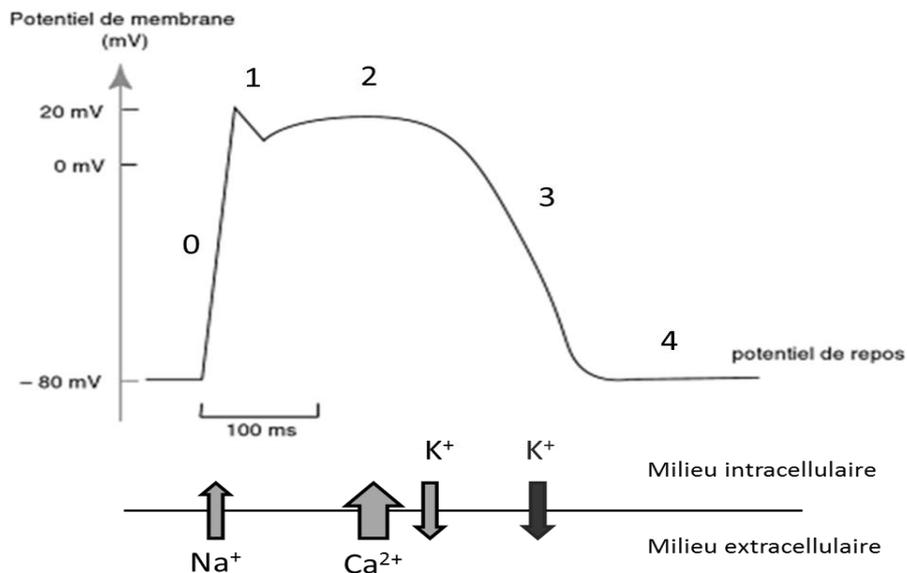


Figure 3 : Potentiel d'action « à plateau calcique » observé au niveau des cellules contractiles du myocarde et principaux flux d'ions correspondants
[ICH S7B, 2005 ; Landry et Gies, 2009]

L'inhibition des canaux potassiques impliqués dans la repolarisation ventriculaire constitue le mécanisme d'action des médicaments anti-arythmiques de classe III. Cependant, les canaux potassiques rapides de rectification retardée Kv(r) ont aussi été identifiés comme la cible préférentielle de nombreuses substances actives à visée non-cardiaque mais allongeant l'intervalle QT. Les canaux Kv(r) se caractérisent par une activation lente suivie d'une inactivation rapide. La sous-unité α de ce canal transmembranaire est codée par le gène hERG (human Ether-a-gogo Related Gene), porté par le chromosome 7, ce qui explique qu'on peut trouver également l'appellation de canal hERG. Celui-ci est responsable d'un courant potassique, nommé I_{Kr} , qui est étudié lors du test *in vitro* imposé par la directive ICH S7B. Ainsi, la majorité des causes médicamenteuses d'allongement de l'espace QT sont dues à l'inhibition du courant I_{Kr} dans les tissus cardiaques. [Landry et Gies, 2009 ; Redfern *et al.*, 2003] La structure du canal Kv(r) est, en effet, suffisamment large pour accueillir des molécules de différentes structures chimiques. [Hancox *et al.*, 2008; Vandenberg *et al.*, 2001]

Par conséquent, de nombreuses molécules sont susceptibles d'être inhibitrices du canal hERG et donc d'allonger l'intervalle QT. [Hancox *et al.*, 2008 ; HAS, 2009] Au cours des années 90, les antihistaminiques astémizole et terfénadine ont été retirés du marché en raison d'un risque majeur de survenue de torsades de pointes mortelles. [Rampe et Brown, 2013] Aux Etats-Unis, plusieurs décès entre 1985 et 1998 ont ainsi été imputés à la prise de terfénadine. [Hoffmann et Warner, 2006]. Puis, la dernière décennie a vu l'arrêt de la commercialisation de deux neuroleptiques (sultopride, thioridazine) et du cisapride (stimulant de la motricité gastrique). [Rampe et Brown, 2013 ; Richard et Dejean, 2014]

De nombreuses molécules de structures chimiques et d'indications variées ont été identifiées comme potentiellement torsadogènes en raison de leur capacité à allonger l'espace QT. Une liste non-exhaustive de ces substances actives est présentée en Annexe 1. Parmi elles sont bien sûr citées des anti-arythmiques de classe Ia (comme la quinidine) et III (amiodarone, dofétilide) en accord avec leur mécanisme d'action et le sotalol (bêtabloquant non sélectif). Cependant, on trouve aussi de nombreux neuroleptiques (halopéridol, chlorpromazine...), des antidépresseurs (tels que l'amitriptyline et le citalopram), des antibiotiques (clarithromycine, lévofloxacine), des antiémétiques (dompéridone, odansétron) ou des antiparasitaires (chloroquine). [HAS, 2009 ; Rampe et Brown, 2013 ; Richard et Dejean, 2014] Ce risque ne justifie pas nécessairement un retrait du marché mais oblige à une surveillance cardiologique accrue. Identifier un potentiel d'allongement de l'espace QT permet, de plus, d'éviter l'association de deux médicaments torsadogènes ou avec un médicament hypokaliémiant (tels que les diurétiques thiazidiques et de l'anse ou les laxatifs stimulants). [ANSM, 2001 ; HAS, 2009 ; Richard et Dejean, 2014]

1.1.2. Déroulement du test

L'étude du canal hERG se fait par un test d'électrophysiologie *in vitro*. Son principe est de provoquer l'ouverture du canal potassique voltage-dépendant $K_v(r)$ en réponse à un stimulus (une variation du potentiel de la membrane cellulaire). L'ouverture du canal entraîne une sortie d'ions potassium et donc la génération d'un courant électrique (appelé I_{Kr}). Un schéma du montage expérimental est représenté ci-dessous (**Figure 4**). Le courant est enregistré par la technique du « patch-clamp ». Dans ce montage, une portion de la membrane cellulaire est isolée dans une micropipette (environ 1 μm de diamètre). Une aspiration permet la formation d'une liaison étanche entre l'embout de la micropipette, comportant les électrodes de stimulation et de mesure, et la membrane plasmique. Pendant le test, un dispositif électrique permet d'imposer un potentiel au fragment de membrane et d'enregistrer simultanément le courant électrique qui en résulte. [Guénard, 2001 ; Yao *et al.*, 2005] Des images d'un poste de « patch-clamp » sont proposées en Annexe 2.

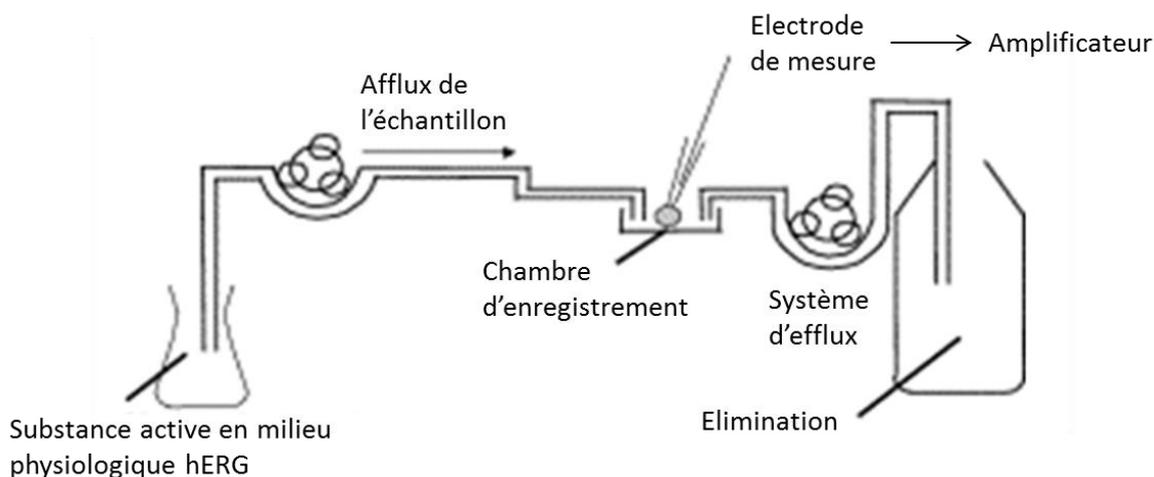


Figure 4 : Schéma du système de perfusion utilisé dans les études hERG

[Herron *et al.*, 2004]

L'étude est menée sur des cellules transfectées par le gène hERG, qui entraîne l'expression de canaux $K_v(r)$ sur la membrane de ces cellules. Les cellules embryonnaires de rein (lignée cellulaire HEK293) sont fréquemment utilisées. La mesure peut se faire à température ambiante ou proche de la température physiologique, à 35°C, pour certaines études. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Qu *et al.*, 2011 ; Yao *et al.*, 2005] Dans la chambre d'enregistrement, les cellules baignent dans une solution physiologique (le milieu hERG) mimant le milieu extracellulaire et circulant en continu (**Figure 4**). Il est constitué de chlorure de sodium (NaCl) 137mM, chlorure de potassium (KCl) 4mM, chlorure de calcium (CaCl_2) 1,8mM, chlorure de magnésium (MgCl_2) 1mM, D-glucose 10mM et HEPES 10mM. L'acide 4-(2-Hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique est un tampon biologique compatible avec les cultures cellulaires. Ces proportions peuvent varier légèrement d'un laboratoire à l'autre.

Le pH du milieu physiologique hERG est porté à $7,40 \pm 0,05$ par ajout d'hydroxyde de sodium. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Herron *et al.*, 2004 ; Qu *et al.*, 2011]

Plusieurs protocoles de stimulation peuvent être utilisés pour cette étude et, avant chaque mesure du courant potassique, il est nécessaire d'attendre l'obtention d'un état d'équilibre. Une procédure fréquemment utilisée est montrée dans la **figure 5a** ci-dessous. La cellule se trouve, au repos, à un potentiel de -80mV , puis le voltage est rapidement porté à $+20\text{mV}$ (pour mimer une dépolarisation) et maintenu à ce niveau durant environ 5s. Le potentiel est alors brusquement abaissé à -50mV où un palier de 5s est respecté, puis la cellule retrouve son potentiel de repos pour 15s avant la prochaine impulsion. Un temps d'équilibration d'environ 10min est attendu après chaque changement de concentration en substance active dans la perfusion. C'est lors du palier à -50mV que l'intensité du courant potassique est mesurée pour le calcul du pourcentage d'inhibition (**Figure 5a**). [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Yao *et al.*, 2005]

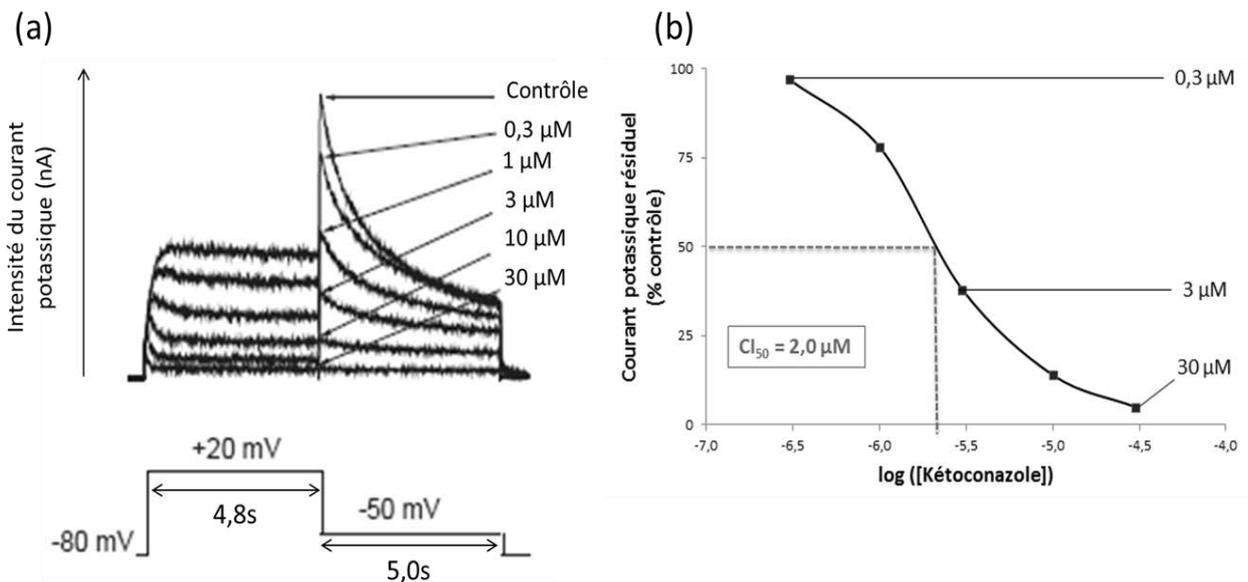


Figure 5 : Etude *in vitro* de l'effet de concentrations croissantes de kétoconazole sur le courant potassique I_{Kr} . Détermination de la CI_{50} .

[Yao *et al.*, 2005]

Une ou plusieurs concentrations de substance active peuvent être étudiées sur un même système. On procède alors dans l'ordre croissant des concentrations selon une échelle logarithmique ($0,3\mu\text{M}$ - $1\mu\text{M}$ - $3\mu\text{M}$...). Dans les formulations perfusées, la substance active est diluée dans le milieu physiologique. Pour mesurer la valeur du courant I_{Kr} en l'absence d'inhibition, le test commence toujours par une perfusion de contrôle négatif (milieu physiologique seul). Il est également nécessaire de perfuser une solution de véhicule seul, soit le milieu hERG et les éventuelles substances ajoutées pour solubiliser le composé étudié (souvent le DMSO), afin de quantifier le pourcentage d'inhibition dû à la matrice et non à la substance active. A la fin de l'étude, une solution de contrôle positif (substance E-4031 à

500nM par exemple) est injectée afin de s'assurer de la sensibilité du système. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; ICH S7B, 2005 ; Yao *et al.*, 2005]

Selon la directive ICH S7B, les concentrations en substance active étudiées doivent couvrir un large domaine, couvrant et excédant la concentration plasmatique thérapeutique maximale attendue chez l'Homme (C_{max}). [ICH S7B, 2005] Des concentrations croissantes sont testées jusqu'à l'obtention d'une courbe effet-concentration donnant le pourcentage de courant potassique résiduel en fonction du logarithme de la concentration en substance active (**Figure 5b**). On peut ainsi déterminer la concentration inhibitrice 50 (CI_{50}) réduisant l'intensité du courant potassique I_{Kr} de 50%. Le cas échéant, il est possible de calculer uniquement la concentration maximale inhibitrice (CI_{20} par exemple) si de plus fortes concentrations ne peuvent être testées (solubilité insuffisante dans le milieu physiologique, cytotoxicité du composé). [ICH S7B, 2005 ; Redfern *et al.*, 2003] De plus, si une substance ne provoque qu'une faible inhibition du courant I_{Kr} à une concentration très supérieure à sa concentration thérapeutique chez l'Homme, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire d'obtenir une valeur de CI_{50} . [Brimecombe *et al.*, 2009]

L'inhibition du courant potassique hERG n'est, cependant, pas automatiquement synonyme de risque de torsade de pointe chez l'homme. Selon Hoffmann et Warner, environ trois quarts des nouvelles substances actives testées lors des premières phases du développement sont inhibitrices du courant I_{Kr} . [Hoffmann et Warner, 2006] Un taux non négligeable de faux positifs apparaît donc logique. Il est même probable que toute molécule pharmaceutique sera inhibitrice au-delà d'une certaine concentration. [Hancox *et al.*, 2008] Aussi, il est important de placer le résultat obtenu en regard de la concentration plasmatique. A ce titre, la marge de sécurité calcule le rapport entre la concentration en substance active entraînant une inhibition de 50% du courant potassique de repolarisation (CI_{50}) et la concentration maximum requise pour l'action thérapeutique de la substance chez l'Homme (C_{max}). L'étude de Redfern *et al.* estime que les composés ayant une marge de sécurité d'au moins trente sont, dans la majorité des cas, dépourvus de risque torsadogène. Ainsi, la plus haute concentration utilisable chez l'Homme devrait donc être, au minimum, trente fois plus faible que la CI_{50} de cette substance. [ICH S7B, 2005 ; Redfern *et al.*, 2003 ; Wallis, 2010]

$$\text{Marge de sécurité} = \frac{CI_{50}}{C_{max}}$$

Différentes études (prospectives et bibliographiques) démontrent une bonne corrélation entre la marge de sécurité hERG et le risque de torsades de pointe chez l'Homme. [Wallis, 2010] Cette valeur de trente fois n'est cependant pas absolue et des exceptions sont observées. En effet, des substances peuvent provoquer un allongement de l'intervalle QT malgré une marge de sécurité proche de cent, tandis que d'autres n'ont présenté aucun effet sur la repolarisation avec une marge inférieure à dix. [Redfern *et al.*, 2003] Par ailleurs, les cellules isolées ont une capacité de métabolisation limitée. Si un allongement de l'espace QT est observé *in vivo*, sans effet lors de l'étude *in vitro*, une seconde étude hERG sur les métabolites de la molécule peut être envisagée. [ICH S7B, 2005]

Les résultats combinés des tests *in vitro* et *in vivo* de pharmacologie de sécurité cardiovasculaire sont donc nécessaires et ont une très bonne valeur prédictive sur l'allongement de l'intervalle QT et le risque de survenue de torsades de pointe chez l'Homme. [Wallis, 2010] Enfin, d'autres critères entrent également en compte dans l'interprétation du résultat, en particulier la gravité de la maladie à traiter et les alternatives thérapeutiques disponibles. Il sera ainsi envisageable d'accepter une marge plus faible pour un médicament destiné, par exemple, à la cancérologie, tandis que les autorités réglementaires pourront être plus strictes pour des maladies bénignes. [Hoffmann et Warner, 2006 ; ICH S7B, 2005 ; Redfern *et al.*, 2003]

1.2. Facteurs limitants du test *in vitro*

1.2.1. Risque de sous-estimation du potentiel inhibiteur

Le test hERG occupe donc une place importante dans l'évaluation du risque cardiovasculaire. La marge de sécurité (CI_{50}/C_{max}) étant prise en compte dans le choix de poursuivre ou non le développement du composé chez l'Homme, il est nécessaire de s'assurer de la concentration réelle en substance active produisant l'effet inhibiteur observé. Généralement, pour établir une courbe effet-concentration, il est admis que la quantité de substance active disponible pour interagir avec le canal hERG est équivalente à sa concentration théorique. [Qu *et al.*, 2011] Or, selon la directive ICH S7B, plusieurs facteurs peuvent influencer l'interprétation des résultats *in vitro*. Ainsi, la limite de solubilité du composé dans le milieu physiologique, le manque de stabilité de la molécule dans les conditions de l'étude ou l'adsorption du composé sur les conduits du système de perfusion peuvent réduire la concentration à laquelle sont réellement exposées les cellules. [Herron *et al.*, 2004 ; ICH S7B, 2005]

Comme le montre l'exemple théorique présenté ci-dessous (**Figure 6**), la perfusion de solutions de concentration réelle (points de la courbe rouge) inférieure à leur valeur nominale (courbe noire) peut entraîner une surestimation de la concentration inhibitrice 50. Celle-ci est, en effet, habituellement calculée sur la base des concentrations théoriques. Or, plus la CI_{50} d'une molécule est faible, plus sa capacité d'inhibition du canal hERG est élevée. Par conséquent, le potentiel inhibiteur du composé peut être sous-estimé (d'un facteur deux dans notre exemple). Des valeurs de CI_{50} jusqu'à dix fois plus faibles ont ainsi été calculées en prenant en compte les valeurs de concentration réelles au lieu des concentrations théoriques. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Qu *et al.*, 2011]

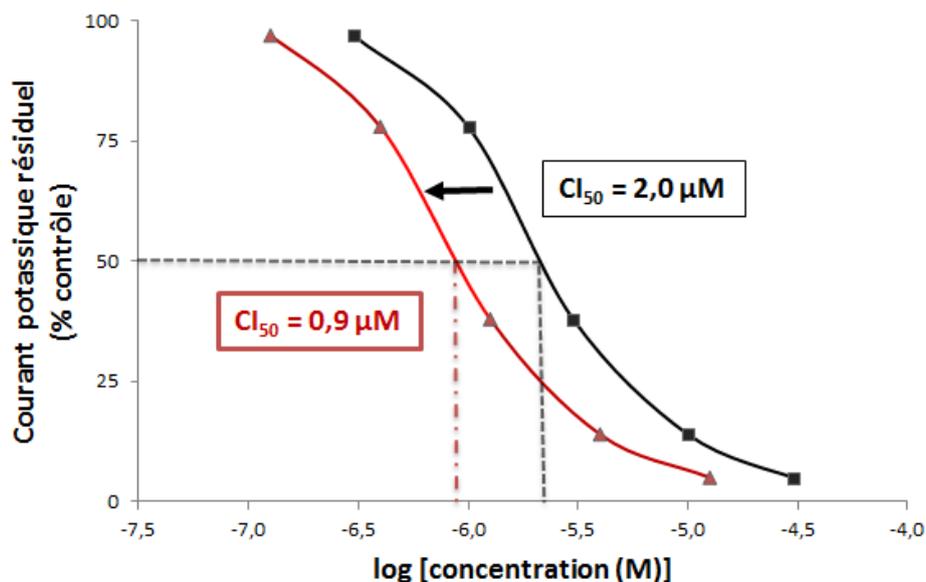


Figure 6 : Exemple d'une surestimation de la concentration réelle entraînant une sous-estimation du potentiel inhibiteur

[D'après Yao *et al.*, 2005]

Selon la directive S7B, le test hERG est soumis aux Bonnes Pratiques de Laboratoire [ICH S7B, 2005]. Ainsi, les principes des BPL de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), applicables dans l'Union Européenne, stipulent que si l'élément d'essai (la substance active) est appliqué dans un véhicule, ce qui est le cas des formulations hERG, il est nécessaire de mesurer sa concentration dans ce véhicule. [OCDE, 1998] La réglementation en vigueur aux Etats-Unis mentionne même explicitement que la concentration doit être déterminée par une méthode analytique adéquate. [FDA, 21CFR58.113] Dans les études hERG, il est donc prévu qu'un échantillon de chaque formulation préparée, y compris de la solution de véhicule seul, soit prélevé. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Herron *et al.*, 2004] Nous verrons dans la suite de cette thèse que la chromatographie liquide est presque exclusivement choisie pour l'analyse quantitative de ces échantillons.

Par ailleurs, ces deux textes réglementaires s'accordent pour dire que la stabilité du composé étudié dans les conditions de l'essai *in vitro* doit être connue. [FDA, 21CFR58.113 ; OCDE, 1998] En effet, une différence entre les concentrations réelles et théoriques peut être liée au délai écoulé entre la préparation de la formulation (en milieu physiologique) et son utilisation lors du test *in vitro*. [Qu *et al.*, 2011] La stabilité d'un composé dans un milieu donné est fonction de la molécule, de la matrice, de la durée et des conditions de stockage. [FDA, 2001] Ainsi, la dégradation chimique d'un composé (par la rupture ou la formation de liaisons covalentes) est généralement plus rapide en solution qu'à l'état solide et souvent favorisée par une augmentation de la température. [Loftsson, 2014] Or, rappelons que la mesure du courant I_{Kr} peut se faire à température ambiante ou jusqu'à 35°C. [Yao *et al.*, 2005]

Des données provenant de plusieurs études hERG ont montré qu'à température ambiante, cinq molécules sur trente-cinq présentaient une dégradation supérieure à 15% après un délai de 8h. [Brimecombe *et al.*, 2009] Il est donc primordial de s'assurer de la stabilité du produit dans les conditions de l'étude (milieu hERG, température, durée) avant le commencement de celle-ci. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Yao *et al.*, 2005] Toutefois, le délai entre la préparation de la formulation et son utilisation est généralement court. La dégradation des échantillons en milieu hERG est donc un problème davantage rencontré en aval, lors du dosage des échantillons issus des études hERG. Nous reviendrons plus en détail sur les questions de stabilité des composés dans la deuxième partie de cette thèse (chapitre 2.4).

1.2.2. Solubilité

La solubilité d'une substance dans un solvant se définit comme la quantité maximale de ce composé pouvant être dissoute dans un volume donné. Elle s'exprime donc, par exemple, en mg/L. A cette concentration limite, la solution est dite saturée. [Rast et Guth, 2014 ; Rouquérol *et al.*, 2013] La tendance actuelle veut que les composés pharmaceutiques issus de la recherche exploratoire soient plus lipophiles, afin d'augmenter leur affinité pour la cible

thérapeutique et leur sélectivité. [Di *et al.*, 2012 ; Lipinski, 2004] Des études récentes montrent ainsi que 75% des molécules en développement ont une faible solubilité aqueuse. [Di *et al.*, 2012] Or, le véhicule dans lequel doit être dissous le composé est un milieu aqueux, riche en sels et tamponné à un pH de 7,40. La limite de solubilité de composés hydrophobes dans le milieu hERG risque donc d'être relativement basse.

Pour les essais *in vitro*, la solubilité insuffisante de certains composés apolaires dans le milieu physiologique, particulièrement à haute concentration, entraîne un risque d'erreur dans l'interprétation des résultats en réduisant la quantité de substance active apte à interagir avec le canal hERG. Plus la concentration de la formulation dépasse la limite de solubilité du composé dans le véhicule, plus la concentration réelle de cette substance en solution sera significativement inférieure à sa concentration théorique. Dans le pire des cas, des concentrations croissantes en substance active peuvent ne pas provoquer une plus grande inhibition du courant hERG, empêchant l'établissement d'une relation effet-concentration. [Brimecombe *et al.*, 2009]

Dans les études hERG, le diméthylsulfoxyde (DMSO) est utilisé pour assurer la dissolution du composé et préparer les solutions mères d'échantillon. Environ 90% des composés pharmaceutiques sont, en effet, solubles dans ce solvant. [Chorghade, 2007] L'utilisation du DMSO s'explique aussi par la bonne connaissance de ses effets pharmacologiques et par sa relative inertie vis-à-vis des autres composés et des cultures cellulaires. [Himmel, 2007] Dans les solutions échantillons, le DMSO se retrouve ensuite en faibles proportions (de l'ordre de 0,1 à 1,0% v/v) dans le milieu hERG. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Herron *et al.*, 2004 ; Qu *et al.*, 2011] Le principal risque, lors de cette première dilution, est l'obtention de solutions sursaturées dans lesquelles une partie du composé actif va précipiter, c'est-à-dire réapparaître sous une forme solide souvent très peu soluble. [Borchardt *et al.*, 2004 ; Rast et Guth, 2014 ; Rouquérol *et al.*, 2013]

La cinétique de précipitation d'un composé est difficile à prédire car de nombreux paramètres entrent en compte, comme une diminution de la température qui affecte la solubilité. [Rast et Guth, 2014] Selon Borchardt *et al.*, la faible proportion de DMSO dans les solutions échantillons contribue peu à la solubilisation de la substance active, bien qu'une teneur de 1,0% offre, au mieux, un doublement de la solubilité de certains composés apolaires. Le DMSO permettrait, cependant, de ralentir la cinétique de précipitation dans les solutions fraîchement préparées. [Borchardt *et al.*, 2004 ; Brimecombe *et al.*, 2009] Toutefois, l'unique solution permettant d'éviter avec certitude ce phénomène est, bien entendu, de travailler à une concentration inférieure à la limite de solubilité du composé. [Rast et Guth, 2014] Cependant, cela ne permettrait pas, dans de nombreux cas, d'étudier *in vitro* des concentrations de 30 ou 100µM.

En remplacement du DMSO, des excipients communément utilisés lors des tests *in vivo* sont aujourd'hui employés dans des essais *in vitro* afin de surpasser le manque de solubilité des composés hydrophobes. [Di *et al.*, 2012] Dans ce but, l'étude de Himmel évalue trois catégories d'agents de solubilisation : les co-solvants organiques (DMSO, acétonitrile,

méthanol), les surfactants (Cremophor, Tween) et les agents complexants (cyclodextrines, albumine de sérum bovin). D'après cette étude, une réduction du signal inférieure à 20% est considérée acceptable. Ainsi, l'inhibition du courant I_{Kr} par le DMSO, proportionnelle à sa concentration, devient significative à une teneur de 1,0% (v/v), mais est totalement réversible après rinçage par le milieu hERG (**Figure 7a**). L'effet inhibiteur du méthanol et de l'acétonitrile est légèrement plus faible à teneur égale, mais le phénomène n'est que partiellement réversible. Pour leur part, les surfactants inhibent fortement le courant hERG, même à faible concentration (0,1%, v/v). De plus, l'effet n'est que faiblement corrigé par rinçage, ce qui suggère une altération permanente du fonctionnement des canaux $Kv(r)$. Le cas du Cremophor est présenté en exemple (**Figure 7a**). L'effet inhibiteur des surfactants serait lié à leur interaction avec les lipides membranaires. [Himmel, 2007]

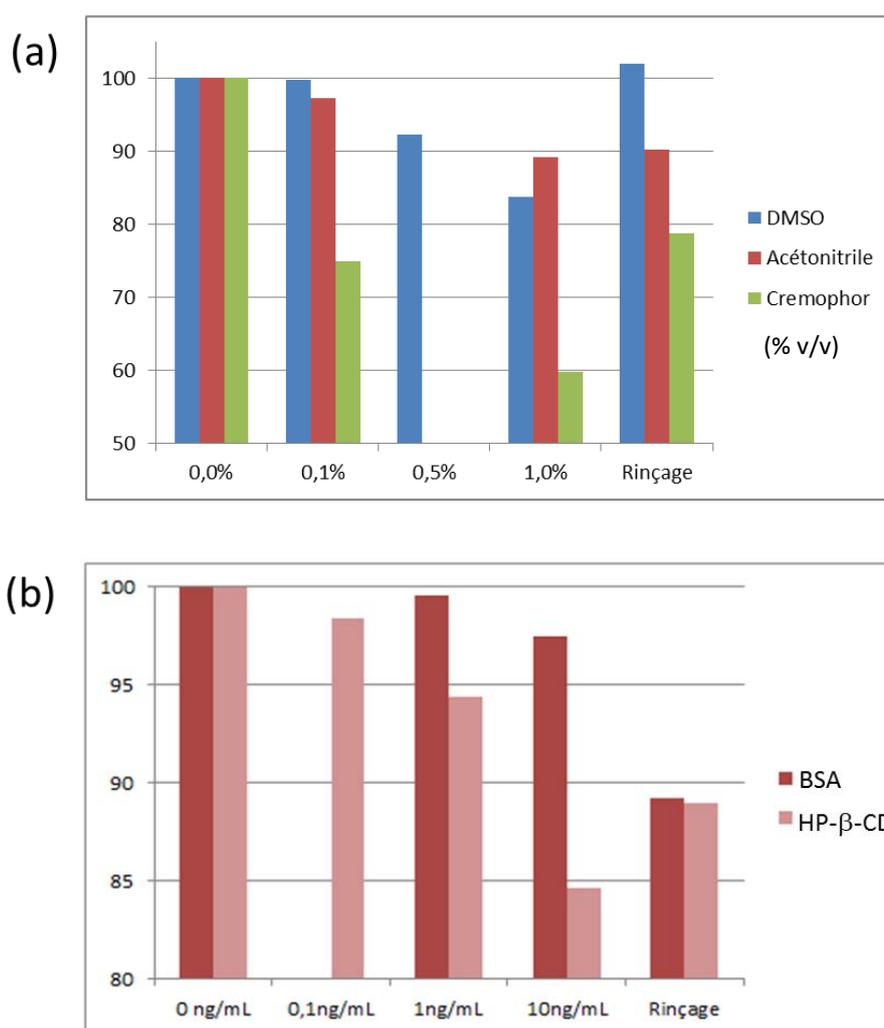


Figure 7 : Effet inhibiteur de différents agents de solubilisation sur le courant I_{Kr} en fonction de leur teneur et effet résiduel après rinçage

[D'après Himmel, 2007]

L'exposition des cellules en culture aux macromolécules que sont l'albumine de sérum bovin (BSA) et la 2-hydroxylpropyl- β -cyclodextrine (HP- β -CD) n'entraîne qu'une faible inhibition du courant hERG, y compris à une concentration de 10ng/mL pour l'albumine (**Figure 7b**). L'effet est partiellement réversible pour les deux excipients. Cependant, l'utilisation de la BSA se heurte à deux problèmes majeurs. Premièrement, la liaison d'une nouvelle substance active aux protéines n'est pas toujours connue à ce stade du développement, d'où une incertitude sur sa concentration libre. En second lieu, il existe un risque de formation de mousse lors l'addition de la BSA au milieu physiologique. Pour ces raisons, Himmel ne recommande pas l'utilisation de l'albumine en routine pour ce test. [Himmel, 2007] Par ailleurs, l'étude de Goineau *et al.* a montré que la HP- β -CD, bien qu'améliorant la solubilité de certains composés dans les solutions échantillons, pouvait masquer l'effet inhibiteur de ceux-ci et ne convenait donc pas aux tests d'électrophysiologie sur le canal hERG. [Goineau *et al.*, 2014]

En conclusion, il apparaît que le DMSO, bien qu'imparfait, demeure l'excipient de choix pour les essais hERG *in vitro*, à condition de ne pas dépasser une teneur de 1,0%. Son effet inhibiteur, attribué à une augmentation de l'osmolarité du milieu physiologique, est proportionnel à sa concentration et totalement réversible par rinçage, ce qui n'est pas le cas des autres agents de solubilisation étudiés. [Himmel, 2007] Il est, par conséquent, primordial de déterminer la solubilité de la molécule étudiée dans le milieu hERG et dans le DMSO avant de débiter l'étude *in vitro*. L'absence de précipités dans les solutions filles, parfois invisibles même par microscopie, peut être déterminée, par exemple, par turbidimétrie. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Rast et Guth, 2014 ; Qu *et al.*, 2011] Par ailleurs, pour réduire l'impact du manque de solubilité, Di *et al.* recommandent d'éviter les dilutions intermédiaires dans le milieu hERG, mais de préparer plusieurs solutions dans le DMSO. Par exemple, une solution échantillon à 0,1 μ g/mL, devant contenir 0,1% (v/v) de solvant serait préférentiellement préparée par une dilution au 1/1000^e d'une solution mère à 100 μ g/mL, et non par dilution au 1/10^e d'une solution échantillon intermédiaire à 1 μ g/mL. [Di *et al.*, 2012]

1.2.3. Adsorption

L'adsorption du composé sur les conduits du système de perfusion est une autre cause potentielle de perte de produit lors du test *in vitro* et donc de surestimation de la concentration réelle à laquelle sont exposées les cellules. L'adsorption (non-spécifique) du soluté a lieu à l'interface solide-liquide. Son ampleur est, généralement, inversement proportionnelle à la solubilité de la molécule dans le véhicule. Le risque est donc, logiquement, plus grand pour les substances actives apolaires, car elles sont faiblement solubles dans le milieu hERG. [Florence et Attwood, 2011 ; Mahato et Narang, 2011] L'adsorption dépend aussi de la surface totale de l'adsorbant, dans notre cas les conduits de la perfusion. Selon le modèle établi par Langmuir, le solide dispose d'un nombre limité de sites actifs sur lesquels peuvent se fixer une molécule de soluté. Quand tous les sites sont occupés, plus aucune liaison ne peut avoir lieu. En conséquence, le nombre de molécules adsorbées augmente avec la

concentration en substance active dans l'échantillon perfusé jusqu'à atteindre une limite. Au-delà de cette limite, plus la concentration en substance active est élevée, moins la fraction de molécules adsorbées sera significative. L'impact est donc, théoriquement, plus important pour les solutions les moins concentrées. [Mahato et Narang, 2011]

Classiquement, un petit volume de la formulation est prélevé pour analyse quantitative juste avant que celle-ci soit perfusée. Cet échantillon ne prend pas en compte une éventuelle adsorption du composé sur les conduits du système de perfusion entre le réservoir contenant la solution à tester et la chambre d'enregistrement dans laquelle se trouvent les cellules en culture (cf. **Figure 4** au chapitre 1.1.2). [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Herron *et al.*, 2004] L'existence et l'ampleur d'une adsorption de la substance active peuvent être déterminées simplement en utilisant un système de perfusion dépourvu de cellules en culture. Des échantillons sont ainsi prélevés dans la chambre d'incubation vide, puis leur concentration est comparée à la concentration initiale de la solution. [Brimecombe *et al.*, 2009]

Une revue d'études menée par Brimecombe *et al.* montre que le phénomène est variable (**Figure 8**). Pour les hautes concentrations, les pertes par adsorption sont relativement faibles : seules deux molécules (sur un total de vingt-cinq) subissent une diminution de leur concentration supérieure à 10,0%, mais celle-ci n'excède jamais 15,0%. A l'opposé, seize molécules ne présentent pas de perte supérieure à 1,0%. Aux plus basses concentrations, pour trente-deux des trente-neuf composés étudiés, les pertes par adsorption représentent moins de 10,0% de la concentration initiale (**Figure 8**), et ne dépassent pas 1,0% pour vingt molécules. Cependant, la diminution de la concentration peut être très importante. Ainsi, trois substances subissent des pertes supérieures à 20,0%, atteignant 73,9% dans le pire des cas. Enfin, nous notons que les deux molécules adhérant de façon importante au système de perfusion à haute concentration ne subissent aucun effet de ce type à basse concentration, ce qui souligne la variabilité du phénomène. [Brimecombe *et al.*, 2009] L'étude ne donne, en revanche, pas d'indication sur la structure et la polarité de ces molécules.

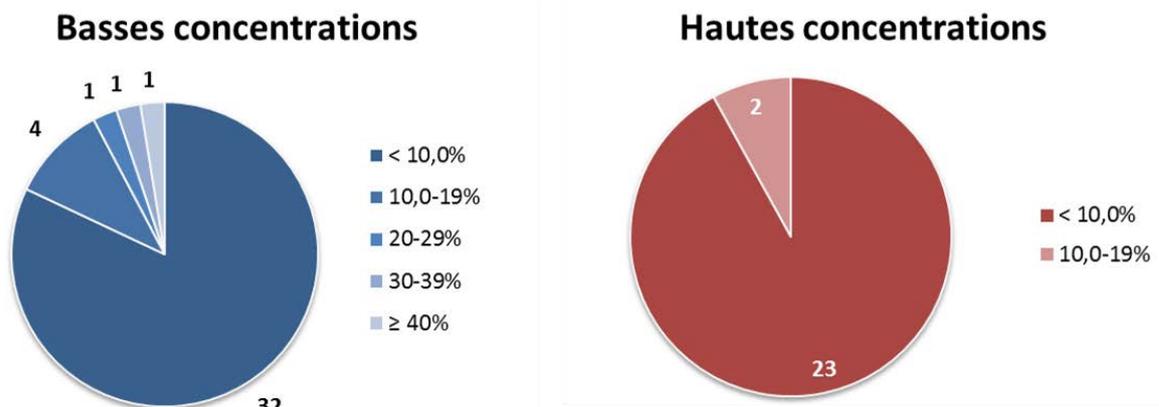


Figure 8 : Perte de substance active sur le système de perfusion par adsorption en fonction de la concentration

[D'après Brimecombe *et al.*, 2009]

En conséquence de ces observations, et même si le phénomène est plus fréquent et plus important en proportion pour de faibles concentrations, il semble important d'étudier la capacité d'adsorption sur le système de perfusion d'une nouvelle substance active, à la fois à une haute et une basse concentration. Cette évaluation doit être réalisée avant le début de l'étude *in vitro*. Une majorité de molécules semblant ne pas y être sensible, un échantillonnage en amont de la perfusion demeure possible. [Brimecombe *et al.*, 2009] En cas de perte par adsorption, une solution envisageable consiste à échantillonner la solution étudiée au niveau de la chambre d'enregistrement. De plus, pour éviter de contaminer l'échantillon par des constituants d'origine cellulaire, certains auteurs recommandent de recueillir l'échantillon à l'extrémité de la pipette de perfusion irrigant la chambre d'enregistrement. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Herron *et al.*, 2004 ; Qu *et al.*, 2011]

1.3. Rôle support de la chimie analytique

Nous pouvons donc identifier quatre grands facteurs capables d'impacter la concentration en substance active apte à interagir avec les canaux hERG : la solubilité, l'adsorption, la stabilité et l'erreur dans la préparation des échantillons. Le développement d'une méthode analytique de dosage permet, d'une part, de mesurer la concentration en substance active dans les formulations issues de l'essai *in vitro*, mais aussi de réaliser les études de stabilité et d'adsorption. Pour s'assurer de la fiabilité des résultats analytiques, il est nécessaire de développer et valider une méthode de dosage précise et répétable. [Herron *et al.*, 2004 ; Qu *et al.*, 2011] Le développement de ces méthodes se heurte cependant à certaines difficultés. Celles-ci dépendent de la molécule étudiée (structure chimique, potentiel inhibiteur...).

La règle des cinq, établie par Lipinski en 1997, définit quatre paramètres physicochimiques d'une molécule permettant d'envisager une administration par voie orale. Parmi eux sont décrits une masse moléculaire inférieure ou égale à 500 Da et une valeur de log P (logarithme du coefficient de partage) n'excédant pas 5. [Lipinski, 2004] Les composés que nous risquons de rencontrer lors du développement non-clinique sont donc de petites molécules, de masse moléculaire inférieure à 500 Da, présentant un caractère lipophile. Ainsi, comme vu au chapitre précédent, 75% des molécules en développement ont une faible solubilité aqueuse. [Di *et al.*, 2012 ; Lipinski, 2004] La limite de solubilité de ces composés dans le milieu hERG risque donc d'être relativement basse et problématique. Pour les composés hydrophiles, le développement d'une méthode est généralement plus aisé car l'analyste est moins confronté à ce problème. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Herron *et al.*, 2004]

Tableau II : Valeurs approximatives de concentration inhibitrice 50 (CI₅₀), de concentration plasmatique maximale thérapeutique (C_{max}) et marge de sécurité correspondante pour un panel de dix molécules anciennement ou actuellement commercialisées.

[Redfern *et al.*, 2003]

	Classe thérapeutique	CI ₅₀	C _{max}	Marge de sécurité
Dofétilide	Anti-arythmique de classe III	10nM	5nM	2
Thioridazine	Neuroleptique (retiré)	30nM	1000nM	0,03
Terfénadine	Antihistaminique (retiré)	80nM	10nM	8
Dompéridone	Antiémétique	200nM	20nM	10
Tamoxifène	Antiœstrogènes	1µM	20nM	50
Kétoconazole	Antifongique	2µM	50nM	40
Fluoxétine	Antidépresseur	3µM	30nM	100
Flecainide	Anti-arythmique de classe Ic	5µM	900nM	6
Clarithromycine	Antibiotique	30µM	2µM	15
Cétirizine	Antihistaminique	100µM	80nM	1250

Par ailleurs, la gamme de concentration étudiée lors de l'essai *in vitro* peut différer considérablement d'une molécule à l'autre en fonction de leur capacité d'inhibition du courant potassique I_{Kr} . Le **tableau II** ci-dessus reporte les valeurs de CI_{50} mesurées pour dix molécules anciennement ou actuellement sur le marché. Nous pouvons ainsi observer que la concentration produisant une inhibition de 50% du courant hERG varie de $0,01\mu\text{M}$ à $100\mu\text{M}$ sur ce panel. [Redfern *et al.*, 2003] Il peut donc être nécessaire, selon le potentiel inhibiteur de la molécule, de descendre à des concentrations très faibles. A titre de comparaison, l'E-4031, un antiarythmique de classe III jamais commercialisé et utilisé comme contrôle positif lors de l'étude *in vitro*, présente une concentration inhibitrice 50 de l'ordre du nM. [Hancox *et al.*, 2008] Une molécule ayant une CI_{50} inférieure à $1\mu\text{M}$ est considérée comme fortement inhibitrice, donc généralement non souhaitable à l'exception des médicaments anti-arythmiques. [Rampe et Brown, 2013]

Un minimum de quatre points est nécessaire pour établir une courbe effet-concentration. [Qu *et al.*, 2011] La méthode développée doit donc permettre de doser toutes les solutions de la gamme étudiée entourant la CI_{50} . [Herron *et al.*, 2004] Pour une valeur de CI_{50} de $1\mu\text{M}$, la plus basse concentration de la gamme serait ainsi de $0,1\mu\text{M}$. De plus, une solution de véhicule seul est également perfusée afin de calculer le pourcentage d'inhibition du courant hERG dû à la matrice de l'échantillon et non à la substance active (cf. chapitre 1.1.2). Cette solution de véhicule ne doit, bien entendu, pas être contaminée par la substance active pour ne pas fausser ce résultat. Nous estimons que la concentration éventuellement mesurée dans cette solution ne doit pas excéder 10% de celle du plus bas point de la gamme. La limite de quantification de la méthode analytique devra donc être dix fois plus basse que la plus petite concentration étudiée (par extension : $0,01\mu\text{M}$ dans le cas d'une CI_{50} de $1\mu\text{M}$). Pour se faire, des méthodes de détection sensibles et sélectives (fluorescence, spectrométrie de masse) sont nécessaires. [Herron *et al.*, 2004]

Lors de la recherche exploratoire, donc en amont du développement non-clinique, il arrive qu'une étude hERG, non soumise aux BPL, soit menée afin d'estimer très tôt le potentiel torsadogène des molécules. [Redfern *et al.*, 2003 ; Yao *et al.*, 2005] En parallèle se sont développés depuis les années 90 des modèles informatiques, basés notamment sur des relations structure-activité, permettant un criblage rapide des molécules dès la phase de recherche exploratoire. Ces méthodes *in silico* se sont progressivement améliorées avec la multiplication des données issues des tests hERG d'électrophysiologie depuis la mise en place de la directive ICH S7B. [Hancox *et al.*, 2008 ; Rampe et Brown, 2013] Au moment de développer la méthode de dosage, l'analyste pourra donc souvent disposer d'une approximation de la CI_{50} permettant de connaître la sensibilité à atteindre et ainsi d'orienter le choix du mode de détection.

Cependant, cette méthode analytique doit être développée, puis validée, alors qu'elle ne sera utilisée que pour une seule étude *in vitro*, donc une seule série d'échantillons. Les études de pharmacologie de sécurité sont, en effet, souvent réalisées en une seule administration. [ICH S7A, 2000] C'est pourquoi nous pensons qu'il est intéressant d'optimiser le temps de développement et, autant que possible, de le réduire. Toutefois, la variabilité des situations

rencontrées rend compliqué la mise en place d'une approche analytique unique. Ainsi, pour les composés à fort potentiel inhibiteur, la principale difficulté est la détection des plus basses concentrations (0,01 μ M, soit de l'ordre du ng/mL). [Herron *et al.*, 2004] A l'opposé, la limite de solubilité est problématique pour les plus hautes concentrations des composés apolaires (30 voire 100 μ M). [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Herron *et al.*, 2004 ; Qu *et al.*, 2011]

Dans la seconde partie de cette thèse, nous allons présenter et évaluer différentes techniques analytiques permettant de quantifier des substances actives dans le milieu physiologique hERG. Une méthode chromatographique peut se diviser en trois grandes étapes : la préparation de l'échantillon, la séparation des composés étudiés et la détection d'un signal proportionnel à la quantité d'analyte dans l'échantillon. [Rouessac et Rouessac, 2009] Dans les échantillons hERG, un composé à caractère plus ou moins apolaire est dissous dans un milieu aqueux constitué uniquement de molécules très polaires : NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, glucose, HEPES et DMSO. Logiquement, les analyses sont généralement menées en chromatographie liquide haute performance (CLHP) à polarité de phase inversée. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Herron *et al.*, 2004] La sensibilité du système va, bien entendu, dépendre du détecteur choisi.

Trois modes de détection sont recensés dans la littérature pour la quantification de substance active en milieu physiologique hERG. Il s'agit de la spectrophotométrie UV, de la fluorescence et de la spectrométrie de masse. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Herron *et al.*, 2004 ; Qu *et al.*, 2011] Ensuite, la séparation chromatographique peut être améliorée par des technologies récentes telles que la chromatographie liquide ultra-haute performance (CLUHP) et les colonnes remplies de particules superficiellement poreuses (SPP). Enfin, le dernier module concernera la préparation des échantillons. En solution, une très faible quantité de substance active est en présence d'autres composés (chlorures, glucose, HEPES) beaucoup plus abondants. On peut donc craindre que les résultats analytiques soient influencés par la composition de la matrice. Ce type d'interférence exige un prétraitement de l'échantillon, consistant à purifier un échantillon avant analyse ou à le concentrer pour faciliter sa détection. L'extraction en phase solide (SPE) est une technique fréquemment utilisée en Bioanalyse. [Herron *et al.*, 2004 ; Rouessac et Rouessac, 2009]

2. MÉTHODES DE DOSAGE

2.1. Détection

Pour analyser les échantillons issus des études hERG, nous avons besoin d'un détecteur robuste, suffisamment sensible pour quantifier des concentrations de l'ordre du ng/mL, mais dont le domaine de linéarité est assez large pour assurer le dosage de solutions plus concentrées (jusqu'à 100 µM). Ces dernières peuvent être éventuellement diluées avant injection. De plus, le mode de détection ne doit pas être impacté par la composition de la matrice, soit un milieu aqueux riche en sels. Enfin, le détecteur doit pouvoir être couplé à la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et ne pas impacter négativement l'efficacité de la séparation chromatographique. Dans la littérature, trois types de détecteurs sont cités pour le dosage des échantillons hERG : l'UV/visible, la fluorescence et la spectrométrie de masse (SM), technique de référence en Bioanalyse. [Herron *et al.*, 2004 ; Swartz, 2010]

2.1.1. Détecteur UV

Les détecteurs UV/visible sont souvent utilisés en couplage à la chromatographie liquide car un grand nombre de molécules pharmaceutiques absorbent dans le proche UV (190-400nm). Ils permettent ainsi la détection de la majorité des substances actives rencontrées lors du développement préclinique. En théorie, ce type de détecteur n'est pas sujet à un effet de matrice par le milieu physiologique hERG. Une purification préalable de l'échantillon n'est donc pas nécessaire. L'analyse quantitative est basée sur la loi de Beer-Lambert qui mesure l'absorbance « A » d'une solution diluée à une longueur d'onde donnée en fonction du coefficient d'absorbance molaire « ε » du composé à cette longueur d'onde, de la largeur « l » de la cellule de mesure et de la concentration molaire « c » du composé. [Rouessac et Rouessac, 2009 ; Swartz, 2010]

$$A = \epsilon.l.c$$

La loi de Beer-Lambert est additive. Le détecteur UV n'est donc pas spécifique et est sujet à de possibles interférences si d'autres composés absorbant en UV sont co-élus. Les études hERG n'impliquent, en général, qu'un seul composé, mais des contaminations externes sont possibles lorsque nous travaillons aux plus basses concentrations. [Rouessac et Rouessac, 2009] Le second frein à l'utilisation du détecteur UV est sa sensibilité limitée. Aussi, il est incertain de réussir à descendre à des concentrations de l'ordre du ng/mL comme l'exige l'analyse des substances actives à fort potentiel inhibiteur. Classiquement, le détecteur UV permet de détecter, au mieux, des quantités de substance active de l'ordre du nanogramme [Swartz, 2010] ; ce qui équivaut, pour un volume d'injection de 20 µL, à une concentration

d'environ 50ng/mL. Cependant, nous verrons plus loin que des approches ont été développées afin d'abaisser cette limite.

La sensibilité du détecteur est, de plus, variable d'un composé à l'autre d'un facteur pouvant atteindre cent fois. [Snyder *et al.*, 1997] Ainsi, il est possible d'atteindre une limite de quantification basse (de l'ordre du ng comme nous venons de le voir) uniquement pour des molécules possédant un maximum d'absorption spécifique à une longueur d'onde bien supérieure au *cut-off* (limite de transparence) de la phase mobile. A l'opposé, la limite supérieure de quantification de la méthode de dosage, qui dépasse rarement 50µg/mL, n'est pas problématique en UV. Elle ne requerra, le cas échéant, qu'une dilution de la solution avant injection. [Rouessac et Rouessac, 2009 ; Swartz, 2010]

On distingue deux types d'instruments : les détecteurs monochromatiques, dont la longueur d'onde d'acquisition est fixe, et les détecteurs à barrette de diodes ou PDA (*photodiode-array*), à longueurs d'onde multiples. Le détecteur UV à simple longueur d'onde est constitué d'une source UV, d'un monochromateur permettant la sélection d'une longueur d'onde déterminée, d'une cellule de mesure dans laquelle circule la phase mobile en sortie de colonne (dont la largeur est généralement de 10 mm) et enfin d'un détecteur optique. Le principe simplifié d'un détecteur UV à simple longueur d'onde est présenté ci-dessous (**Figure 9**). [Rouessac et Rouessac, 2009 ; Swartz, 2010] La phase mobile circule en continu en sortie de la colonne chromatographique et ne subit aucune modification. Cela explique la très bonne répétabilité des détecteurs UV/visible. [Law et Temesi, 2000]

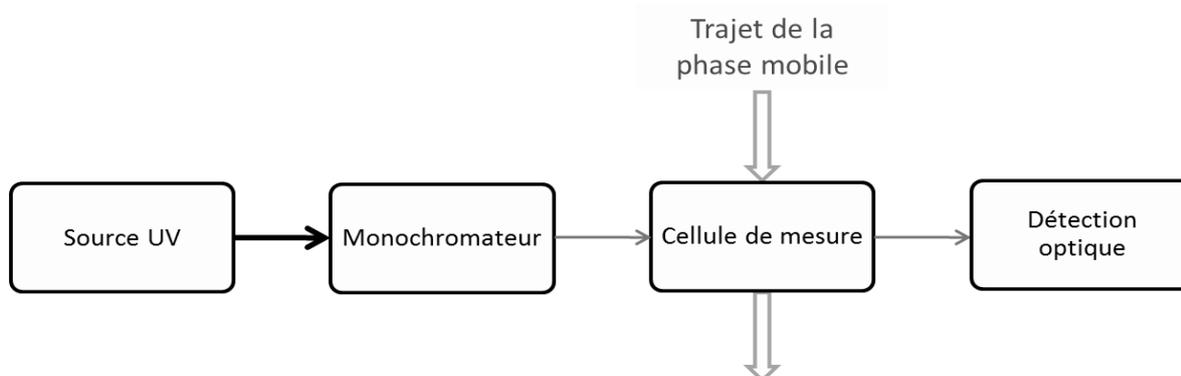


Figure 9 : Schéma simplifié d'un détecteur UV monochromatique
[D'après Rouessac et Rouessac, 2009]

Le détecteur à barrette de diodes (PDA) permet de couvrir tout un domaine de longueurs d'onde sans interrompre la circulation de la phase mobile. Son principe de fonctionnement est présenté dans le schéma ci-dessous (**Figure 10**). La cellule de mesure est éclairée par une source UV, puis la lumière transmise par l'échantillon est diffractée par un réseau dispersif sur un détecteur constitué par une rangée de plusieurs centaines de diodes. Chacune permet de mesurer l'absorbance sur un intervalle étroit de longueur d'onde (1nm). On obtient ainsi un chromatogramme à chaque longueur d'onde du domaine étudié, mais aussi un spectre d'absorption UV à un temps d'élution donné. Ce type de détecteur est donc particulièrement

utile durant le développement de méthode, en particulier pour définir la longueur d'onde d'acquisition optimale pour l'analyse de routine. Les détecteurs PDA modernes offrent une sensibilité comparable aux détecteurs UV monochromatiques. [Rouessac et Rouessac, 2009 ; Swartz, 2010]

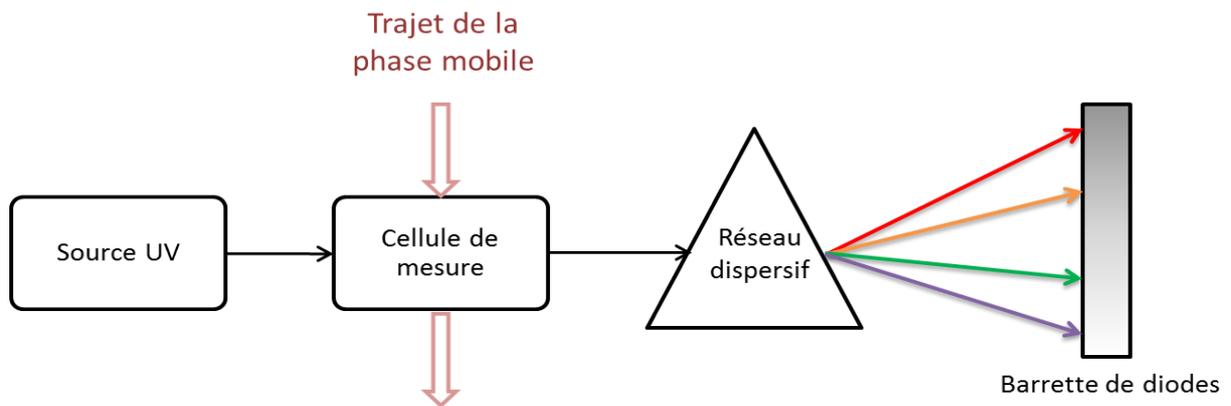


Figure 10 : Schéma simplifié d'un détecteur à barrette de diodes
[D'après Rouessac et Rouessac, 2009]

2.1.2. Détecteur de fluorescence

Pour doser de très faibles concentrations (de l'ordre du ng/mL), la détection UV n'est généralement plus utilisable au contraire de la spectrofluorimétrie. Une sensibilité cent à mille fois plus importante qu'en UV peut ainsi théoriquement être obtenue. [Rouessac et Rouessac, 2009 ; Swartz, 2010] La fluorescence est la capacité qu'ont certains composés de réémettre sous forme de radiations lumineuses une fraction du rayonnement UV auquel ils sont soumis. Le rendement quantique de fluorescence, dont la valeur maximale est 1, désigne la proportion d'énergie réémise sous forme de rayonnement lumineux. La fluorescence d'une molécule peut être directement corrélée à sa rigidité structurale. Ainsi, les molécules cycliques aromatiques produisent la fluorescence la plus intense. Des exemples de molécules fluorescentes sont présentés ci-dessous (**Figure 11**). [Rouessac et Rouessac, 2009] Herron *et al.* ont développé, avec succès, une méthode de dosage des échantillons hERG sur un domaine de 0,5 à 15ng/mL, donc suffisant pour quantifier une concentration de 0,01µM. [Herron *et al.*, 2004]

Le fonctionnement des détecteurs de fluorescence ressemble à celui des détecteurs UV monochromatiques. La longueur d'onde d'excitation, choisie proche d'un maximum d'absorption dans l'UV de la molécule, est sélectionnée par un monochromateur avant d'atteindre la cellule où circule en continu la phase mobile. Un second monochromateur permet de sélectionner une longueur d'onde d'émission, toujours supérieure à celle d'excitation. La fluorescence est observée dans une direction perpendiculaire au rayon excitateur de façon à réduire le bruit de fond généré par celui-ci. [Rouessac et Rouessac, 2009 ; Swartz, 2010]

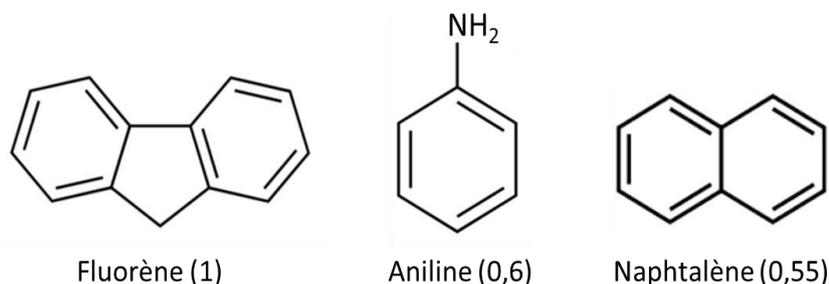


Figure 11 : Exemples de composés fluorescents et de leur rendement quantique de fluorescence

[Rouessac et Rouessac, 2009]

Le faible nombre de composés naturellement fluorescents (moins de 10% des molécules), la sélection de la longueur d'onde d'excitation et de la longueur d'onde d'émission font des spectrofluorimètres des détecteurs sélectifs. Comme dans les détecteurs UV, la phase mobile ne subit aucune modification. Cependant, l'usage du détecteur de fluorescence est plus complexe car le phénomène est source d'erreurs, l'intensité de fluorescence étant dépendante du pH, du solvant et de la température. De plus, l'intensité de fluorescence est différente en chaque point de la solution car une partie du rayonnement est absorbée avant d'atteindre le point considéré, puis une partie du rayonnement émis est piégé de la même façon avant de sortir de la cellule. La répétabilité du signal sera donc moins bonne qu'en détection UV. [Fanali *et al.*, 2013 ; Rouessac et Rouessac, 2009 ; Swartz, 2010]

Ce type de détecteur est utilisable pour les composés naturellement fluorescents, mais aussi pour tous ceux pouvant le devenir par le biais d'une dérivation. Cette réaction chimique consiste à greffer sur l'analyte un réactif possédant un fluorophore. Elle peut être réalisée avant injection (dérivation pré-colonne) ou entre la colonne et le détecteur (dérivation post-colonne). La réaction doit former un dérivé stable, à haut rendement quantique de fluorescence. Cependant, le remplacement d'un groupement fonctionnel du composé (amine primaire, aldéhyde...) par une structure complexe (par exemple une molécule cyclique aromatique) joue sur le temps de rétention du composé et peut altérer l'efficacité de la séparation. De plus, les réactifs en excès, fluorescents, restent en solution et doivent donc être séparés de l'analyte étudié. Enfin, si la réaction de dérivation n'a pas un rendement total, il sera nécessaire d'utiliser un standard interne. Le développement d'une méthode analytique devient donc complexe. [Fanali *et al.*, 2013] Par conséquent, il est préférable de limiter l'utilisation des détecteurs de fluorescence aux composés naturellement fluorescents. La spectrométrie de masse est une meilleure option pour les substances actives inhibitrices du canal hERG non fluorescentes.

2.1.3. Spectrométrie de masse

2.1.3.1. Principe et appareillage

Les couplages chromatographie liquide-spectrométrie de masse (CL-SM) font partie des méthodes d'analyse les plus sensibles en Bioanalyse. Ils permettent la détection de concentrations de l'ordre du ng/mL, comme nous le souhaitons pour le dosage des échantillons hERG. [Li *et al.*, 2013, de Hoffmann et Stroobant, 2007] Le principe d'un spectromètre de masse (SM) repose sur l'action d'un champ électrique ou magnétique sur une particule chargée (**Figure 12**). Cette technique forme des ions à partir de molécules neutres qui sont alors séparés, dans un analyseur, en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La spectrométrie de masse est utilisable pour la majorité des molécules pharmaceutiques, à condition que celles-ci puissent être ionisées. [Arpino, 2007 ; Bouchoux et Sablier, 2005]

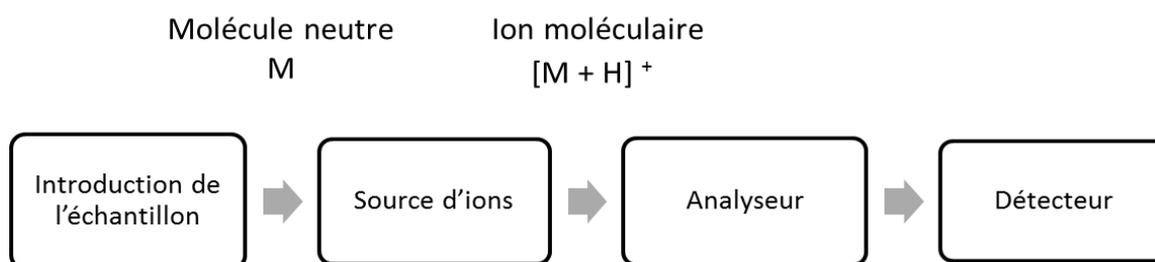


Figure 12 : Schéma simplifié du fonctionnement d'un spectromètre de masse
[D'après Bouchoux et Sablier, 2005]

Cependant, l'interface CLHP/SM est complexe en raison des phases mobiles aqueuses. Leur évaporation entraîne un volume de gaz important qui doit être évacué afin de maintenir un vide dans l'enceinte de l'analyseur. Les sources d'ionisation à pression atmosphérique ont permis de surmonter ces difficultés et équipent tous les spectromètres de masse couplés à la chromatographie liquide. Un système de pompage assure un vide poussé dans l'enceinte du spectromètre de masse, évite la collision des ions formés avec des molécules provenant du gaz résiduel et limite l'impact de molécules parasites sur le détecteur. [Arpino, 2007 ; Rouessac et Rouessac, 2009] L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI), qui s'opèrent en phase gazeuse, sont plutôt réservées aux échantillons volatils. Au contraire, les sources d'ionisation électrospray (ESI), technique pour laquelle le processus d'ionisation se produit en phase liquide, sont applicables à l'analyse de composés polaires, peu volatils ou thermiquement instables, en milieu aqueux. Elles peuvent donc être utilisées pour tous les composés pharmaceutiques que nous pouvons rencontrer lors du développement non-clinique. [Arpino, 2009 ; Monégier, 1997]

Le procédé d'ionisation par électronébulisation est basé sur la formation d'un nébulisat contenant des ions solvatés. L'éluant pénètre dans la source d'ions via un capillaire de silice, puis un champ électrique intense (2 000 à 4 000 volts) charge les gouttelettes formées à son extrémité. Par l'effet d'un gaz inerte (par exemple le diazote N_2) et de la chaleur, le solvant

s'évapore, la taille des gouttelettes diminue et la densité de charge augmente. Lorsque la répulsion électrostatique devient trop forte, les gouttelettes « explosent » en libérant des ions non fragmentés (**Figure 13**). L'électronébulisation en mode positif, majoritairement utilisée, conduit à la formation d'ions protonés, généralement porteur d'une seule charge ($z=1$) dans le cas des petites molécules. [Bouchoux et Sablier, 2005 ; Monégier, 1997 ; Rouessac et Rouessac, 2009]

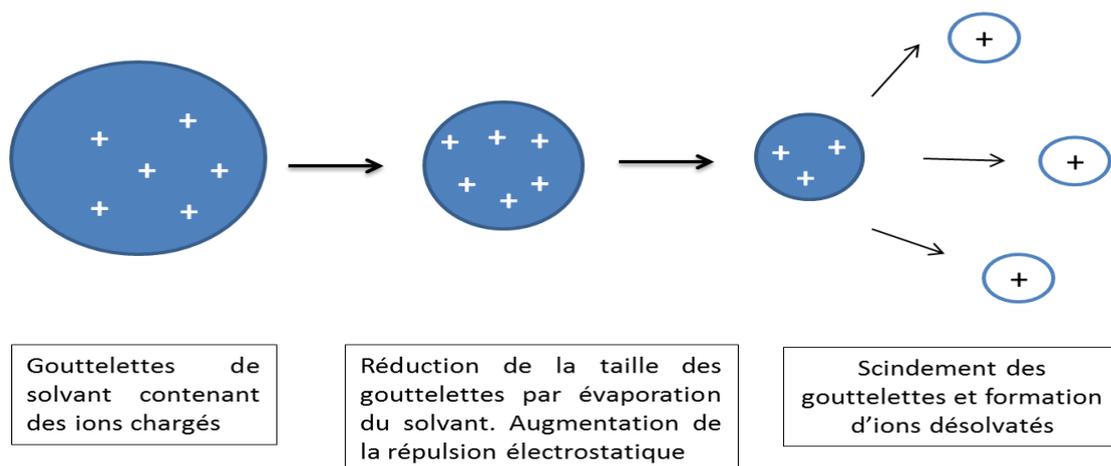


Figure 13 : Principe de l'ionisation électrospray (ESI) et formation d'ions désolvatés
[D'après Monégier, 1997 ; Rouessac et Rouessac, 2009]

Les analyseurs à filtre quadripolaire sont très souvent utilisés dans les détecteurs de masse et sont adaptés à l'analyse quantitative de petites molécules. Ils sont généralement moins encombrants et moins coûteux que les autres spectromètres de masse. L'utilisation d'analyseurs à temps de vol ou de type trappe d'ions est également référencée en couplage à l'ESI, mais davantage dans des études de pharmacocinétique (où la masse des composés doit être déterminée avec une grande précision) et pour l'analyse des macromolécules. Un quadripôle est formé de quatre barres métalliques parallèles (de 5 à 20cm de longueur) raccordées deux à deux. Le tri des ions se fait par un champ électrique. Les barres opposées constituent deux électrodes portées au même potentiel électrique tandis que les potentiels entre deux barres voisines sont opposés. Lorsqu'un ion chargé positivement pénètre dans le quadripôle, il est attiré par les deux barres chargées négativement mais repoussé par les deux barres chargées positivement. En superposant à la tension continue une tension alternative, les ions vont suivre une trajectoire oscillante. En réglant la fréquence du courant alternatif, seuls les ions de rapport masse/charge (m/z) déterminé atteignent le détecteur. [Bouchoux et Sablier, 2005; Rouessac et Rouessac, 2009 ; Zhao et Li, 2014]

Dans les spectromètres de masse en tandem (SM/SM), deux filtres de masses quadripolaires (Q_1 et Q_2) sont montés en série. Une chambre de collision remplie d'un gaz inerte (diazote ou hélium) est placée entre les deux analyseurs. Ainsi, un ion parent (de masse m_1) sélectionné par le filtre Q_1 va heurter une molécule de gaz inerte et se dissocier. L'ion fragment majoritaire (m_2) est alors sélectionné par le quadripôle Q_2 et atteint le détecteur. Par la

sélection de la paire d'ions m_1/m_2 , le triple quadripôle permet une double sélectivité par rapport à un simple quadripôle (**Figure 14**) et, de fait, une meilleure sensibilité. Cependant, son utilisation requiert une optimisation plus longue. [Bouchoux et Sablier, 2005 ; Law et Temesi, 2000 ; Rouessac et Rouessac, 2009] Un spectromètre de masse en tandem (source ESI) permet de détecter des concentrations plus faibles qu'en CL-SM simple, donc inférieures au ng/mL. [Li *et al.*, 2013] Ses performances dépendent toutefois de l'efficacité de l'ionisation, favorisée par la présence d'hétéroatomes dans la structure de la molécule. [Bouchoux et Sablier, 2005] La CL-SM/SM constitue actuellement la méthode de référence en Bioanalyse. En utilisant cette approche pour une analyse d'échantillons en milieu hERG, Herron *et al.* reportent avoir obtenu une sensibilité de 1ng/mL. [Herron *et al.*, 2004]

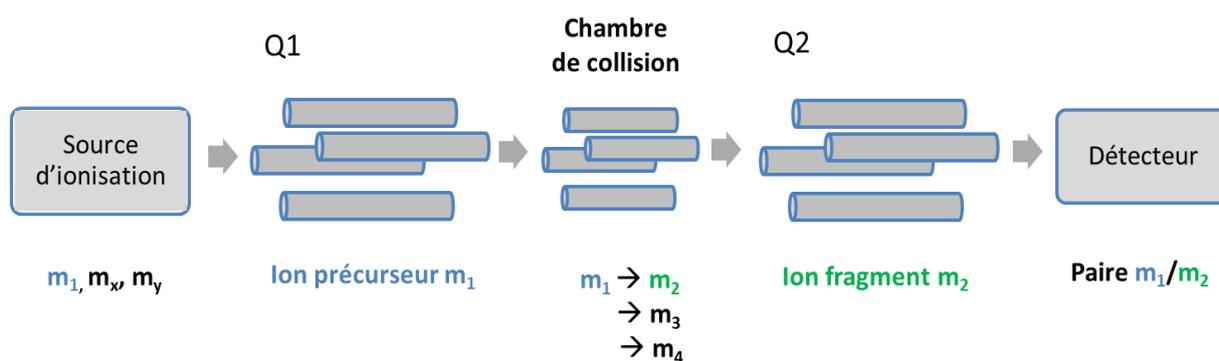


Figure 14 : Schéma d'un spectromètre de masse en tandem (SM/SM) à triple quadripôle [D'après Bouchoux et Sablier, 2005]

2.1.3.2. Limites de la spectrométrie de masse

Comme nous l'avons vu, la spectrométrie de masse présente de multiples avantages pour notre analyse. La configuration comprenant une source d'ionisation de type électrospray et au moins un filtre quadripolaire est applicable à la quantification des petites molécules pharmaceutiques que nous pouvons rencontrer lors des études hERG. Par la haute sensibilité du détecteur et sa spécificité permettant un bruit de fond réduit, il permet de quantifier de très basses concentrations. Enfin, contrairement à la fluorescence, aucune réaction de dérivation n'est nécessaire. [Annesley, 2003 ; Bouchoux et Sablier, 2005]

En revanche, les dosages par CL-SM peuvent présenter un manque de répétabilité. En effet, un spectromètre de masse est un détecteur destructif. Le signal est fonction du flux parvenant au spectromètre via le système d'introduction, du rendement d'ionisation, puis du nombre d'ions ainsi formés parvenant au détecteur après passage d'un ou plusieurs quadripôles. L'ajout d'un standard interne, analogue au produit à doser dans lequel certains atomes sont remplacés par des isotopes stables (^2H , ^{13}C), est un moyen de corriger une répétabilité insuffisante. L'analyte et son analogue marqué ont des masses différentes, ce qui permet de les quantifier séparément bien que leurs temps de rétention soient confondus. Toutefois,

certains appareils modernes présentent une répétabilité suffisante pour permettre un étalonnage externe. [Arpino, 2007 ; Bouchoux et Sablier, 2005]

Par ailleurs, malgré sa sélectivité, la spectrométrie de masse n'est pas exempte de problèmes d'interférences, en particulier par le phénomène de suppression d'ion. L'ionisation par électro-nébulisation y est particulièrement sensible. Cet effet de matrice spécifique peut être provoqué par de nombreuses molécules peu ou non-volatiles (sels, tampon), endogènes ou exogènes (impuretés de solvants, contaminants). Ce phénomène trouve son origine au niveau de la source d'ionisation en impactant la formation et l'évaporation des gouttelettes chargées (cf. **Figure 13**). Il en résulte une diminution de la quantité d'ions formés et, par conséquent, du signal généré. Le degré de suppression est souvent dépendant de la concentration en substance active dans l'échantillon, l'impact étant plus important quand la concentration est plus faible. [Annesley, 2003 ; Antignac *et al.*, 2005] Nous pouvons donc anticiper un effet de suppression d'ion conséquent lors de l'analyse de molécules formulées dans le milieu physiologique hERG. Celui-ci est, en effet, très concentré en sels (8mg/mL de chlorure de sodium) quand les échantillons contiennent au plus 50µg/mL de substance active.

La suppression d'ion affecte aussi la répétabilité de la méthode, car le degré de suppression est variable d'un échantillon à l'autre. L'utilisation d'un standard interne peut ne pas totalement résoudre ce problème. De plus, bien que les sels de la matrice ne soient pas retenus sur une colonne CLHP à polarité de phase inversée, ils sont introduits dans le spectromètre de masse en quantités très supérieures au produit à analyser et représentent un risque majeur d'encrassement de la source d'ionisation. Enfin, le choix et la pureté des solvants et des modificateurs de la phase mobile doit être adapté. [Antignac *et al.*, 2005 ; Arpino, 2007] Par exemple, le formate d'ammonium, un tampon fréquemment utilisé en CLHP, peut provoquer une suppression de signal significative à la concentration relativement faible de 10mM. [Law et Temesi, 2000] Dans la partie expérimentale, nous préférons donc utiliser l'acide formique pour les injections en CL-SM.

Une solution simple pour réduire l'ampleur du phénomène, quand celui-ci est dû à la matrice des échantillons, est de réduire le volume injecté. Une autre idée, rapide et peu coûteuse, est de diluer au préalable l'échantillon dans un solvant organique. Cependant, ces deux solutions réduisent d'un même facteur le signal du composé étudié. Or, la sensibilité constitue déjà un point critique lors du développement des méthodes de dosage des échantillons hERG. De plus, elles ne font qu'atténuer le phénomène. En conséquence, la meilleure approche pour éliminer complètement les effets de suppression d'ion est de purifier préalablement l'échantillon. [Antignac *et al.*, 2005] Les techniques de prétraitement seront discutées au chapitre 2.3.

2.1.4. Choix du mode de détection

Pour le dosage de substances actives en milieu hERG, le mode de détection le plus pratique semble être l'UV. En effet, ce type de détecteur est utilisable pour de nombreuses molécules organiques, simple d'utilisation, assure une bonne répétabilité et ne subit, en théorie, pas d'interférence des constituants du milieu hERG. Une purification de l'échantillon ne serait donc pas nécessaire (**Tableau III**). De plus, l'UV constitue l'alternative la plus économique, à l'achat, puisqu'un CLHP équipé d'un tel détecteur coûte environ 50 000€ quand un spectromètre de masse en tandem équipé d'une source ESI présente un prix de 150 à 200 000€ en entrée de gamme. [Carr, 2013] Malheureusement, la sensibilité des détecteurs UV usuels est limitée (de l'ordre de 50ng/mL pour un volume d'injection de 20µL) et ne permet pas d'atteindre les faibles concentrations nécessaires pour le dosage des composés à fort potentiel inhibiteur. [Herron *et al.*, 2004 ; Swartz, 2010]

Tableau III : Avantages et inconvénients des détecteurs UV, fluorimétriques et des spectromètres de masse pour le dosage des échantillons hERG

	Avantages	Inconvénients
UV	Quasi-universel (pour les petites molécules pharmaceutiques) Non destructif Large domaine de linéarité Pas de prétraitement de l'échantillon	Sensibilité limitée (>10ng/mL) Sensibilité variable selon le composé (d'un facteur 100) Non spécifique
Fluorescence	Sélectif (composés fluorescents) Non destructif Haute sensibilité (\leq ng/mL)	Peu de composés naturellement fluorescents Peut nécessiter une dérivation Domaine de linéarité réduit
Spectrométrie de masse*	Universel (composés organiques ionisables) Spécifique Haute sensibilité : <ul style="list-style-type: none"> • Simple quad. : \geq ng/mL • Tandem : < ng/mL 	Destructif Répétabilité moyenne Domaine de linéarité réduit Suppression d'ion par le milieu physiologique hERG Prétraitement de l'échantillon

* Source ESI et filtre de masse quadripolaire.

Le détecteur de fluorescence est lui très sélectif et permet d'atteindre une limite de quantification cent à mille fois plus basse qu'en UV. [Fanali *et al.*, 2013 ; Swartz, 2010] Une limite de quantification de 0,5ng/mL dans le milieu hERG a ainsi pu être atteinte par cette technique. [Herron *et al.*, 2004] Cependant, peu de composés sont naturellement fluorescents (**Tableau III**). Beaucoup peuvent le devenir par dérivation, mais cette réaction chimique pose de multiples problèmes : stabilité des produits formés, séparation des réactifs résiduels, optimisation de la détection... [Fanali *et al.*, 2013] Pour ces raisons, la spectrofluorimétrie ne paraît pas un bon choix pour le dosage des échantillons issus des essais non-cliniques hERG, à l'exception des molécules naturellement fluorescentes.

Par conséquent, la spectrométrie de masse, applicable à tous les molécules ionisables, apparaît comme la meilleure approche pour l'analyse des composés à fort potentiel inhibiteur du courant I_{Kr} . Le phénomène de suppression d'ion, causé par la forte présence de sels dans l'échantillon, peut être corrigé par un traitement préalable à l'analyse chromatographique. De plus, l'utilisation d'un standard interne peut compenser à la fois les pertes durant l'étape de purification et le manque de répétabilité du détecteur. [Arpino, 2007 ; Law et Temesi, 2000] Dans la littérature, au cours de la dernière décennie, la détection UV [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Goineau *et al.*, 2014 ; Qu *et al.*, 2011 ; Rast et Guth, 2014] et la spectrométrie de masse en tandem [Herron *et al.*, 2004 ; Qu *et al.*, 2011] ont été très majoritairement utilisées pour l'analyse des échantillons issus des études hERG. Au contraire, la fluorescence et la spectrométrie de masse simple ne sont citées, chacune, qu'une seule fois. [Herron *et al.*, 2004]

Cependant, plusieurs approches sont envisageables, à plusieurs étapes du processus analytique (préparation des échantillons, injection, séparation chromatographique, détection), pour augmenter la sensibilité de la détection UV et limiter le recours à la spectrométrie de masse en tandem. En premier lieu, lors du traitement des échantillons, des procédés permettent de concentrer l'extrait en solution. Une technique souvent citée en Bioanalyse est l'extraction en phase solide (SPE) que nous aborderons au chapitre 2.3. Par ailleurs, au niveau de l'injecteur, une idée évidente pour abaisser la limite de quantification serait d'augmenter le volume d'injection. Cependant, une bande d'élution trop large peut fortement affecter l'efficacité de la séparation chromatographique, produisant un pic plus large, voire la génération d'une seconde bande d'élution, menant à un dédoublement du pic. Nous reviendrons plus en détail sur la problématique de l'efficacité dans le chapitre suivant. [Snyder *et al.*, 1997]

Une autre approche envisagée concerne directement le détecteur. Comme nous l'avons vu précédemment, l'analyse quantitative en UV repose sur la loi de Beer Lambert ($A = \epsilon.l.c$). L'idée développée par plusieurs fournisseurs consiste donc à allonger le trajet optique à travers l'éluant dans la cellule de mesure (cf. **Figure 9** au chapitre 2.1.1). Classiquement, les détecteurs UV utilisés en CLHP ont un trajet optique de 10mm. Cependant, au moins quatre fournisseurs (Agilent, Perkin Elmer, Shimadzu, Waters) proposent des cellules de mesure à long trajet optique afin d'augmenter l'intensité du signal. La longueur du trajet optique atteint ainsi 85mm dans le modèle SPD-M30A de Shimadzu. [shimadzu.com] Pour sa part, Agilent propose une cellule de 60mm (1200 Infinity Series DAD). Selon le dossier technique de ce

dernier détecteur, un abaissement par trois de la limite de détection est possible. [chem.agilent.com]

Un troisième fabricant (Perkin Elmer) propose un détecteur à cellules de 10 et 50mm aisément interchangeables (Flexar PDA Plus Detector), permettant de travailler sur un large domaine de concentrations avec un seul appareil. Selon ce fournisseur, la limite de quantification peut être abaissée de quatre fois avec un trajet optique de 50mm, par rapport au même détecteur équipé d'une cellule de 10mm. De plus, la limite supérieure du domaine de linéarité ne serait diminuée que d'un facteur deux. [perkinelmer.com] Pour conclure ce chapitre, les différentes approches proposées pour augmenter la sensibilité sont rassemblées dans le **tableau IV** ci-dessous. Les méthodes concernant la séparation, également applicables à la spectrométrie de masse, sont abordées au prochain chapitre.

Tableau IV : Approches permettant d'augmenter la sensibilité en CLHP-UV

Etape	Principe	Techniques	Limites
Préparation (chapitre 2.3)	Préconcentrer les échantillons	Extraction en phase solide (SPE)	Pertes de produit Allongement du temps d'analyse
Injection	Augmenter le volume d'injection	Seringue et boucle d'injection de plus grand volume	Capacité de la colonne Déformation du pic
Séparation (chapitre 2.2)	Améliorer l'efficacité pour augmenter le rapport signal/bruit	Systèmes ultra-haute performance Technologies de colonne	Capacité de la colonne Contre-pression générée
Détection	Allonger le trajet optique	Cellules à long trajet optique	Dispersion de la bande d'élution Elargissement du pic

2.2. Séparation

2.2.1. Efficacité et modèle des plateaux théoriques

Dans l'analyse des échantillons hERG, le rôle principal de la chromatographie est d'isoler la substance active des composés hydrophiles de l'échantillon pour permettre sa quantification. Le choix du système chromatographique doit, bien sûr, être compatible avec le mode de détection choisi. A l'intérieur de la colonne chromatographique, les analytes en solution dans la phase mobile peuvent être représentés par une bande d'élution progressant à travers la phase stationnaire en direction du détecteur. A mesure que le composé migre, cette bande s'élargit. Une bande d'élution fine et régulière donnera un pic fin et bien gaussien sur le chromatogramme alors qu'une séparation chromatographique de faible efficacité se traduira par une dispersion de la bande d'élution, et par conséquent un élargissement du pic sur le chromatogramme. [Caude et Jardy, 1994 ; Rouessac et Rouessac, 2009] Améliorer l'efficacité de la séparation chromatographique a donc pour but d'obtenir des pics plus fins. Si l'aire du pic reste constante, le rapport hauteur/surface augmente, d'où une majoration du rapport signal/bruit de fond (**Figure 15**) et une meilleure sensibilité de la méthode chromatographique. [Sanchez *et al.*, 2012 ; Walter et Andrews, 2014]

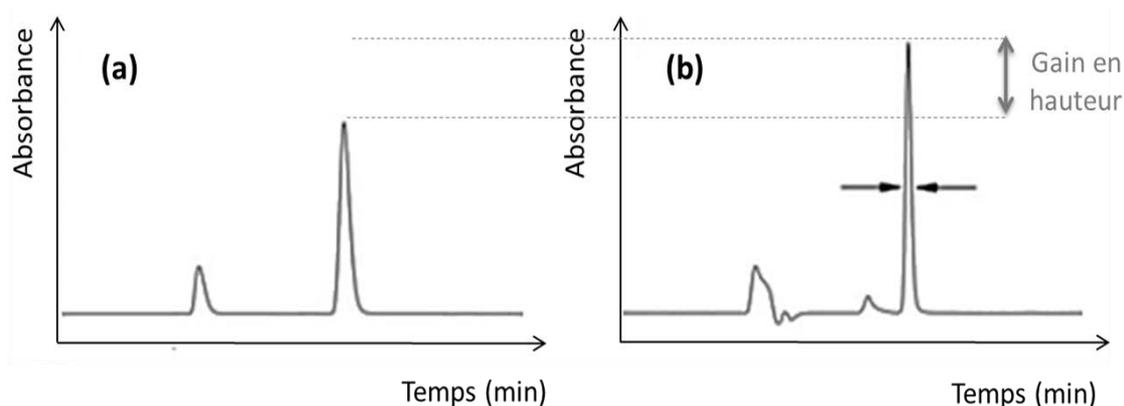


Figure 15 : Affinement du pic chromatographique par amélioration de l'efficacité de la séparation (b). L'aire du pic est identique en (a) et en (b).

[D'après Sanchez *et al.*, 2012]

Selon la théorie des plateaux, la colonne chromatographique est découpée en N disques fictifs de même hauteur, appelés plateaux théoriques. Ainsi, le déplacement du soluté dans la colonne se décompose en une succession d'équilibres entre la phase mobile et la phase stationnaire. La hauteur équivalente à un plateau (H) se calcule en divisant la longueur (L) de la colonne par le nombre de plateaux théoriques. Pour les colonnes de chromatographie liquide, on utilise souvent la notion de hauteur de plateau réduite (h), adimensionnelle, qui permet de comparer des colonnes remplies avec des particules de dimensions différentes. [Caude et Jardy, 1994 ; Rouessac et Rouessac, 2009]

$$h = \frac{H}{d_p} = \frac{L/N}{d_p}$$

Les principaux facteurs entrant en jeu dans le phénomène de dispersion de la bande d'élution sont repris dans l'équation de Knox, établie en 1977. Ils sont responsables de l'élargissement du pic chromatographique. La vitesse linéaire (u) d'écoulement de la phase mobile à travers la phase stationnaire (en mm/s) est proportionnelle à son débit. Elle est considérée constante sur toute la longueur de la colonne. [Rouessac et Rouessac, 2009 ; Snyder *et al.*, 1997]

$$h = Au^{1/3} + B/u + Cu$$

Le terme A, appelé anisotropie d'écoulement ou diffusion d'Eddy, traduit l'existence, pour la phase mobile, de plusieurs chemins possibles à travers le lit de particules de la phase stationnaire. En effet, celles-ci sont généralement de taille irrégulière. Ces différentes vitesses de progression des molécules entraînent un élargissement de la bande d'élution. L'ampleur du phénomène dépend de l'homogénéité du remplissage et de l'uniformité de répartition des tailles des particules de la phase stationnaire. L'anisotropie d'écoulement est peu impactée par la vitesse linéaire. [Caude et Jardy, 1994 ; Rouessac et Rouessac, 2009]

Le terme B correspond à une diffusion longitudinale des molécules. Le soluté se disperse dans la phase mobile, dans l'axe de la colonne, selon son gradient de concentration. Ce phénomène augmente avec le temps d'élution du soluté, lui-même inversement proportionnel à la vitesse linéaire de la phase mobile. La dispersion de la bande d'élution peut aussi être extra-colonne : boucle d'injection, cellule de mesure du détecteur, canalisations menant la phase mobile de l'injecteur à la colonne chromatographique, puis de cette dernière au détecteur. La diffusion longitudinale peut donc être réduite en augmentant le débit de la phase mobile, mais aussi en réduisant le volume extra-colonne. [Caude et Jardy, 1994 ; Snyder *et al.*, 1997]

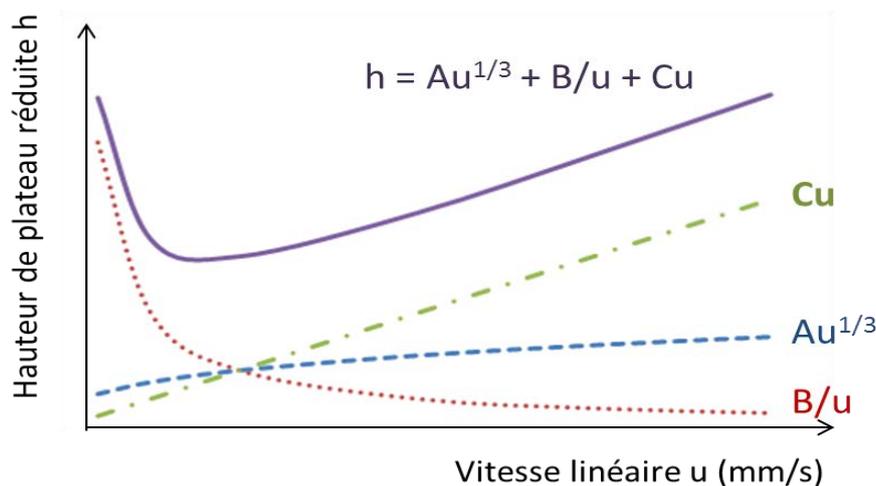


Figure 16 : Représentation graphique de l'équation de Knox et contribution des termes A, B et C en fonction de la vitesse linéaire.

[D'après Caude et Jardy, 1994 ; Rouessac et Rouessac, 2009]

Enfin, la constante C se rapporte au transfert de masse entre la phase stationnaire et la phase mobile. Les particules de la phase stationnaire sont poreuses afin d'augmenter la surface de contact avec la phase mobile contenant l'analyte. A l'intérieur de ces pores, une partie des molécules est ralentie. Pendant ce temps, les molécules de soluté non retenues parcourent une distance proportionnelle à la vitesse linéaire de la phase mobile. Ces différences entraînent un élargissement de la bande d'éluion. Le transfert de masse peut être atténué par une réduction du débit de la phase mobile et par une diminution de la taille des particules (pores moins profonds). [Caude et Jardy, 1994 ; Rouessac et Rouessac, 2009 ; Snyder *et al.*, 1997] La représentation graphique de l'équation de Knox (**Figure 16**) montre l'existence d'un débit optimal pour obtenir la meilleure efficacité, offrant un compromis entre la diffusion longitudinale (B) et le transfert de masse (C). [Caude et Jardy, 1994]

2.2.2. Chromatographie liquide ultra-haute performance

Au vu de l'équation de Knox, l'approche la plus évidente pour augmenter l'efficacité de la séparation chromatographique consiste à utiliser des particules de plus faible diamètre. L'effet est positif sur l'anisotropie d'écoulement (A) et le transfert de masse (C) sans impacter la diffusion longitudinale. Cependant, l'utilisation de particules de diamètre inférieur à 2µm engendre une contre-pression trop importante pour les appareils de CLHP car celle-ci est inversement proportionnelle au carré du diamètre des particules. Ce phénomène est quantifiable par la loi de Darcy, donnant la perte de charge (ΔP) entre l'entrée et la sortie de la colonne chromatographique en fonction de la résistance à l'écoulement (Φ , dépendant du remplissage de la colonne), de la viscosité de la phase mobile (η), de la longueur de la colonne (L), de la vitesse linéaire (u) de la phase mobile et du diamètre des particules (d_p) remplissant la colonne. [Guillarme, 2014 ; Walter et Andrews, 2014]

$$\Delta P = \Phi \frac{\eta \cdot L \cdot u}{d_p^2}$$

Les pompes des systèmes CLHP traditionnels, limitées à environ 400 bars, autorisent l'utilisation de particules d'un diamètre minimum de 2,5µm. En conséquence, les industriels ont développé, au cours de la dernière décennie, des appareils à très haute pression, appelés chromatographes liquide ultra-haute performance (CLUHP). Tous les fournisseurs ont mis au point leur système chromatographique permettant de générer une pression de 1000 à 1300 bars : Acquity UPLC de Waters, Nexera UHPLC de Shimadzu, 1290 Infinity LC Systems d'Agilent, Flexar UHPLC de Perkin Elmer... Ces appareils permettent l'utilisation de particules de très petite taille, soit jusque 1,7µm. Pour de plus petits diamètres, la contre-pression est trop importante pour les instruments aujourd'hui commercialisés. [Guillarme, 2014 ; Walter et Andrews, 2014]

Par ailleurs, selon la loi de Darcy, la pression est diminuée en réduisant la taille de la colonne chromatographique. Les colonnes de CLUHP sont donc, en général, plus courtes. La

réduction du volume interne atteint près de 80% en passant d'une colonne classique de CLHP de dimensions 75*4,6mm à une colonne de 50mm de longueur pour un diamètre interne de 2,1mm. En conséquence, le temps d'analyse et la consommation de solvant sont réduits par rapport à la CLHP traditionnelle. En contrepartie, le système est davantage sujet à une dispersion extra-colonne de la bande d'élution (terme B de l'équation de Knox). Pour cette raison, le volume d'injection doit être réduit d'un même facteur que le volume de la colonne pour éviter une surcharge de celle-ci et une déformation du pic. De même, le volume extra-colonne est lui aussi réduit afin de minimiser la diffusion longitudinale. L'augmentation de l'efficacité n'est ainsi pas uniquement due à la réduction de la taille des particules. [Guillarme, 2014 ; Walter et Andrews, 2014]

En parallèle, la cellule de mesure du détecteur doit être de faible volume afin de ne pas disperser l'étroite bande d'élution générée en amont. [Snyder *et al.*, 1997 ; Walter et Andrews, 2014] A titre d'exemple, dans la partie expérimentale de cette thèse, nous utiliserons deux détecteurs UV de marque Waters. Le détecteur 2487, utilisé classiquement en CLHP, possède une cellule de mesure dont le volume est de 10 μ L. En revanche, pour son équivalent adapté à la chromatographie ultra-haute performance (Acquity TUV), ce volume a été optimisé à 0,5 μ L pour un même trajet optique de 10mm. En conséquence, une analyse en CLUHP sera davantage sujette à la dispersion post-colonne de la bande d'élution dans une cellule UV à long trajet optique. [Guillarme, 2014] D'après les fournisseurs que nous avons contacté, ces détecteurs sont, malgré cela, utilisables en CLUHP mais le gain en sensibilité sera inférieur à ce qui est observé en couplage à la CLHP.

La chromatographie liquide ultra-haute performance présente également un grand intérêt quand elle est couplée à la spectrométrie de masse. En effet, il est intéressant de pouvoir réduire le volume d'échantillon injecté sans impacter la sensibilité afin de diminuer la quantité de véhicule aqueux, contenant potentiellement des impuretés, atteignant le détecteur. Par ailleurs, la vitesse linéaire (u) étant plus importante en CLUHP, un débit de phase mobile plus faible n'impacte pas significativement l'efficacité. La spectrométrie de masse, en particulier l'électronébulisation, en tire profit. En effet, la quantité de solvant à évaporer, génératrice de bruit de fond, est réduite, ce qui favorise l'ionisation des composés étudiés. [Guillarme, 2014 ; Law et Temesi, 2000]. De Hoffmann et Stroobant avancent même que, au-delà d'un débit de 0,5mL/min, la sensibilité du spectromètre de masse diminue. [de Hoffmann et Stroobant, 2007]

Cependant, un frein à l'utilisation des détecteurs de masse est la dispersion extra-colonne. Le volume post-colonne est en effet plus grand que pour les détecteurs optiques (UV, fluorescence) et peut être encore allongé par la présence en amont d'un détecteur UV ou d'une vanne différentielle. Law et Temesi reportaient ainsi, en 2000, pour un simple quadripôle, une longueur de canalisation post-colonne de 1m ! [Law et Temesi, 2000] Sur un tel couplage CLHP-SM (simple quadripôle), une méthode de dosage des échantillons hERG permettait d'obtenir une sensibilité de 10ng/mL. [Herron *et al.*, 2004]

Pour profiter des avantages du couplage à la CLUHP, le spectromètre de masse doit donc minimiser la dispersion post-colonne et posséder une fréquence d'acquisition suffisante pour dessiner des pics très fins. Ainsi, de nombreux fournisseurs proposent aujourd'hui des spectromètres de masse à haute fréquence d'acquisition, intégrables à leur système CLUHP (Waters Acquity QDa, Agilent 6100 Series Single Quadrupole, Flexar SQ 300 MS de Perkin Elmer, LCMS-2020 de Shimadzu). Ces détecteurs de masse répondent, de plus, à une demande de certains laboratoires pour des appareils plus intuitifs, requérant un minimum d'optimisation, robustes et répétables. Ces spectromètres ont permis d'augmenter de façon conséquente la sensibilité des appareils à simple quadripôle. Il apparaît ainsi que des concentrations de l'ordre du ng/mL, soit la limite basse de quantification que nous visons en support des études hERG, sont atteignables par CLUHP-SM. [Zhao et Li, 2014] Ces appareils récents ne contournent pas néanmoins l'obligation de purifier l'échantillon pour éviter l'effet de suppression d'ion causé par le milieu physiologique.

2.2.3. Particules superficiellement poreuses

La CLUHP n'est pas la seule technique permettant d'améliorer le rapport hauteur/surface du pic (cf. **Figure 15**). Récemment ont été développées des colonnes chromatographiques remplies de particules superficiellement poreuses (SPP). Contrairement aux colonnes habituellement employées, les particules SPP sont constituées d'un noyau solide (*core*) non-poreux entouré d'une enveloppe (*shell*) poreuse (**Figure 17**). On peut donc trouver l'appellation de colonnes « *core-shell* ». Cette technologie (relativement ancienne) est en plein essor depuis 2007 avec l'introduction de particules superficiellement poreuses de 2,7 μ m de diamètre offrant une alternative à la chromatographie ultra-haute performance, sans la nécessité de travailler à très haute pression. Il est ainsi possible d'atteindre une efficacité proche de celle obtenue avec des particules de taille inférieure à 2 μ m, à une pression compatible avec les systèmes chromatographiques conventionnels (CLHP). L'efficacité des séparations chromatographiques peut être augmentée de 30 à 50% par rapport à une colonne traditionnelle (particules entièrement poreuses) de mêmes dimensions. [Guillarme, 2014 ; Walter et Andrews, 2014]

L'hypothèse de base était que les pores de ces particules étant moins profonds, puisque superficiels, les composés les plus retenus seraient moins ralentis par rapport aux composés ne pénétrant pas dans les pores, limitant donc l'élargissement de la bande d'élution. [Guillarme, 2014 ; Walter et Andrews, 2014] Gritti et Guiochon n'ont cependant pas observé d'amélioration au niveau de la résistance au transfert de masse (terme C), initialement mis en avant, en ce qui concerne les petites molécules (cas de notre étude). En revanche, ils ont démontré une réelle diminution de l'anisotropie d'écoulement (terme A). Deux explications sont avancées. Premièrement, les particules superficiellement poreuses présentent une variabilité de leur diamètre de seulement 5% contre environ 20% pour les colonnes à particules entièrement poreuses. Deuxièmement, les colonnes sont remplies de façon plus homogène, réduisant les différences de vitesse d'élution entre le centre et les bords de la

colonne. Cette étude a toutefois confirmé une augmentation de l'efficacité de l'ordre de 30%. [Gritti et Guiochon, 2012]

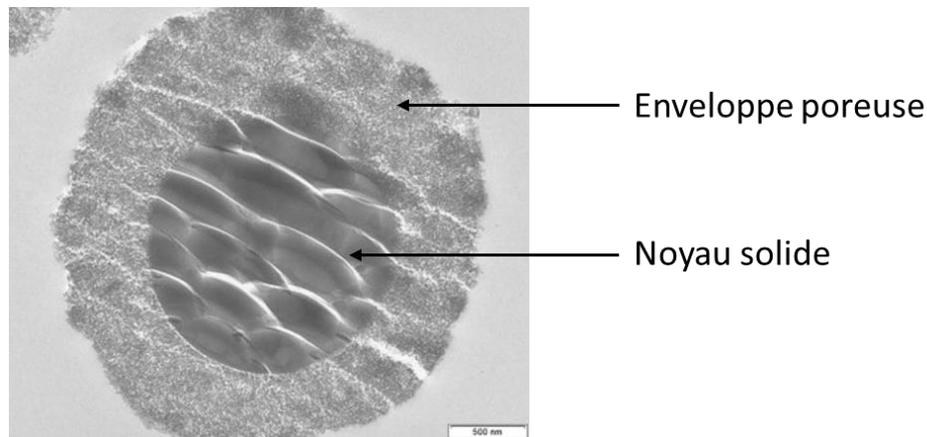


Figure 17 : Vue d'une particule superficiellement poreuse (2,7 μm) par microscopie électronique à transmission

[Walter et Andrews, 2014]

Les principaux fabricants ont développé leur gamme de colonnes utilisant la technologie des particules superficiellement poreuses, tels Agilent (gamme Poroshell), Phenomenex (Kinetex), Thermo Scientific (Accucore) ou Waters (Cortecs). Tous proposent dans leur éventail des particules de 2,6 μm (ou 2,7 μm) pour les colonnes en phase inverse. Par ailleurs, en plus de constituer une alternative à la CLUHP, des fournisseurs ont mis au point des colonnes contenant des particules à noyau solide de diamètre inférieur à 2 μm dans l'idée d'associer les performances de la chromatographie à très haute pression à celles des particules superficiellement poreuses (Kinetex 1,7 μm de Phenomenex, Cortecs 1,6 μm de Waters). Une augmentation de l'efficacité de 20 à 40% par rapport aux colonnes de CLUHP à particules poreuses de mêmes dimensions est avancée. Cette technologie, disponible pour les séparations en phase inverse, est appelée à se développer dans les prochaines années. Ainsi, Phenomenex propose des colonnes à particules SPP de seulement 1,3 μm mais celles-ci se heurtent encore au problème de la très forte contre-pression générée. [Walter et Andrews, 2014]

2.2.4. Couplage aux méthodes de détection

Au vu des technologies présentées dans ce chapitre et de leurs bénéfiques attendus, nous avons retenu trois approches permettant d'augmenter la sensibilité des méthodes chromatographiques dans le but de quantifier des concentrations en substance active de l'ordre du ng/mL. Une première idée est de travailler en CLUHP, sur des colonnes à particules entièrement ou superficiellement poreuses de diamètre 1,7 μm . Cette approche permet une analyse plus rapide, et une plus faible consommation de solvant qu'en CLHP. Cependant, le système est davantage sensible à la dispersion extra-colonne et empêche une

utilisation optimale des détecteurs UV à long trajet optique. De plus, les équipements (système chromatographique, colonnes) représentent un investissement plus important qu'en CLHP traditionnelle. [Guillarme, 2014] Selon notre fournisseur, le prix d'un système CLUHP (avec détecteur UV) est d'environ 75 000€ tandis que celui d'un CLHP n'est que de 50 000€.

La seconde approche, la plus économique à l'achat, consiste à utiliser une colonne à particules superficiellement poreuses (2,6µm) sur une chaîne CLHP classique. Le volume plus important du système permet de diminuer l'impact de la dispersion extra-colonne par rapport aux colonnes de faible diamètre interne utilisées en CLUHP. Par conséquent, nous pouvons utiliser une cellule de détection UV à long trajet optique pour augmenter la sensibilité. Cette approche a été proposée par Agilent pour des opérations de validation de nettoyage sur cinq composés pharmaceutiques aromatiques. En comparaison à une cellule de trajet optique de 10mm, la cellule de 60mm permet une diminution par trois à quatre de la limite de quantification (LQ). Pour deux de ces molécules, une LQ de 5ng/mL (10 à 30ng/mL pour les autres), donc proche de la sensibilité maximale requise pour le dosage des composés à fort potentiel inhibiteur hERG, a été calculée. [Lateef *et al.*, 2014] Cette approche nécessite cependant un temps d'analyse plus long (estimé à environ quatre fois par Carr) par rapport à la CLUHP-UV. [Carr, 2013]

Enfin, une meilleure sensibilité peut être obtenue par le couplage de la chromatographie ultra-haute performance à la spectrométrie de masse. Nous faisons le choix d'un simple quadripôle intégrable au système CLUHP en raison de sa dispersion extra-colonne plus faible, de sa simplicité d'utilisation et de son coût réduit par rapport aux autres spectromètres (triple quadripôle, temps de vol...). Selon notre fournisseur, ces détecteurs de masse intuitifs représentent un investissement légèrement supérieur à 50 000€ quand le prix d'un spectromètre de masse triple quadripôle (source ESI) est au minimum de 180 000€ et peut atteindre 400 000€ pour les plus perfectionnés.

Le couplage CLUHP-SM permet d'affiner le pic chromatographique, de réduire le débit de phase mobile et de diminuer le volume d'injection dans le but de réduire les interférences et le bruit de fond. [Guillarme, 2014 ; Zhao et Li, 2014] La note d'application d'Agilent aborde aussi cette approche et démontre une limite de quantification de 0,5ng/mL pour les cinq composés pharmaceutiques aromatiques avec une très bonne répétabilité (le coefficient de variation n'excède pas 5,0%). [Lateef *et al.*, 2014] Bien que ne disposant pas de donnée relative aux études hERG, nous pouvons cependant supposer que le couplage CLUHP-SM (simple quadripôle) est suffisant pour assurer le dosage des échantillons hERG, même les plus faiblement concentrés (ng/mL). Cependant, le coût des équipements reste plus important qu'un simple détecteur UV et les échantillons nécessitent toujours d'être purifiés en amont.

2.3. Préparation des échantillons

En spectrométrie de masse, le phénomène de suppression d'ion causé par le milieu physiologique exige un prétraitement des échantillons. Nous avons vu au chapitre 2.1.3 que cet effet de matrice dû aux substances non-volatiles du milieu hERG pourrait être partiellement corrigé par une dilution préalable de l'échantillon dans un véhicule approprié (tel un mélange eau/solvant organique). Cependant, cette opération ne fait que diminuer la teneur en sels. De plus, elle oblige à abaisser d'un même facteur la limite de quantification de la méthode chromatographique. [Antignac *et al.*, 2005] Or, comme nous l'avons déjà souligné, la limite de quantification est un point critique pour le développement des méthodes de dosage des échantillons hERG.

Contrairement à de nombreuses méthodes bioanalytiques, le véhicule des échantillons est dépourvu de protéines et est uniquement constitué de composés très hydrophiles (chlorures, glucose, HEPES, DMSO). La substance active est ainsi la seule molécule à caractère moyennement ou fortement apolaire. Cela constitue un avantage conséquent dans l'optique de développer une méthode de prétraitement rapide et fiable, impliquant un minimum d'étapes intermédiaires (dilutions, transferts, évaporation) qui sont autant de sources potentielles de perte de composé ou de contamination de l'échantillon. [Pichon, 2006] Pour le dosage de formulations très peu concentrées, la préparation des échantillons exige ainsi beaucoup de soin pour éviter une contamination externe. Par exemple, la verrerie et les réactifs peuvent contenir des composés à une concentration égale ou supérieure à celle de la substance active (impuretés de solvants, traces de détergents utilisés pour le lavage de la verrerie). [Rouessac et Rouessac, 2009]

2.3.1. Extraction en phase solide (SPE)

L'extraction en phase solide est utilisée fréquemment en Bioanalyse pour purifier un échantillon apolaire dans une matrice aqueuse, ce qui est le cas des molécules pharmaceutiques diluées dans le milieu physiologique hERG. Ce procédé a remplacé la méthode traditionnelle d'extraction liquide/liquide qui est moins rapide, consomme davantage de solvant et offre un rendement et une reproductibilité limités. [Rouessac et Rouessac, 2009] Comme la CLHP, la SPE est basée sur la distribution des composés entre deux phases ; ici une phase liquide (la matrice de l'échantillon) et une phase solide (l'adsorbant). Pour les analyses en spectrométrie de masse, l'intérêt majeur de l'extraction en phase solide est d'éliminer les composés polaires non volatils du milieu hERG générant la suppression d'ion. Pour la détection UV, non soumise à cet effet de matrice, l'objectif est de préconcentrer l'échantillon afin de corriger le manque de sensibilité éventuel du détecteur. [Pichon, 2006]

Traditionnellement, l'extraction en phase solide est réalisée sur une petite cartouche en matière plastique (de quelques millilitres) ressemblant à un corps de seringue et contenant l'adsorbant solide. Ce type de conditionnement est toujours utilisé mais nous verrons que

d'autres formats sont proposés. Des cuves munies d'un système d'aspiration sous vide permettent de traiter un grand nombre d'échantillons simultanément. En pratique, après conditionnement de l'adsorbant par un solvant organique, puis un passage d'eau purifiée, un volume défini d'échantillon est déposé dans la cartouche, puis entraîné à travers l'adsorbant par aspiration (**Figure 18**). Le procédé consiste, dans un premier temps, à retenir sur l'adsorbant le composé d'intérêt et à éliminer, par rinçage par un solvant aqueux, les constituants indésirables pour la suite de l'analyse (les sels, le glucose, le tampon HEPES et le DMSO). Dans un second temps, la substance active est éluée à l'aide d'une quantité suffisante de solvant organique (par exemple l'acétonitrile ou le méthanol). [Pichon, 2006 ; Rouessac et Rouessac, 2009]

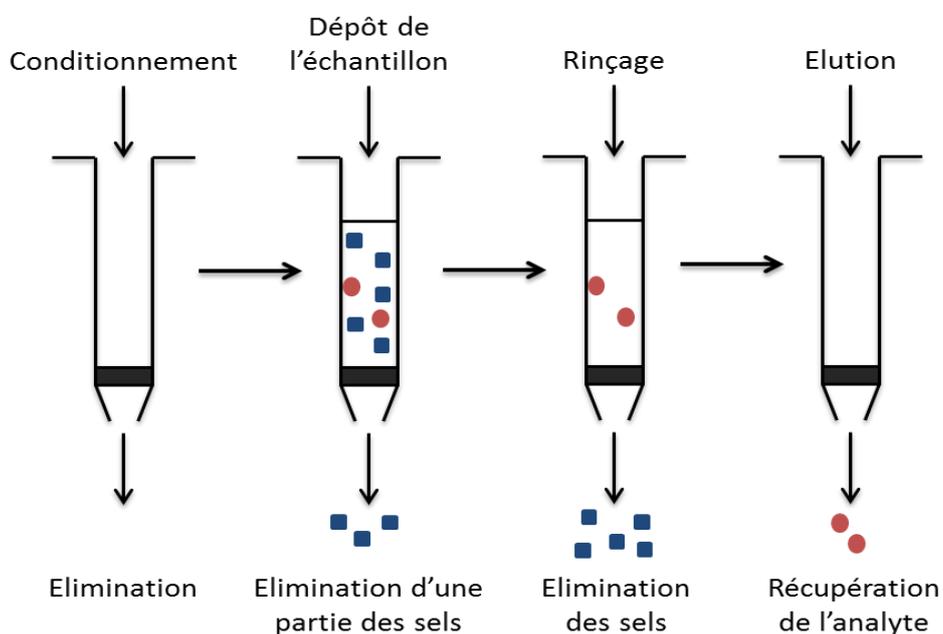


Figure 18 : Principe de l'extraction en phase solide pour la purification des échantillons hERG

[D'après Pichon, 2006]

Le volume nécessaire à l'éluion du composé dépend de la force éluante du solvant et de l'intensité de l'interaction entre l'analyte et le support. Un volume d'éluion plus faible que le volume d'échantillon déposé permet une concentration de celui-ci. [Pichon, 2006] Cependant, il n'est pas toujours possible d'injecter un échantillon dans un solvant entièrement organique en CLHP à polarité de phase inversée. Il existe, en effet, un fort risque de déformation du pic chromatographique lorsque le composé a plus d'affinité pour le véhicule que pour la phase mobile. [Snyder *et al.*, 1997] Ainsi, dans un second temps, le solvant d'éluion peut être évaporé et l'extrait sec repris dans un plus faible volume d'un véhicule compatible avec le système chromatographique. [Pichon, 2006]

Le rendement d'extraction se définit comme le rapport de la quantité de soluté extraite sur la quantité initialement déposée. En pratique, le rendement de récupération du composé adsorbé est rarement total. [Josefsson et Sabanovic, 2006 ; Lee *et al.*, 2007] Une partie des composés à extraire peut ainsi être perdue durant le processus d'extraction. Dans le cas des échantillons hERG, il est peu probable de dépasser la capacité de rétention du support. En effet, nous étudions de faibles concentrations. En revanche, un mauvais rendement peut être causé par une faible affinité du soluté pour l'adsorbant dans les cas des molécules les moins apolaires ou, au contraire, par un volume insuffisant de solvant d'élution pour les composés très apolaires. L'étape d'évaporation peut aussi être la cause d'un mauvais rendement, par une dégradation accélérée du composé ou une remise en solution incomplète de l'extrait sec. [Pichon, 2006]

Aussi, dans les méthodes de bioanalyse, un standard interne est souvent ajouté avant l'extraction, avec la contrainte que le comportement des deux composés soit le même à chaque étape de l'extraction. Par conséquent, le meilleur choix en spectrométrie de masse est un isotope stable du principe actif. [Rouessac et Rouessac, 2009] Si celui-ci n'est pas toujours disponible, nous pouvons tirer profit du grand nombre d'analogues structuraux générés (en plus ou moins grande quantité) aux premières étapes de la R&D pour définir un standard interne utilisable pour la SPE. [Di *et al.*, 2012] Le choix de celui-ci est plus compliqué en détection UV. Il faut, en effet, s'assurer d'une séparation chromatographique correcte du composé étudié et de son standard interne, malgré un comportement identique durant chaque étape de l'extraction. Pour cette raison, la mise en place d'un protocole de SPE est plus complexe pour une détection UV, sauf si nous considérons que les pertes lors de l'extraction se situent dans une marge acceptable et que l'emploi d'un standard interne n'est pas nécessaire.

Pour l'analyse d'échantillons en milieu aqueux, nous pouvons trouver, chez plusieurs fournisseurs (Phenomenex, Perkin Elmer, Restek, Waters), deux types principaux de support : les phases apolaires et les échangeurs d'ions, applicables aux composés ionisables. Les échangeurs d'ions ne sont pas utilisables pour les échantillons hERG en raison de la très grande quantité de cations (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) et d'anions (Cl^-) présents dans le milieu physiologique qui entreraient en compétition pour la fixation sur l'échangeur d'ions. Les adsorbants apolaires utilisent le principe de la chromatographie de partage à polarité de phases inversée. Ainsi, on retrouve des phases solides constituées de silices greffées (C8, C18) qui permettent la rétention des composés par interactions hydrophobes. Par conséquent, le comportement des molécules sur ces adsorbants est corrélé à la valeur de leur coefficient de partage octanol-eau ($\log P$). Aussi, les silices greffées ne sont utilisables que pour des substances actives très hydrophobes ($\log P > 3$), alors que les composés plus polaires sont insuffisamment retenus. Pour ces molécules, d'autres adsorbants sont disponibles tels que les copolymères hydrophobes. [Pichon, 2006]

Les phases polymériques apolaires sont principalement des copolymères de polystyrène et divinylbenzène. La rétention des substances actives met en jeu des interactions hydrophobes. De plus, compte tenu de la présence de noyaux aromatiques dans la structure du copolymère,

des interactions (de type π - π) ont lieu avec les substances contenant un ou plusieurs cycles aromatiques. Cela permet d'augmenter la rétention de ces composés par rapport aux silices greffées. [Pichon, 2006] Enfin, des polymères contenant des groupements polaires ont été développés et permettent une plus grande rétention des composés les moins apolaires ($\log P < 3$). [waters.com] L'élution des solutés est réalisée par des solvants similaires à ceux utilisés pour les silices greffées (acétonitrile, méthanol). Cependant, l'intensité des interactions avec les polymères étant plus forte, il peut être nécessaire d'augmenter le volume d'élution. [Pichon, 2006]

L'extraction en phase solide est, classiquement, réalisée sur des cartouches en matière plastique, contenant jusqu'à 60mg de phase solide par centimètre cube. Quand l'échantillonnage des formulations est réalisé en amont du test *in vitro*, le volume des échantillons est suffisamment important (quelques millilitres). Si le prélèvement est, au contraire, réalisé après passage du système de perfusion, le volume d'échantillon disponible est plus faible. Dans ce cas, les plaques d'extraction à 48 ou 96 puits, dont le volume est au minimum de 25 μ L, sont une bonne alternative aux cartouches d'extraction. [phenomenex.com ; waters.com] Une seconde plaque est positionnée en-dessous des micropuits pour récolter les fractions éluées. Une fois l'extraction terminée, celle-ci peut être ensuite directement positionnée dans le CLHP dont la seringue viendra prélever un volume de soluté dans le puits pour l'injecter dans le système. [waters.com]

Ce procédé présente l'avantage d'éviter un transfert de l'échantillon entre l'extraction et l'injection, source potentielle de perte de produit ou de contamination externe. En revanche, elle majore l'impact d'une telle contamination du fait des faibles volumes d'échantillon engagés. De plus, le volume d'injection peut difficilement être augmenté pour améliorer la sensibilité de la détection (cf. **Tableau IV** au chapitre 2.1.4). L'automatisation de toute la procédure est possible, mais ne présente pas d'intérêt pour notre étude en raison des petites séries d'échantillons analysées (les quelques points de la courbe effet-concentration plus un « blanc »). [Pichon, 2006]

2.3.2. Extraction en ligne

L'étape d'extraction peut être totalement dissociée de l'analyse chromatographique, comme nous venons de le voir, ou être intégrée au système chromatographique dans le cas d'une extraction dite « en ligne ». Dans cette méthode, une pré-colonne de petite taille (10 à 20mm) est installée à la place de la boucle d'injection. Aucune manipulation de l'échantillon n'intervient avant l'injection, ce qui exclut tout risque de contamination ou de perte. [Pichon, 2006] Les mêmes types de phases que dans les cartouches d'extraction sont retrouvés dans ces colonnes, soit des silices greffées C18 (pour les molécules apolaires) et les copolymères utilisables pour tout type de composé. [phenomenex.com ; waters.com] En général, la pré-colonne est constituée du même adsorbant que la colonne analytique. On retrouve ainsi

souvent une phase C18 qui présente l'avantage de beaucoup mieux résister à la pression générée en chromatographie liquide. [de Jager et Bailey, 2011]

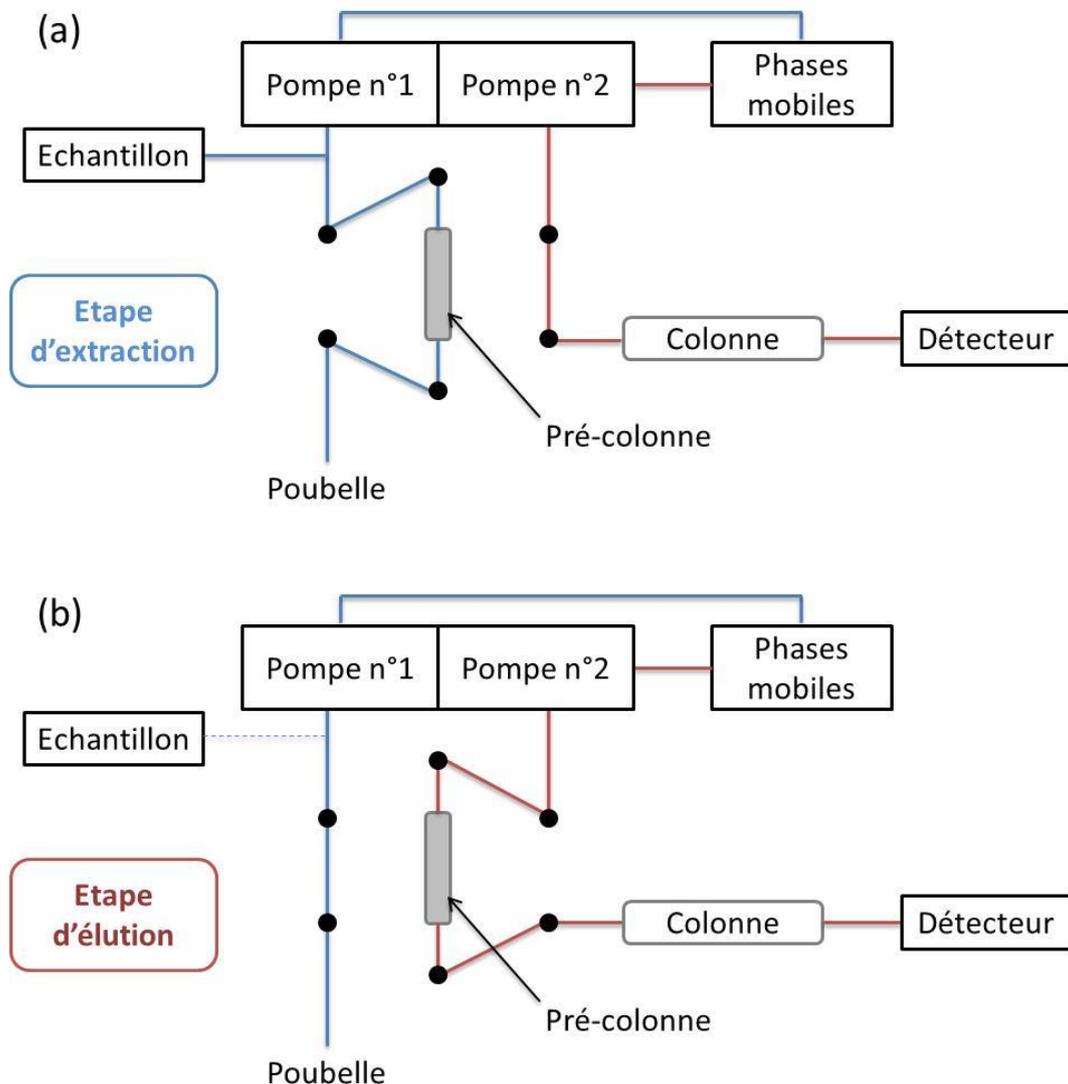


Figure 19 : Description du fonctionnement d'un système d'extraction en ligne : chargement et extraction du composé (a), suivis de son élution et de sa détection (b)
[D'après Pichon, 2006]

La chaîne CLHP utilisée dans ces méthodes est équipée d'un double système de pompage. En phase d'extraction, la vanne d'injection est en position de chargement. Après injection de l'échantillon, une première pompe entraîne une phase mobile aqueuse à travers la pré-colonne d'extraction et permet l'élution des composés polaires tandis que la substance active est retenue. En parallèle, la seconde pompe assure le conditionnement de la colonne analytique (**Figure 19a**). Après un temps prédéfini, suffisant pour éliminer les composés hydrophiles mais pas le composé étudié, la vanne est tournée en position d'élution. La seconde pompe fait alors passer une phase mobile plus hydrophobe, éventuellement en gradient, à travers la pré-

colonne et entraîne les analytes précédemment retenus vers la colonne analytique puis le détecteur (**Figure 19b**). L'extraction en ligne est souvent couplée avec un spectromètre de masse en tandem [de Jager et Bailey, 2011], mais des détecteurs UV sont parfois utilisés. [Fernández-Ramos *et al.*, 2014]

Dans ce système, la pré-colonne et la colonne analytique sont connectées au moment de l'élution (**Figure 19b**). Une dispersion de la bande d'élution peut donc avoir lieu si le couplage des deux colonnes est imparfait. Il est ainsi recommandé d'utiliser des pré-colonnes de diamètre interne inférieur ou équivalent au diamètre de la colonne analytique (2,0 à 4,6mm généralement) et constitué du même type de phase, ce qui explique la prévalence des silices greffées. [de Jager et Bailey, 2011] Par ailleurs, il faut tenir compte de la force éluante de la phase mobile utilisée. Celle-ci doit permettre un transfert rapide du soluté de la pré-colonne à la colonne analytique, mais aussi permettre la séparation chromatographique du composé et du volume non négligeable de phase aqueuse présente dans la pré-colonne au début de l'étape d'élution. Le mode gradient est donc souvent préféré à l'isocratique. [de Jager et Bailey, 2011 ; Fernández-Ramos *et al.*, 2014] Enfin, les deux colonnes étant couplées, le volume d'échantillon pouvant être purifié est limité par la capacité de rétention de la colonne d'extraction. Toutefois, dans la méthode « en différé », bien qu'un volume plus important d'échantillon soit traité, seule une partie de celui-ci est ensuite injectée. [Pichon, 2006]

Dans la méthode d'extraction en ligne, la quantification est faite par comparaison du signal généré par la solution échantillon à celui d'une solution standard réalisée par extraction d'une même quantité de substance active dans un même volume de milieu hERG. [Pichon, 2006] La SPE en ligne produit des résultats satisfaisants pour une utilisation en Bioanalyse. Ainsi, l'étude de de Jager et Bailey, réalisée sur vingt-neuf composés en CL-SM/SM, démontre une bonne exactitude (entre 90,0 et 110,0% de la valeur nominale) sur un domaine de concentration de 5 à 1000ng/mL, associée à une répétabilité (avec standard interne) n'excédant pas 8,0%. De plus, la reproductibilité, sur six jours différents, était inférieure à 10,0%. Enfin, la contamination d'une solution de « blanc » après plusieurs injections de l'échantillon le plus concentré (*carry-over*), était trouvée, à une exception près, inférieure à 10,0% de la plus basse concentration. [de Jager et Bailey, 2011] Des résultats similaires sont attestés par l'étude de Fernández-Ramos *et al.*, en détection UV non-spécifique (210nm). Pour dix molécules, une limite de quantification de l'ordre de 20ng/mL était obtenue avec une bonne répétabilité (moins de 5,0% sur cinq injections) et un taux de recouvrement compris entre 95,0 et 105,0%. [Fernández-Ramos *et al.*, 2014]

Le **tableau V** ci-dessous regroupe les atouts et inconvénients des deux méthodes d'extraction en phase solide en vue du prétraitement des échantillons hERG. La SPE en ligne permet de limiter la manipulation de l'échantillon, avant injection, à une éventuelle dilution suivie d'une mise en vial. Le risque de contamination externe est donc réduit, de même que le temps d'analyse, par rapport à la méthode en différé. De plus, la consommation de solvant et l'exposition de l'analyste sont plus faibles. En contrepartie, l'extraction en ligne peut impacter l'efficacité de la séparation chromatographique et ne permet pas, au vu du petit volume injecté, de concentrer l'échantillon. Elle ne présente donc pas d'intérêt pour l'analyse des

échantillons hERG en CL-UV. Enfin, l'extraction en ligne nécessitant l'achat d'un appareil dédié, car équipé d'une vanne d'injection spéciale (cf. **Figure 19**), cette technique ne peut être envisagée que pour un laboratoire réalisant régulièrement des analyses de ce type.

Tableau V : Comparaison des avantages et inconvénients des méthodes d'extraction en phase solide en ligne et en différé

	SPE en ligne	SPE en différé
Avantages	Diminution du nombre d'étapes et de transferts Diminution du risque de contamination Réduction du temps d'analyse Bonne reproductibilité Consommation de solvant réduite	Préconcentration possible Pas de nécessité d'un CLHP dédié Utilisation possible des adsorbants polymériques Pas de perte d'efficacité lors de la séparation chromatographique Possibilité d'isoler chaque étape de l'extraction (développement)
Inconvénients	Ne permet pas de préconcentration Besoin d'un CLHP dédié Dispersion de la bande d'élution Faible utilisation des adsorbants polymériques	Etapes nombreuses, transferts multiples Risque de contamination Requiert un temps conséquent Consommation de solvant

Dans le cas d'études hERG occasionnelles, la méthode d'extraction en différé semble un meilleur choix. Cette technique permet l'utilisation, sans problème de compatibilité avec la colonne analytique, des adsorbants polymériques qui offrent une meilleure rétention des composés polaires. De plus, les systèmes CLUHP, associés à des colonnes analytiques de faible diamètre interne, sont utilisables sans risque de dispersion de la bande d'élution due à l'utilisation d'une pré-colonne. Enfin, chaque étape de l'extraction peut être isolée, lors du développement de la méthode d'extraction, afin de déterminer d'éventuelles pertes lors du dépôt de l'échantillon, du rinçage ou de l'élution (cf. **Figure 18** au chapitre 2.3.1).

2.4. Limites des méthodes de dosage

Le développement d'une méthode analytique de dosage des formulations utilisées dans les études hERG permet donc de s'assurer de l'absence de pertes de substance active dues à une solubilité insuffisante dans les conditions de l'étude *in vitro*, une adsorption sur le système de perfusion ou une erreur dans la préparation des échantillons (cf. chapitre 1.3). Cependant, l'analyse des échantillons est elle-même source d'erreur. Elle peut conduire, à l'inverse, à une sous-estimation de la concentration réelle des solutions et, par conséquent, à surestimer le potentiel inhibiteur de la molécule. L'analyse est en effet soumise à plusieurs facteurs d'erreur : une faible solubilité, une instabilité du composé dans les conditions de stockage (temps, température), ainsi que l'incertitude liée à la méthode analytique. Si la concentration mesurée de l'échantillon est significativement inférieure à sa concentration théorique, il faut prendre en compte le risque que l'erreur provienne du temps écoulé entre le test *in vitro* et le dosage des formulations. [Qu *et al.*, 2011]

2.4.1. Stabilité

Nous avons déjà souligné dans la première partie de cette thèse qu'il est nécessaire de s'assurer que la quantité de substance active en solution demeure inchangée jusqu'au moment de l'analyse. [Qu *et al.*, 2011 ; Rast et Guth, 2014] Or, le risque de dégradation du composé en milieu aqueux (tel que le véhicule hERG) s'accroît avec le temps. Nous avons également mentionné que la dégradation chimique est, en général, plus rapide en milieu aqueux que dans un solvant organique. [Loftsson, 2014] La stabilité est donc un problème très important pour l'analyste car le délai entre l'essai *in vitro* et l'analyse chromatographique peut être conséquent. [Brimecombe *et al.*, 2009]

La voie de dégradation principale se produisant en milieu aqueux est une réaction d'hydrolyse. Les molécules les plus sensibles sont celles contenant des groupements ester (cas de la benzocaïne), amide (paracétamol), imide (thalidomide), lactone (spironolactone) ou lactame (amoxicilline). [Florence et Attwood, 2011 ; Loftsson, 2014 ; Yoshioka et Stella, 2000] Cette réaction est catalysée en milieu acide par les ions hydrogène (H^+) et en milieu basique par les ions hydroxydes (HO^-). Nous pouvons donc espérer une vitesse de dégradation plus lente au pH neutre du milieu physiologique hERG (7,40), même si le phénomène est complexe et parfois difficilement prévisible. [Florence et Attwood, 2011 ; Loftsson, 2014] L'hydrolyse est, par ailleurs, favorisée par une augmentation de la température. Pour cette raison, les échantillons sont conservés au congélateur jusqu'au jour de l'analyse. La deuxième voie importante de dégradation en milieu aqueux est l'oxydation des substances actives. Les molécules sensibles sont celles possédant des doubles liaisons conjuguées. Parmi les composés thérapeutiques, nous pouvons citer le cas des catécholamines (épinéphrine, lévodopa) et des phénothiazines (famille de substances actives neuroleptiques). [Florence et Attwood, 2011 ; Yoshioka et Stella, 2000]

A ce titre, Brimecombe *et al.* ont rassemblé des données de stabilité en milieu hERG provenant de plusieurs études. Les résultats sont présentés dans le graphique ci-dessous (**Figure 20**). L'instabilité est ici définie par un taux de recouvrement par rapport à la concentration initiale inférieur à 85%. Sur trente-cinq molécules, huit composés étaient ainsi instables dans le milieu hERG après 24h à température ambiante, dont cinq l'étaient déjà après seulement 8h. Cette revue s'est aussi intéressée à la stabilité en solution après congélation et décongélation. Dans ces conditions, quatre molécules sur trente-deux présentaient une dégradation supérieure à 15% après 8h d'étude, pour un total de six après 24h (**Figure 20**). Cependant, ces composés étaient également dégradés après 24h à température ambiante. L'instabilité n'est donc pas attribuable au cycle de congélation/décongélation. [Brimecombe *et al.*, 2009] Nous ne disposons pas de données sur la structure de ces molécules.

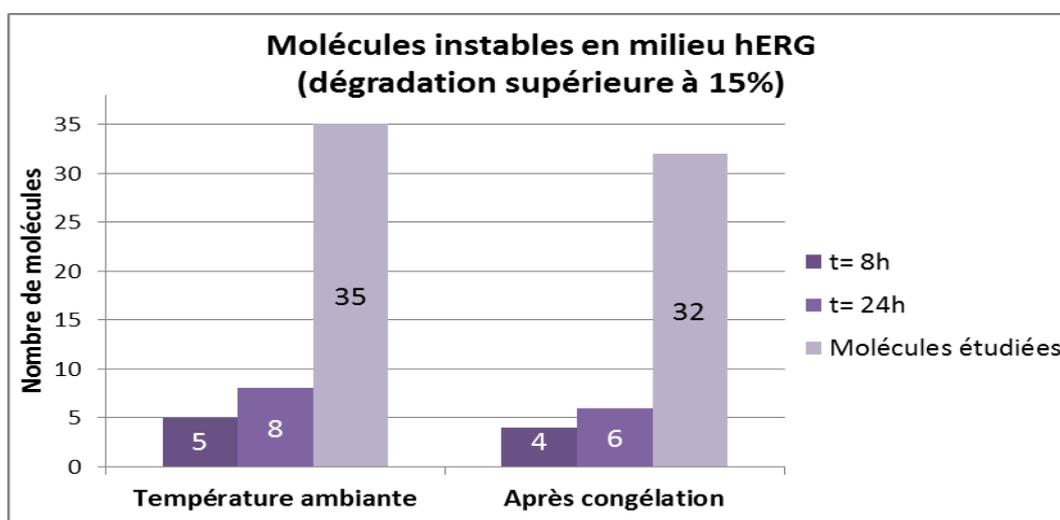


Figure 20 : Stabilité de trente-cinq composés en milieu hERG à température ambiante et après congélation et décongélation

[D'après Brimecombe *et al.*, 2009]

Les études de stabilité des composés dans le milieu physiologique hERG peuvent être assimilées à celles menées en Bioanalyse, en raison de la matrice liquide des échantillons. A ce titre, nous pouvons considérer les directives des agences européennes (EMA) et américaines (FDA) relatives à ce sujet. [EMA, 2011 ; FDA, 2001] Les études de stabilité doivent refléter le cycle de vie de la formulation depuis sa préparation pour le test hERG jusqu'à l'analyse quantitative de l'échantillon en CLHP. Il faut donc établir l'absence de dégradation à la température de l'essai *in vitro*, puis durant le transport des échantillons vers le laboratoire analytique et dans les conditions de stockage (température, conditionnement). Les agences américaine et européenne s'accordent pour considérer qu'une perte de composé d'au plus 15% par rapport à la concentration initiale de la solution est acceptable pour les études de bioanalyse. [EMA, 2011 ; FDA, 2001] Bien sûr, cet intervalle doit aussi tenir compte des critères d'acceptation définis pour le dosage des échantillons hERG. Ainsi, si un

taux de recouvrement compris entre 90,0% et 110,0% de la valeur théorique est exigé, la perte acceptable par dégradation chimique sera alors, au maximum, de 10,0%.

Ces études s'effectuent, selon les directives des deux agences, à deux niveaux de concentration (haute et basse, proche des limites du domaine de linéarité) et en trois réplicas par niveau. L'étude à court terme évalue la stabilité à température ambiante durant le temps nécessaire à la préparation des échantillons et aux injections chromatographiques, soit de quatre à vingt-quatre heures. Elle simule le temps de travail au sein du laboratoire analytique. Cette étude à court terme doit aussi être réalisée sur les solutions mères préparées dans le DMSO (stables au moins six heures selon la FDA). [EMA, 2011 ; FDA, 2001] La stabilité dans le diméthylsulfoxyde est moins bien connue qu'en solution aqueuse. Il apparaît cependant que, du fait que ce solvant soit très hygroscopique, des réactions d'hydrolyse et d'oxydation peuvent s'y dérouler. [Chorghade, 2007] Selon Borchardt *et al.*, la majorité des composés thérapeutiques sont stables dans le DMSO, à température ambiante, pendant au moins un jour. [Borchardt *et al.*, 2004]

Les études de stabilité à long terme reflètent la durée écoulée entre l'échantillonnage de la première formulation et l'analyse du dernier échantillon. Durant cette période, les échantillons sont généralement congelés pour ralentir leur dégradation, puis décongelés à température ambiante avant l'analyse chromatographique. L'agence américaine du médicament recommande d'évaluer la stabilité à long terme sur trois cycles de congélation/décongélation. La première étape de congélation dure 24h, puis les suivantes peuvent être réduites à 12h. En l'absence de données de stabilité, la température de congélation est, par défaut, de -70°C. [EMA, 2011 ; FDA, 2001]

La stabilité du composé dans le milieu hERG est donc primordiale à déterminer avant le commencement de l'étude, mais nécessite de disposer d'une méthode analytique de dosage des échantillons. Pour s'assurer de la stabilité du composé dans le milieu physiologique jusqu'au moment de l'analyse chromatographique, Brimecombe *et al.* soulignent l'importance d'une bonne coordination de l'échantillonnage et de l'analyse chromatographique. Le délai entre l'essai *in vitro* et le dosage doit être le plus court possible et, dans tous les cas, compris dans l'intervalle de stabilité du composé dans le milieu hERG. A ce titre, il est préférable que le test hERG et l'analyse soient effectués au sein de la même entité pour limiter les problèmes liés au transport des échantillons. [Brimecombe *et al.*, 2009]

2.4.2. Adsorption et solubilité

L'adsorption de la substance active lors de l'essai *in vitro* et l'ampleur de ce phénomène ont été largement discutés au chapitre 1.2.3. Rappelons que le risque d'adsorption est plus grand pour les substances apolaires, en raison de leur faible affinité pour le milieu physiologique hERG. Le phénomène impacte, généralement, davantage les basses concentrations. [Florence et Attwood, 2011 ; Mahato et Narang, 2011] Le prélèvement d'un petit volume de chaque

formulation préparée ne permet pas de prendre en compte une éventuelle adsorption du composé étudié sur les conduits du système de perfusion entre le réservoir et la chambre de mesure. Ainsi, la capacité d'adsorption du composé est étudiée avant le début de l'étude *in vitro* sur un système de perfusion « vide ». Cela permet de décider si l'échantillonnage doit être réalisé avant ou après passage du système de perfusion. [Qu *et al.*, 2011] Pour rappel, nous avons vu que la majorité des composés étaient peu sensibles à ce phénomène. [Brimecombe *et al.*, 2009] Si la capacité d'adsorption de la substance active a été caractérisée, aux limites hautes et basses du domaine de concentration, et le mode d'échantillonnage adéquat choisi en conséquence, ce phénomène ne devrait plus être source d'incertitude pour l'analyse chromatographique.

Second point important décrit au chapitre 1.2, la faible solubilité aqueuse des molécules actuellement en développement peut affecter le bon déroulement de l'étude *in vitro* en réduisant la quantité de substance active en solution apte à interagir avec le canal Kv(r). [ICH S7B, 2005] Le problème de la solubilité des substances actives est aussi rencontré lors de l'étape d'analyse des formulations et peut, de plus, être aggravé par le temps de stockage et la congélation de l'échantillon. [Di *et al.*, 2012 ; Qu *et al.*, 2011] Une diminution de la température affecte, en effet, la solubilité. Ainsi, la congélation de l'échantillon, nécessaire pour assurer sa stabilité chimique, est susceptible de provoquer une précipitation du composé étudié. Le DMSO (co-solvant organique) ne permet que de ralentir la vitesse de précipitation. Un effet à long terme, après décongélation de l'échantillon, ne peut donc être espéré. La présence de précipités dans l'échantillon décongelé peut être ensuite difficile à observer. [Borchardt *et al.*, 2004 ; Brimecombe *et al.*, 2009]

Si des formulations sursaturées ont été préparées, la difficulté est de savoir si celles-ci ont précipité avant leur perfusion lors de l'étude *in vitro* ou si, au contraire, ce retour du composé à l'état solide a eu lieu lors du stockage de l'échantillon. [Qu *et al.*, 2011] En effet, une formulation hERG sursaturée peut perdurer de quelques minutes à plusieurs heures avant que le composé ne précipite. [Rast et Guth, 2014] Les différentes études réalisées sur le sujet s'accordent pour dire que les composés hydrophobes représentent la grande majorité des cas où les concentrations mesurées par CLHP diffèrent fortement des concentrations nominales (jusqu'à dix fois plus faibles). En utilisant ces valeurs mesurées pour établir la courbe effet-concentration, le dosage des formulations peut faussement abaisser la CI_{50} de la substance active (cf. **Figure 6** au chapitre 1.2.1). Comme nous l'avons déjà mentionné, cela produit des cas de faux-positifs attribuant, à tort, un potentiel d'allongement de l'intervalle QT à une molécule. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Qu *et al.*, 2011] Les composés hydrophiles entraînent moins d'incertitude en ce qui concerne la solubilité dans le milieu hERG et l'adsorption. Malheureusement, ils ne constituent qu'un quart des molécules actuellement en développement. [Di *et al.*, 2012]

Pour pallier la précipitation des composés lipophiles, il a été proposé l'idée de remettre en solution l'entièreté de l'échantillon par ajout d'un solvant organique. Cependant, cette technique est imparfaite. Premièrement, elle induit une dilution de l'échantillon et donc des concentrations encore plus basses à quantifier. Ensuite, si le composé est totalement solubilisé

de cette manière, rien ne dit qu'il l'était effectivement lors du test *in vitro*. Le manque de solubilité dans le milieu physiologique est donc toujours un problème important que rencontrent le pharmacologue et l'analyste lors des études hERG et est plus difficile à quantifier que l'adsorption et la dégradation chimique. L'intérêt d'une vérification analytique des concentrations perfusées n'est, toutefois, pas remis en cause mais ses résultats doivent être considérés avec un certain recul au regard de l'hydrophobicité de la molécule étudiée, des prédictions *in silico* (relation structure-activité) et des résultats *in vivo*. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Herron *et al.*, 2004 ; Qu *et al.*, 2011]

2.4.3. Détection « en ligne »

Afin de s'affranchir des problèmes de stabilité, d'adsorption et de précipitation, Rast et Guth proposent une détection UV « en ligne » couplée au système de perfusion. Dans le modèle proposé, la substance active en solution est amenée dans la chambre d'enregistrement à un débit de 2,0mL/min, puis deux systèmes d'efflux permettent de garder le volume constant dans la chambre. Contrairement au modèle classique présenté dans la première partie de cette thèse, une partie du flux (ici 1,5mL/min) est entraînée par une pompe vers un détecteur UV. Un filtre placé avant la cellule de détection de celui-ci est nécessaire pour éliminer d'éventuels organites ou débris cellulaires pouvant impacter la détection. Les auteurs utilisent une cellule de mesure à très long trajet optique (100cm) afin d'augmenter la sensibilité, conformément à la loi de Beer-Lambert. Le volume mort du système présenté est d'environ 1mL, soit un délai de 40s entre la chambre d'incubation et le détecteur UV. [Rast et Guth, 2014] Ce temps est négligeable puisqu'un délai d'équilibrage d'environ dix minutes est respecté après chaque changement de concentration. [Brimecombe *et al.*, 2009] Grâce à ce modèle, il est possible de faire l'acquisition de façon presque simultanée de l'intensité du courant potassique I_{Kr} résiduel et de la concentration en substance active correspondante. [Rast et Guth, 2014]

Cette approche est très avantageuse en termes de simplicité d'utilisation, de temps d'analyse, d'équipements nécessaires et de consommation de solvant. De plus, cette quantification « en temps réel » diminue les sources d'erreur par rapport à l'analyse chromatographique. Premièrement, elle réduit considérablement le risque de dégradation de l'échantillon dû aux conditions de stockage, à température ambiante ou après un cycle de congélation et décongélation. Ensuite, l'analyse en ligne évite les pertes lors de l'étape de préparation de l'échantillon (transferts, dilutions, extraction). Enfin, la quantification ne nécessite que l'établissement préalable d'une droite d'étalonnage par spectrophotométrie UV. D'après Rast et Guth, la méthode offre une bonne linéarité (coefficient de corrélation supérieur à 0,9) et, comme exemple de la précision de la méthode, la CI_{50} du vérapamil (250nM) a été déterminée avec une incertitude inférieure à 10%. [Rast et Guth, 2014]

Cependant, cette nouvelle approche se heurte à certaines limites. Du fait de l'absence de séparation chromatographique, la substance active reste, dans la cellule du détecteur, en

présence des autres constituants du milieu hERG, dont certains absorbent aussi dans l'UV. C'est le cas du DMSO, dont nous avons vu qu'il pouvait se retrouver dans des proportions de 0,1 à 1,0% (v/v). La limite de transparence du DMSO (pour laquelle l'absorbance est de 0,2 unités pour une largeur de cellule de 1 cm) est située à 280nm. [sigmaaldrich.com] Il sera donc plus difficile de doser des composés absorbant peu dans l'UV au-delà de cette longueur d'onde. De plus, le pourcentage de transmittance dans une cellule de 100cm de trajet optique est faible à des longueurs d'onde inférieures à 250nm. Malgré cela, selon Rast et Guth, une concentration minimale de 300nM peut être quantifiée pour la plupart des molécules pharmaceutiques. Une sensibilité de 30nM a même été atteinte pour le vérapamil qui présente un maximum d'absorption à 276nm. [Özkan *et al.*, 2000 ; Rast et Guth, 2014] En conséquence, cette approche ne peut pas être utilisée pour des composés à fort potentiel inhibiteur qui nécessitent la quantification de concentrations de l'ordre de 0,01µM.

En conclusion, la détection UV « en ligne » semble constituer une alternative très intéressante aux méthodes chromatographiques habituellement utilisées, car elle supprime l'incertitude liée à l'adsorption et au temps de stockage (stabilité, solubilité). Ainsi, des études de stabilité à long terme ne sont plus nécessaires. De plus, cette technique diminue de façon conséquente le temps d'analyse (transport des échantillons, analyse chromatographique) et produit des résultats immédiats. Cependant, cette approche ne saurait être universelle au regard des différents profils de molécules (potentiel inhibiteur, absence de chromophore pour la détection UV) que nous pouvons rencontrer lors des études hERG. Dans la dernière partie de cette thèse, nous allons ainsi évaluer uniquement des méthodes chromatographiques afin de couvrir toutes les situations potentiellement rencontrées par l'analyste.

3. PARTIE EXPÉRIMENTALE

3.1. Introduction

Le développement puis la validation d'une méthode analytique pour le dosage des échantillons hERG peut durer plusieurs semaines alors qu'elle ne concernera, en général, qu'une seule étude *in vitro*, donc une seule série d'échantillons. De plus, la quantité de produit disponible à ce stade du développement est faible et, par conséquent, précieuse. Or, le laboratoire au sein duquel a été réalisée cette étude ne dispose pas toujours de l'effectif ou de l'équipement nécessaire pour mettre au point une telle méthode de quantification. Il est donc parfois fait appel à un sous-traitant, ce qui entraîne un coût supplémentaire pour le laboratoire. Toutefois, si le temps nécessaire à la validation de la méthode, estimé à environ deux semaines, est incompressible, il est envisageable de raccourcir la durée du développement de celle-ci.

Les difficultés liées au développement d'une méthode de quantification d'une nouvelle substance active en milieu physiologique hERG ont été largement décrites dans les chapitres précédents. Elles concernent, en premier lieu, le milieu hERG, soit la matrice des échantillons, dont les sels constitutifs peuvent causer un effet de matrice réduisant l'intensité du signal en spectrométrie de masse. De plus, les composés les plus apolaires sont peu solubles dans ce milieu aqueux de pH neutre (7,40). Dans un second temps, le niveau de sensibilité de la méthode analytique dépend de la CI_{50} du composé. Une approximation de cette valeur peut être obtenue par modélisation *in silico* lors de la recherche exploratoire [Hancox *et al.*, 2008 ; Rampe et Brown, 2013] ou par une expérience *in vitro* préliminaire (cf. chapitre 1.3). Dans la pratique, les valeurs de la gamme de concentration que nous étudions s'échelonnent de 100 μ M (soit de 20 à 40 μ g/mL dans cette étude) dans le cas de composés très peu actifs sur le canal hERG à 0,1 μ M (20 à 40ng/mL) pour les composés inhibant fortement le courant potassique I_{Kr} .

De plus, nous avons vu au paragraphe 1.1.2 qu'une solution de contrôle, contenant uniquement le milieu physiologique et le co-solvant (généralement le DMSO), est administrée lors de l'étude *in vitro* afin de déterminer l'intensité du courant potassique en absence de substance active. [Brimecombe *et al.*, 2009 ; Yao *et al.*, 2005] Cette solution ne doit, bien entendu, pas être contaminée pour ne pas fausser ce résultat. Dans ce but, nous avons défini que la concentration en substance active éventuellement retrouvée dans cette solution devait être inférieure à 10% de la plus basse concentration testée. Par conséquent, la limite de quantification de la méthode analytique doit être dix fois plus basse que la plus petite concentration étudiée *in vitro*. Cette dernière équivaut à 0,1 μ M dans le cas des substances à fort potentiel inhibiteur. La limite de quantification doit donc être de 0,01 μ M (de 2 à 4ng/mL selon la molécule).

L'idée directrice de notre étude était de favoriser un développement en interne. Nous n'avons donc utilisé que des équipements disponibles au laboratoire de « Formulation non-clinique » ou dans un autre laboratoire du site. Le but de ce travail n'était ainsi pas la validation d'une méthode de dosage mais l'évaluation des performances et de la faisabilité de différentes approches analytiques alternatives à la CL-SM/SM. L'objectif final de l'étude était de proposer un arbre décisionnel permettant, via des tests d'orientation rapide, de faciliter le choix de la technique adéquate et ainsi réduire le temps nécessaire au développement d'une nouvelle méthode. Pour mener à bien ce projet, nous avons travaillé sur un panel représentatif de dix substances actives, anciennement ou en cours de développement au démarrage de l'étude, désignées par une lettre de A à J. Cette gamme inclut des composés de structures et de propriétés physico-chimiques variées telles que des molécules polaires et apolaires, à caractère acide et basique, possédant ou non une longueur d'absorption spécifique en UV. Toutes ces molécules ont l'avantage de posséder des hétéroatomes dans leur structure (oxygène, azote, soufre...), ce qui facilite leur ionisation en spectrométrie de masse. [Bouchoux et Sablier, 2005]

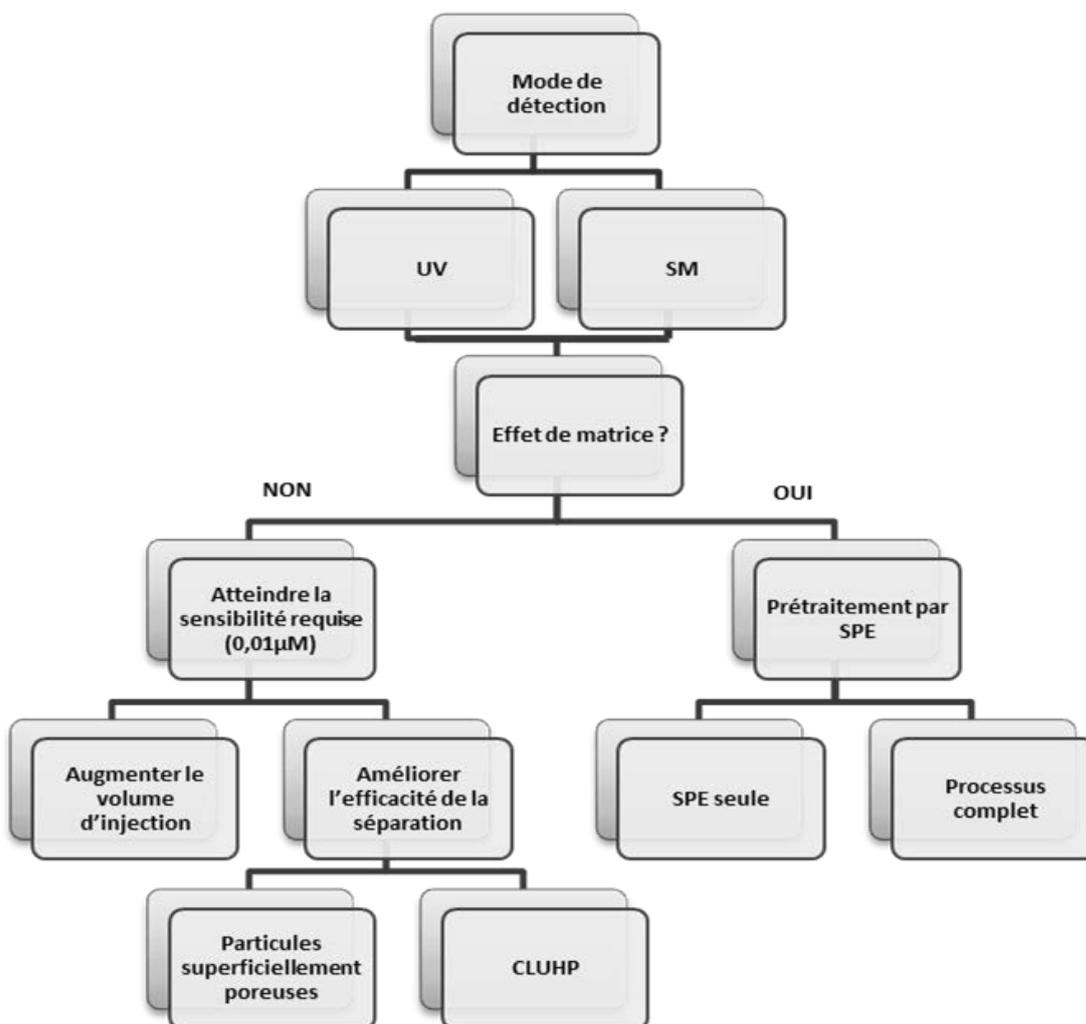


Figure 21 : Schéma du déroulement de l'étude expérimentale

Le schéma ci-dessus (**Figure 21**) présente le fil directeur suivi lors de cette étude expérimentale. Nous avons envisagé deux approches distinctes pour permettre la quantification des échantillons hERG avec une sensibilité suffisante : la détection UV et la spectrométrie de masse (simple quadripôle). Pour chacun de ces modes de détection, nous avons commencé par déterminer l'existence d'un effet de matrice dû au milieu physiologique. Dans le cas où une suppression de signal était observée, nous avons évalué la faisabilité de l'extraction en phase solide (SPE) pour purifier l'échantillon de sa matrice et éliminer les substances responsables de ce phénomène. La SPE peut être isolée ou prolongée par une évaporation du solvant et une remise en solution de l'extrait (processus complet). Par ailleurs, nous avons étudié si une limite de quantification de 0,01 µM pouvait être atteinte. Dans ce but, nous avons évalué deux approches permettant d'améliorer la sensibilité : l'augmentation du volume d'injection et l'amélioration de l'efficacité de la séparation. Pour ce dernier point, nous avons envisagé l'utilisation de particules superficiellement poreuses (SPP), puis le recours à des particules entièrement poreuses de diamètre inférieur à 2 µm dans un système ultra-haute performance (CLUHP). [Guillarme, 2014]

Afin de déterminer l'applicabilité des techniques analytiques étudiées à l'analyse des échantillons hERG, nous avons défini des critères de performance objectifs. Les échantillons n'étant pas soumis à une quelconque pharmacocinétique, nous avons fait le choix de critères d'acceptation plus stricts que ceux fixés par les agences réglementaires américaine et européenne pour les méthodes de bioanalyse qui s'appliquent aux échantillons d'origine biologique. [EMA, 2011 ; FDA, 2001] Les paramètres étudiés et leurs critères d'acceptation sont rassemblés dans le **tableau VI** ci-dessous. En pratique, ils peuvent différer selon qu'il s'agisse d'une validation (solutions standards) ou d'une analyse d'échantillons.

Tableau VI : Paramètres étudiés et critères d'acceptation internes

Paramètre	Critère(s) d'acceptation
Linéarité	$R \geq 0,99$
Répétabilité (coefficient de variation)	$CV \leq 1,5\%$ (Validation) $CV \leq 5,0\%$ (Analyse de formulation)
Exactitude (taux de recouvrement)	$95,0 \leq r \leq 105,0\%$ (Validation) $90,0 \leq r \leq 110,0\%$ (Analyse de formulation)
Véhicule et <i>carry-over</i>	Contamination inférieure à la limite de quantification (soit 10% de la plus basse concentration étudiée <i>in vitro</i>)
Limite de quantification (LQ)	$S/N \geq 10$ $CV \leq 10,0\%$ $90,0 \leq r \leq 110,0\%$

En premier lieu, la linéarité, mesurée sur un minimum de cinq points, est jugée conforme si un coefficient de corrélation « R » supérieur ou égal à 0,99 est obtenu. L'exactitude (par le taux de recouvrement *r*) et la répétabilité (via le coefficient de variation CV) sont étudiées sur un

minimum de deux points : une concentration haute et une concentration basse. Leurs critères d'acceptation sont différents pour des solutions standards ou des échantillons. Ensuite, le *carry-over* (soit la quantité d'analyte résiduelle mesurée dans une injection de véhicule suivant directement une injection d'une solution concentrée en substance active) doit être inférieur à 10% de la plus basse concentration étudiée. Enfin, au niveau de la limite de quantification, le rapport signal/bruit (S/N) du pic d'intérêt doit être supérieur ou égal à 10, tandis que les critères d'acceptation concernant l'exactitude et la répétabilité sont élargis (**Tableau VI**).

Par ailleurs, lorsque nécessaire (particules SPP, CLUHP), l'efficacité de la séparation chromatographique a été évaluée par le calcul, pour le pic correspondant à la substance active, du nombre de plateaux théoriques. Cette notion a été définie au chapitre 2.2.1. Nous avons, pour cela, utilisé la formule de la Pharmacopée Européenne, où t_R est le temps de rétention du composé et w_h la largeur du pic à mi-hauteur. [Ph. Eur., 2015]

$$N = 5,54 * (t_R / w_h)^2$$

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Solvants et excipients

Le milieu physiologique hERG a été préparé par dissolution de chlorure de sodium (137mM), chlorure de potassium (4mM), chlorure de calcium (1,8mM), chlorure de magnésium (1mM), D-Glucose (10mM) et HEPES (10mM) dans de l'eau purifiée. Le pH de la solution a été ajusté à 7,40 par ajout d'hydroxyde de sodium 1M. Les chlorures et le glucose ont été fournis par Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne), le tampon HEPES par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, États-Unis) et l'hydroxyde de sodium par VWR (Radnor, PA, États-Unis). Le diméthylsulfoxyde (DMSO) utilisé comme co-solvant provenait de Merck Millipore.

Pour la chromatographie liquide couplée à la détection UV (CL-UV), nous avons utilisé de l'acétonitrile de grade « HPLC », fourni par Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne), tandis que l'acétate d'ammonium provenait de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, États-Unis). Lors des analyses en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM), nous avons choisi de l'acétonitrile de qualité « ULC/MS », acheté auprès de la société Biosolve (Paris, France) et de l'acide formique de grade « MS » provenant de Sigma-Aldrich. L'acétonitrile et le méthanol consommés lors du processus d'extraction en phase solide (SPE) étaient de grade « HPLC » et fournis par Merck Millipore.

3.2.2. Préparation des solutions

Les dix substances actives étudiées appartiennent à UCB Pharma. Des solutions mères d'étalonnage (Cal, pour *calibration*) et de contrôle qualité (QC), de concentration 100µg/mL, ont été préparées dans un mélange d'acétonitrile (ACN) et d'eau purifiée (1/1, v/v). Une solution individuelle a été faite pour chaque molécule étudiée. Les solutions filles « Cal » et « QC » ont été préparées par dilutions successives de ces solutions mères dans un volume adéquat de diluant (H₂O/ACN, 1/1, v/v). Les solutions « Cal » et « QC » des composés très polaires D, E et H ont été, quand mentionné dans ce rapport, préparées dans de l'eau purifiée uniquement. Les solutions standards de contrôle qualité (QC) sont utilisées pour le calcul des taux de recouvrement.

Pour les solutions échantillons, une solution mère a été préparée à une concentration de 10mg/mL dans le DMSO. Une première dilution dans un volume adéquat de milieu physiologique hERG a permis d'atteindre une teneur en DMSO de 0,1 ou 0,3% (v/v) dans les solutions filles. Les solutions échantillons de plus faible concentration ont été ensuite préparées par dilution de cette solution intermédiaire dans un volume suffisant de milieu hERG additionné de 0,1 ou 0,3% (v/v) de DMSO.

3.2.3. Equipements

Les analyses en chromatographie liquide haute performance (CLHP) ont été réalisées sur un système Alliance 2695 conçu par Waters (Milford, MA, Etats-Unis), équipé soit d'un détecteur UV/Visible 2487, soit d'un détecteur à barrette de diodes PDA 2996 possédant, tous deux, un trajet optique de 10mm. La séparation était assurée par une colonne XBridge C18 (Waters) de dimensions 75*4,6mm pour un diamètre de particules de 2,5 μ m. Pour étudier l'efficacité des particules superficiellement poreuses, nous avons travaillé sur une colonne Kinetex C18 (75*4,6mm ; 2,6 μ m) fournie par Phenomenex (Torrance, CA, Etats-Unis). En chromatographie liquide ultra-haute performance, l'équipement utilisé était un système Acquity UPLC fabriqué par Waters (Milford, MA, Etats-Unis) associé à un détecteur à barrette de diodes Acquity PDA et une colonne Acquity UPLC BEH C18 (50*2,1mm ; 1,7 μ m).

Pour les analyses en CL-SM, un même système CLUHP que celui décrit ci-dessus était couplé à un détecteur UV/Visible Acquity TUV et un spectromètre de masse Acquity QDa, tous deux conçus par Waters (Milford, MA, Etats-Unis). Ce détecteur de masse est composé d'une source électrospray (ESI) et d'un analyseur de type simple quadripôle. Nous avons utilisé pour ce système une colonne UPLC HSS T3 (50*2,1mm ; 1,8 μ m) fournie par Waters. Les injections en CL-UV et CL-SM ont été lancées et analysées via le logiciel Empower 2 proposé par la société Waters.

Par ailleurs, pour déterminer l'effet de matrice dû au milieu physiologique lors d'une détection par spectrométrie de masse, nous avons eu recours à un spectromètre TripleQuad® 5500 fabriqué par AB Sciex (Framingham, MA, Etats-Unis). Il est composé d'une source ESI et d'un analyseur de type triple quadripôle. Le détecteur était relié à un système CLUHP Nexera de Shimadzu (Columbia, MD, Etats-Unis) équipé d'une colonne XBridge C18 (50*2,1mm ; 2,5 μ m) fournie par Waters (Milford, MA, Etats-Unis). Le système était muni d'une vanne différentielle placée en amont de la source d'ionisation. Les injections pour ces analyses ont été lancées via le logiciel Analyst® de AB Sciex (Framingham, MA, Etats-Unis).

Enfin, le processus d'extraction en phase solide a été réalisé sur des cartouches Oasis® HLB 1cm³ (30mg) conçues par Waters (Milford, MA, Etats-Unis). Comme vu au paragraphe 2.3.1, les adsorbants polymériques intégrant des groupements polaires permettent une bonne rétention des composés organiques, même hydrophiles. L'extraction a été réalisée en série grâce à l'emploi d'une cuve à vingt ports Vacmaster® de marque Biotage (Uppsala, Suède) munie d'un système d'aspiration sous vide. Pour finir, l'évaporation du solvant d'éluion a été assurée par un évaporateur TurboVap® cinquante positions, développé par Caliper Life Sciences (Hopkinton, MA, Etats-Unis).

3.2.4. Méthodes chromatographiques et spectrométriques

Pour les injections en CLHP-UV, nous avons utilisé un gradient d'une durée totale de 9,0min et un flux de 0,8mL/min. Au temps initial, la composition du gradient était de 90% de phase mobile aqueuse (A) et 10% de phase organique (B), pour atteindre 100% de phase mobile B à $t=6,0$ min. Un temps de rééquilibrage de trois minutes était alors respecté avant l'injection suivante (cf. Annexe 3). Le volume injecté était, par défaut, de 20 μ L. La longueur d'onde de détection, non spécifique, était de 210nm mais a été adaptée au cas par cas selon le spectre UV de la molécule.

La méthode analytique utilisée en CLUHP-UV est dérivée de celle décrite ci-dessus pour la CLHP, en s'adaptant au plus faible volume du système et de la colonne. [Guillarme, 2014 ; Walter et Andrews, 2014] Ainsi, la composition du gradient variait linéairement de 1% à 99% de phase mobile organique (phase B) en 3,0min et était suivi d'un délai de rééquilibrage d'une minute (cf. Annexe 4). Le volume d'injection était de 4 μ L, soit un volume équivalent à 20 μ L dans le système CLHP décrit au paragraphe précédent. Pour la détection, la même longueur d'onde a été utilisée.

La méthode générique développée pour la CLUHP couplée à la spectrométrie de masse a impliqué des modifications pour s'adapter aux spécificités de ce détecteur. Ainsi, le tampon acétate d'ammonium a été remplacé par l'acide formique pour réduire les risques de suppression d'ion. [Antignac *et al.*, 2005 ; Law et Temesi, 2000] Le débit a été réduit à 0,45mL/min afin de diminuer la quantité de solvant à évaporer. La composition du gradient variait de 2% de phase organique au temps initial à 100% après 2,0min. Ce ratio était conservé durant une minute, puis un temps de rééquilibrage (98% de phase aqueuse) d'une minute était attendu avant l'injection suivante (cf. Annexe 5). La détection UV était effectuée à la longueur d'onde définie en CLHP-UV. Pour la spectrométrie de masse, l'ionisation a été réalisée en mode positif (ESI+) ; la température de désolvatation était de 600°C ; le potentiel du capillaire était fixé à 1,2kV et le potentiel du cône variait de 5 à 30V selon le composé étudié. Ces paramètres ont été optimisés pour permettre le gain d'une seule charge positive ($z=1$) tout en prévenant la dissociation de la molécule étudiée. L'acquisition a été réalisée sur un ion de rapport masse/charge (m/z) déterminé (mode SIR), défini pour chaque composé.

Enfin, l'effet de matrice a été étudié sur un spectromètre de masse en tandem. La plus haute sensibilité, par rapport à un simple quadripôle, nous a permis d'injecter un volume très faible d'échantillon (0,1 ou 0,2 μ L selon le composé). De plus, une vanne différentielle permettait de diriger les premiers millilitres élués (contenant théoriquement les sels du milieu physiologique hERG non retenus en phase inverse) vers une élimination, afin de prévenir un encrassement de la source d'ionisation. [Antignac *et al.*, 2005] Les mêmes phases mobiles qu'en SM simple quadripôle (0,1% d'acide formique) ont été utilisées pour cette méthode. Un gradient de 4,5 minutes a été défini, pour lequel la proportion de phase organique variait, de façon non linéaire, de 20% à 100%, suivi d'un rééquilibrage de 1,0min (cf. Annexe 6). La vanne différentielle empêchait le passage du flux élué de la colonne vers la source d'ionisation de

0,0 à 2,0min. L'acquisition a été réalisée sur une paire « ion parent/ion fragment » (mode MRM), définie pour chaque composé.

3.2.5. Traitement de l'échantillon

L'extraction en phase solide (SPE) est une méthode permettant de purifier un échantillon aqueux. Cette technique retient sélectivement les composés organiques, dans notre cas la substance active, et élimine les composés hydrophiles, soit les sels du milieu hERG responsables, en théorie, d'un effet de suppression d'ion en spectrométrie de masse. [Annesley, 2003 ; Rouessac et Rouessac, 2009] Le principe de cette technique est décrit au paragraphe 2.3.1.

Nous avons travaillé sur des cartouches d'extraction d'un volume de 1mL. Le conditionnement était assuré par la percolation de 1mL de méthanol (MeOH), puis 1mL d'eau purifiée. Un millilitre d'échantillon, en milieu physiologique, était ensuite ajouté, permettant la rétention du composé d'intérêt sur l'adsorbant (**Figure 22**). La phase était alors lavée par 1mL d'eau purifiée pour entraîner les sels résiduels. L'élution était enfin réalisée par 2*500µL de solvant organique. Le solvant d'élution était, par défaut, l'acétonitrile (ACN) mais le méthanol ou un mélange ACN/MeOH (1/1, v/v) ont été utilisés quand la récupération était incomplète avec l'acétonitrile seul. Pour évaluer les performances de la technique, les fractions « Dépôt » et « Lavage » ont pu être également récupérées.

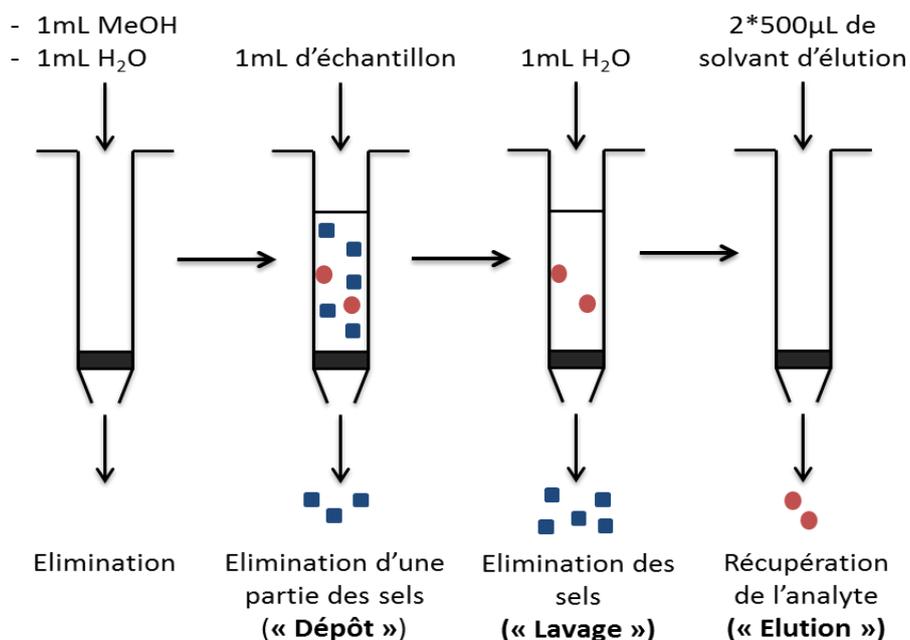


Figure 22 : Procédé d'extraction en phase solide et identification des fractions récoltées
[D'après Pichon, 2006]

Une fois l'échantillon purifié de sa matrice aqueuse, l'analyte se retrouvait dans un solvant entièrement organique. Afin de repasser dans les conditions des solutions standards (eau/acétonitrile), la fraction éluée était soumise à une étape d'évaporation dans un bain à 40°C sous flux de diazote jusqu'à évaporation totale du solvant (environ 30 à 40min étaient nécessaires). Le résidu sec était alors remis en solution dans 1mL d'un mélange H₂O/ACN (1/1, v/v) ou d'eau purifiée pour les composés D, E et H. En partant d'un millilitre d'échantillon déposé dans la cartouche et en reprenant le résidu sec dans le même volume de diluant, l'échantillon conservait sa concentration initiale. Dans le cas de la SPE seule, la fraction éluée était simplement diluée au demi dans l'eau purifiée.

3.3. Résultats

3.3.1. CL-UV

Nous avons débuté notre étude par la chromatographie liquide couplée à la détection UV, approche plus économique à l'achat et plus simple d'utilisation que la spectrométrie de masse. Pour commencer, nous avons réalisé, pour chaque composé, une rapide optimisation de la méthode générique décrite en Annexe 3. Pour se faire, des solutions standards « Cal » et « QC » ont été préparées sur un domaine de concentration de 0,05 à 100µg/mL, et injectées en CLHP-UV. Pour cinq substances actives, nous avons adapté la longueur d'onde d'acquisition afin d'obtenir une meilleure sensibilité : 305nm pour le composé A, 260nm pour les composés B et C, 245nm pour le composé H et 270nm pour le composé J. De même, nous avons modifié, le cas échéant, le diluant (l'eau purifiée pour les molécules D, E et H) et le pH de la phase mobile (porté à 10,0 pour les composés F, H et I). Pour un volume d'injection de 20µL, la limite de quantification s'échelonnait de 0,05µg/mL (composés A, B, C et J) à 1,0µg/mL (substances actives D et E).

3.3.1.1. Effet de matrice

Conformément à notre fil directeur (**Figure 21** au chapitre 3.1), nous avons, en premier lieu, étudié l'existence d'un effet de matrice en CLHP-UV. Nous avons préparé, pour chaque composé, une gamme de cinq concentrations dans le milieu physiologique hERG allant de la limite basse (LQ) à une limite haute de quantification (choisie telle que l'intensité du signal ne dépasse pas une unité d'absorption, cf. Annexe 7). En raison de la faible solubilité de certains composés très hydrophobes, la concentration maximale a parfois dû être abaissée (jusqu'à 1,0µg/mL pour les molécules A et B). L'exactitude a été mesurée en prenant pour référence trois injections d'une solution « Cal » de même concentration (préparée dans l'eau purifiée pour les composés D, E et H).

En se basant sur un critère de 95,0 à 105,0%, nous pouvons considérer qu'aucun effet de matrice n'est observé pour neuf substances actives (**Figure 23**). Cependant, pour le composé B, très apolaire, le taux de recouvrement est relativement peu élevé (94,5%), y compris à basse concentration (0,5µg/mL). Ce résultat peut être causé par la très faible solubilité aqueuse de cette substance et nous n'avons donc pas considéré que la réduction du signal soit due à un effet de matrice. Par ailleurs, le signal était linéaire ($R \geq 0,99$) pour tous les composés, dilués dans le milieu physiologique, sur le domaine défini ci-dessus. Le coefficient de variation (sur trois injections) n'excédait pas 1,5% à la plus haute concentration (1,0% pour le composé J) et était bien inférieur à 10,0% à la limite de quantification (4,0% pour le composé C). Les résultats relatifs à cet essai sont présentés en Annexe 7.

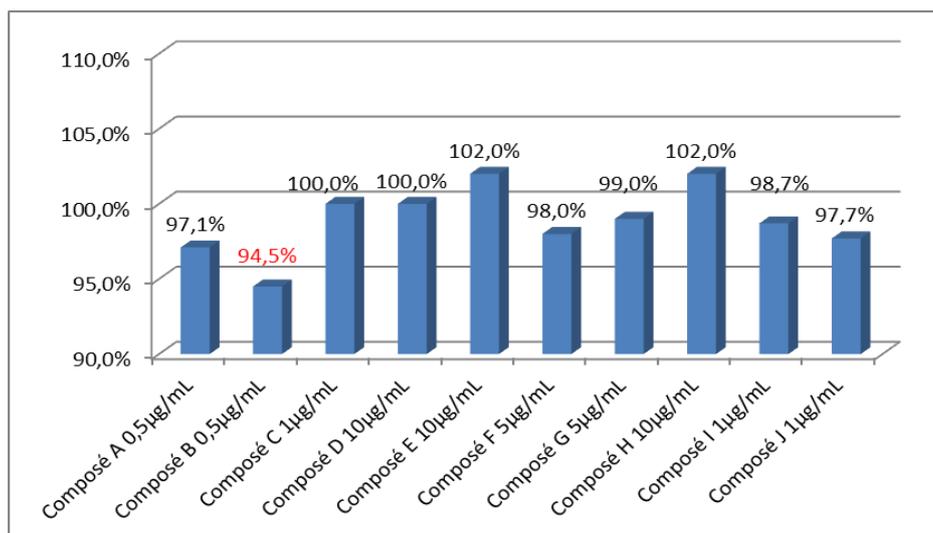


Figure 23 : Taux de recouvrement (%) de solutions hERG par rapport à une solution « Cal » de même concentration en CLHP-UV

Au regard de ces résultats, un prétraitement de l'échantillon ne semble pas nécessaire. Nous pouvons donc considérer que les résultats obtenus en CL-UV avec des solutions standards (Cal ou QC) sont transposables aux échantillons en milieu physiologique hERG, sous réserve d'une solubilité suffisante du composé. La question qui nous intéresse à présent est de savoir s'il est possible d'atteindre un niveau de sensibilité de $0,01\mu\text{M}$ (2 à 4ng/mL sur notre panel de composés) avec un détecteur UV. Deux approches ont été étudiées en ce sens : augmenter le volume d'injection et améliorer l'efficacité de la séparation.

3.3.1.2. Augmenter le volume d'injection

La méthode générique présentée en Annexe 3 nous permet, au mieux, de quantifier une concentration de $0,05\mu\text{g/mL}$ (50ng/mL). Pour obtenir une meilleure sensibilité, sans avoir recours à la spectrométrie de masse, notre première idée a été d'augmenter le volume d'injection, qui est, par défaut, de $20\mu\text{L}$. Pour cette expérience, nous avons injecté une même solution « Cal », de concentration intermédiaire (5 ou $10\mu\text{g/mL}$), à des volumes de 5, 10, 20, 50 et $100\mu\text{L}$ (volume de la boucle d'injection de notre système) et avons étudié la linéarité du signal, ainsi que l'aspect visuel du pic chromatographique. En effet, un volume d'injection trop élevé peut générer une surcharge de la colonne et une déformation du pic chromatographique. [Snyder *et al.*, 1997 ; Walter et Andrews, 2014] L'exemple du composé B est présenté ci-dessous (**Figure 24**).

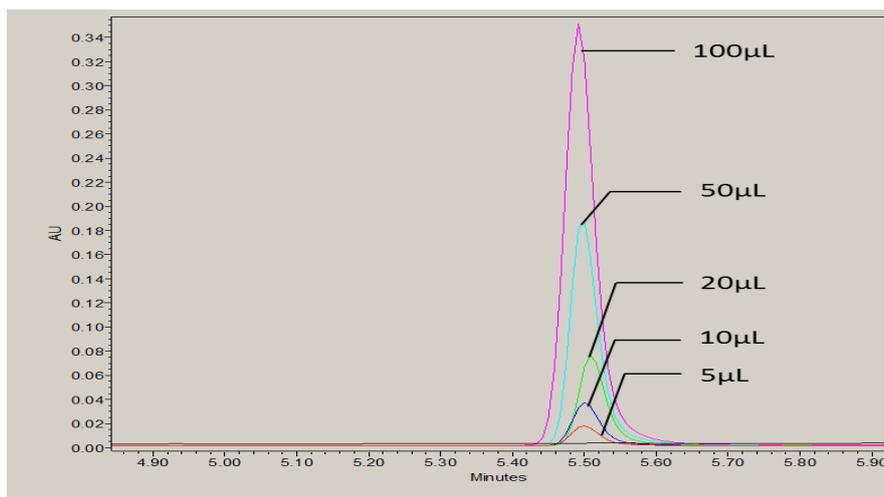


Figure 24 : Injections de 5 à 100µL d’une solution de composé B à 5µg/mL en CLHP-UV

Pour neuf des dix composés étudiés, le pic présentait visuellement un profil gaussien au volume maximal et les aires étaient linéaires sur une gamme de volume d’injection de 5 à 100µL (**Tableau VII**). Pour les composés D, E et H, ce résultat a été obtenu à partir de solutions diluées dans l’eau purifiée. En revanche, la substance active C était la seule à présenter un pic déformé pour un volume de 100µL. Nous avons donc été obligés de nous limiter à 50µL pour ce composé. La limite de quantification (LQ) est abaissée de cinq fois en augmentant le volume d’injection d’un même facteur (de 20 à 100µL). Toutefois, une concentration inférieure à 10ng/mL n’a jamais pu être quantifiée (**Tableau VII**). Le rapport signal/bruit y était en effet inférieur à 10, y compris pour les composés absorbant le plus en UV (substances A, B et C). Par conséquent, la CLHP-UV « classique » ne nous a pas permis d’atteindre la sensibilité désirée. Nous avons donc poursuivi notre étude par l’évaluation d’approches permettant d’améliorer l’efficacité avec, en premier lieu, l’utilisation de colonnes remplies de particules superficiellement poreuses.

Tableau VII : Essais d’augmentation du volume en CLHP-UV

	Concentration étudiée (µg/mL)	Aspect visuel du pic à 100µL	Domaine de linéarité	LQ (µg/mL)
Composé A	5	Acceptable	5 à 100µL	0,01
Composé B	5	Acceptable	5 à 100µL	0,01
Composé C	5	Déformé	5 à 50µL	0,01
Composé D	10	Acceptable	5 à 100µL	0,2
Composé E	10	Acceptable	5 à 100µL	0,2
Composé F	10	Acceptable	5 à 100µL	0,2
Composé G	10	Acceptable	5 à 100µL	0,2
Composé H	5	Acceptable	5 à 100µL	0,05
Composé I	5	Acceptable	5 à 100µL	0,1
Composé J	5	Acceptable	5 à 100µL	0,02

3.3.1.3. Particules superficiellement poreuses (SPP)

Pour évaluer l'apport de ce nouveau type de phase stationnaire sur l'efficacité et la sensibilité, nous avons repris les mêmes conditions chromatographiques que lors de l'expérience précédente : un volume d'injection de 100 μ L (50 μ L pour le composé C) et l'eau purifiée comme diluant des solutions « Cal » et « QC » des composés D et E. Le composé H n'a pu être étudié car la colonne à particules superficiellement poreuses (SPP) utilisée est limitée à un pH de 8,5 en mode gradient. Les molécules F et I, moins impactées par les conditions chromatographiques acides, ont été injectées à pH 4,5. Les résultats sont comparés à ceux obtenus sur une colonne à particules entièrement poreuses à partir des mêmes solutions (**Tableau VIII**). Pour rappel, une augmentation de l'efficacité de la séparation de l'ordre de 30 à 50% est attendue avec l'emploi de particules superficiellement poreuses. [Gritti et Guiochon, 2012 ; Walter et Andrews, 2014]

Tableau VIII : Effet de l'utilisation des particules superficiellement poreuses en mode gradient

	Conc. haute (μ g/mL)	Particules entièrement poreuses		Particules superficiellement poreuses		
		N	LQ (μ g/mL)	N	Variation de N	LQ (μ g/mL)
Composé A	5	37 000	0,01	33 000	-11%	0,01
Composé B	2,5	45 000	0,01	42 000	-7%	0,01
Composé C	5	31 000	0,01	18 000	-42%	0,01
Composé D	10	25 000	0,2	32 000	+28%	0,2
Composé E	10	27 000	0,2	34 000	+26%	0,2
Composé F	5	27 000	0,2	22 000	-19%	0,2
Composé G	5	38 000	0,2	12 000*	-68%	0,2
Composé H	N/A : impossible d'injecter en gradient à pH 10,0 sur la colonne <i>core-shell</i>					
Composé I	5	54 000	0,2	55 000	+2%	0,2
Composé J	5	47 000	0,02	52 000	+11%	0,02

* Pic déformé, début de dédoublement

A l'exception du composé G, qui a subi un début de dédoublement, le pic d'intérêt a toujours présenté un aspect gaussien (estimé par le calcul du facteur de symétrie). En revanche, une augmentation du nombre de plateaux théoriques de l'ordre de 30% n'a été obtenue que pour les deux substances les plus polaires (composés D et E). Cependant, l'augmentation du rapport signal/bruit était insuffisante pour améliorer significativement la sensibilité. En effet, la limite de quantification (plus basse concentration pour laquelle le rapport S/N est supérieur à 10) est restée constante (0,2 μ g/mL). Pour quatre molécules (A, B, I et J), le nombre de

plateaux théoriques était sensiblement le même. Enfin, contrairement à nos attentes, les séparations des composés C et F ont subi une perte significative d'efficacité (42% pour la molécule C), sans toutefois impacter la limite de quantification (**Tableau VIII**).

L'utilisation de particules superficiellement poreuses n'a donc pas permis d'améliorer la sensibilité, dans le cas de notre étude, quand le mode gradient a été utilisé. Afin de compléter l'étude de ces colonnes, nous avons réalisé une seconde comparaison en mode isocratique. Pour se faire, nous avons dû, au préalable, déterminer le ratio de phase mobile (aqueuse/organique) optimal pour chacune des dix molécules, à partir de son temps de rétention en gradient. Par ailleurs, le volume d'injection a été diminué pour les composés apolaires pour s'adapter à ces nouvelles conditions chromatographiques (cf. Annexe 8). La linéarité de la limite de quantification à la concentration haute (cf. **Tableau IX**), la répétabilité et l'exactitude ont été démontrées conformes aux critères d'acceptation.

A l'exception du composé G, toutes les molécules ont présenté une amélioration significative de l'efficacité. Pour sept substances actives, le nombre de plateaux théoriques a ainsi été augmenté de l'ordre de 30 à 50%, conformément au résultat attendu (**Tableau IX**). [Gritti et Guiochon, 2012 ; Walter et Andrews, 2014] Les composés H et I, étudiés à pH basique, présentaient même un nombre de plateaux théoriques doublé par rapport à une séparation sur particules entièrement poreuses. L'impact positif des particules superficiellement poreuses sur l'efficacité de la séparation chromatographique en mode isocratique a donc été clairement démontré.

Tableau IX : Effet de l'utilisation des particules superficiellement poreuses en mode isocratique

	Conc. haute (µg/mL)	Particules entièrement poreuses		Particules superficiellement poreuses		
		N	LQ (µg/mL)	N	Variation de N	LQ (µg/mL)
Composé A	5	4 500	0,01	5 800	+29%	0,01
Composé B	2,5	4 100	0,02	5 600	+37%	0,01
Composé C	5	1 900	0,01	2 500	+32%	0,01
Composé D	10	9 000	0,1	11 000	+22%	0,1
Composé E	10	9 000	0,1	12 000	+33%	0,1
Composé F	5	4 500	0,4	6 800	+51%	0,2
Composé G	5	4 000	0,4	4 500	+13%	0,2
Composé H	5	7 000	0,05	16 000	+129%	0,02
Composé I	5	2 000	0,3	3 900	+95%	0,3
Composé J	5	5 500	0,02	8 000	+45%	0,02

Cependant, l'effet sur la sensibilité est resté modéré. Le chromatogramme ci-dessous (**Figure 25**) montre l'exemple du composé C, injecté sur les deux types de colonne. Si avec une colonne à particules SPP le pic du composé était plus fin et plus haut d'environ 25%, le rapport signal/bruit n'était que faiblement augmenté et ne permettait donc pas d'abaisser significativement la limite de quantification. Dans notre étude, une meilleure sensibilité a été obtenue pour quatre analytes, dont le composé G qui présentait, paradoxalement, peu d'augmentation du nombre de plateaux théoriques. Le composé H a montré l'abaissement le plus important de la limite de quantification (de 0,05 à 0,02 μ g/mL), en accord avec la spectaculaire augmentation de l'efficacité (+129%).

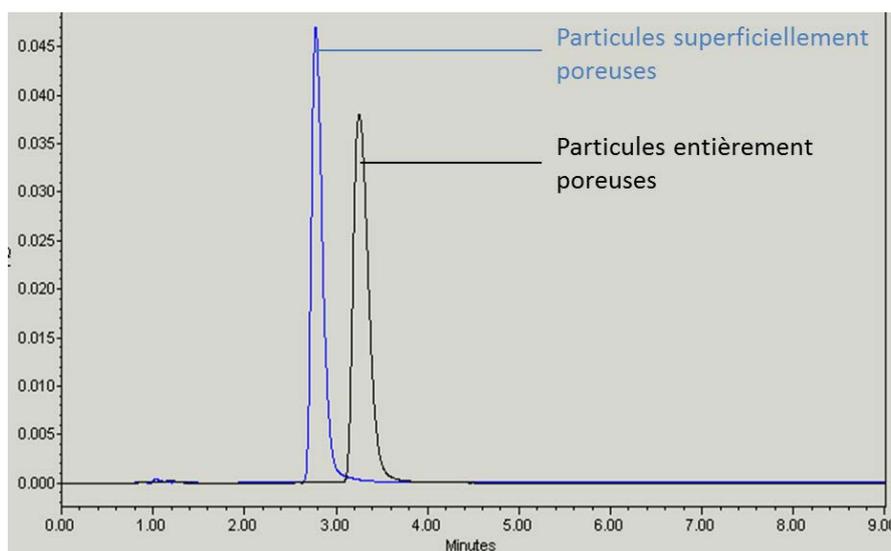


Figure 25 : Solution de composé C 5 μ g/mL injectée sur colonne C18 classique et sur colonne « SPP » en mode isocratique

En conclusion, l'effet sur l'efficacité des particules à noyau solide a été principalement observé en mode isocratique avec une augmentation significative du nombre de plateaux théoriques pour neuf des dix molécules (**Tableau IX**). En mode gradient, cette amélioration ne concernait que les composés D et E, soit ceux possédant le temps de rétention le plus court (**Tableau VIII**). Cependant cette approche ne permet pas systématiquement de gagner en sensibilité. De plus, les limites de quantification les plus basses restent de l'ordre de 10ng/mL (composés A, B, C, H et J), soit une sensibilité équivalente à celle obtenue en gradient avec un volume de 100 μ L (cf. **Tableau VII** au paragraphe précédent). Ces résultats restent inférieurs au niveau de sensibilité maximal requis pour l'analyse des échantillons hERG (2 à 4ng/mL). Nous nous sommes donc intéressés à une seconde voie permettant d'améliorer l'efficacité, à savoir la chromatographie liquide ultra-haute performance.

3.3.1.4. Chromatographie liquide ultra-haute performance (CLUHP)

L'utilisation d'un système ultra-haute performance permet, notamment, l'emploi de particules poreuses de diamètre inférieur à 2 μ m. [Guillarme, 2014] Les dix substances actives de notre panel représentatif ont été ainsi étudiés sur une gamme de concentration de 0,05 à 100 μ g/mL dans un mélange H₂O/ACN (1/1, v/v) et à un pH de 4,5. Pour toutes, le signal était linéaire sur un domaine de concentration allant de la limite de quantification (LQ, cf. **Tableau X**) à 100 μ g/mL. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus en CLHP sur un détecteur à barrette de diodes (comparable à celui utilisé en CLUHP) et avec une colonne remplie de particules de 2,5 μ m de diamètre (1,7 μ m en CLUHP).

Comme attendu, l'efficacité de la séparation a été significativement supérieure en CLUHP-UV par rapport à la CLHP-UV à volume équivalent pour neuf molécules (**Tableau X**). Le nombre de plateaux théoriques a ainsi été augmenté de 26 à 70% selon l'analyte. Notons cependant qu'aucun effet significatif n'a été observé pour le composé F. En revanche, la limite de quantification (LQ), plus basse concentration pour laquelle le rapport S/N est supérieur à 10, était la même en CLHP et en CLUHP, à l'exception du composé J. Par ailleurs, ni la répétabilité, ni l'exactitude n'ont été impactées par le plus faible volume injecté. En résumé, la chromatographie liquide ultra-haute performance n'offre pas de gain en sensibilité à volume équivalent. Elle permet toutefois de diminuer le temps d'analyse (quatre minutes au lieu de neuf en CLHP), la consommation de solvant, et le volume d'injection (intéressant si le volume d'échantillon disponible est faible).

Tableau X : Comparaison de l'efficacité et de la sensibilité en CLHP-UV et CLUHP-UV

	λ (nm)	CLHP-UV (20 μ L)		CLUHP-UV (4 μ L)		
		N*	LQ (μ g/mL)	N*	Variation de N	LQ (μ g/mL)
Composé A	305	45 000	0,05	60 000	+33%	0,05
Composé B	260	45 000	0,05	62 000	+38%	0,05
Composé C	260	29 000	0,05	48 000	+66%	0,05
Composé D	210	23 000	1,0	32 000	+39%	1,0
Composé E	210	25 000	1,0	32 000	+28%	1,0
Composé F	210	35 000	1,0	37 000	+6%	1,0
Composé G	210	36 000	1,0	48 000	+33%	1,0
Composé H	245	4 000	0,1	6 000	+50%	0,1
Composé I	210	50 000	1,0	63 000	+26%	1,0
Composé J	270	40 000	0,05	68 000	+70%	0,1

* Le nombre de plateaux théoriques est calculé pour une concentration de 10 μ g/mL.

Par la suite, comme en CLHP, nous avons essayé d'injecter des volumes d'échantillon plus importants, à savoir 7 μ L (l'équivalent d'un volume de 50 μ L en CLHP) et 10 μ L (le volume de la boucle d'injection sur notre équipement). Nous avons choisi une concentration intermédiaire de 1,0 μ g/mL. Pour les dix molécules, l'aspect visuel du pic était acceptable (gaussien et non déformé) au volume d'injection maximal, y compris pour les composés les plus polaires (D, E et H) bien que le solvant soit un mélange eau/acétonitrile. Nous en avons donc conclu qu'un volume plus important pouvait être injecté en CLUHP sans devoir adapter le diluant des solutions standards. Une linéarité des aires de 4 à 10 μ L (avec un coefficient de corrélation supérieur ou égal à 0,9) a pu être établie. Toutefois, aucun abaissement de la limite de quantification en-dessous de 10ng/mL n'a pu, à nouveau, être obtenu.

3.3.1.5. Sensibilité atteinte en CL-UV

Différentes approches, disponibles en interne, ont donc été évaluées sur notre gamme de dix substances actives afin d'améliorer la sensibilité de cette approche et essayer d'obtenir une limite de quantification de 0,01 μ M (2 à 4ng/mL). Le **tableau XI** ci-dessous dresse un bilan, pour chaque molécule, des concentrations les plus basses que nous avons pu quantifier en CL-UV (avec une précision et une exactitude satisfaisantes). En regard sont données les approches analytiques nous ayant permis d'obtenir ce résultat. Pour cinq composés (A, B, C, H et J), une sensibilité inférieure à 0,1 μ M (0,03 à 0,06 μ M) a été atteinte. Ces molécules présentent la particularité de posséder une longueur d'onde d'absorption spécifique en UV au-delà de 240nm. Les cinq autres substances actives, qui ne possèdent pas d'absorbance spécifique, étaient quantifiables à 1 μ M, voire 0,3 μ M (composés F, G et I).

Une courte optimisation de notre méthode générique a permis d'obtenir ces résultats : augmentation du volume d'injection, modification du pH de la phase mobile pour les composés à caractère basique (F et H) ou du solvant de dilution pour les composés polaires (D, E et H). Les colonnes contenant des particules superficiellement poreuses ont offert un gain en sensibilité inégal entre les molécules et permis un abaissement de la limite de quantification uniquement en mode isocratique (composés B et H dans ce tableau). Enfin, la chromatographie liquide ultra-haute performance a permis d'obtenir une limite de quantification plus basse (pour un volume de 10 μ L), uniquement dans le cas du composé G. Toutefois, aucune de ces approches n'a permis d'atteindre une concentration de 0,01 μ M. Nous allons à présent voir si un tel niveau de sensibilité peut être atteint par l'utilisation en tant que détecteur d'un spectromètre de masse (SM) simple quadripôle.

Tableau XI : Sensibilité atteinte en CL-UV et conditions analytiques correspondantes

	λ (nm)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)	LQ (μM)	Conditions analytiques
Composé A	305	0,01	0,03	CLHP gradient 100 μL / CLHP isocratique 20 μL
Composé B	260	0,01	0,03	CLHP gradient 100 μL / CLHP isocratique 20 μL (particules SPP)
Composé C	260	0,01	0,03	CLHP gradient 50 μL / CLHP isocratique 20 μL
Composé D	210	0,1	0,5	CLHP isocratique 100 μL (dans H ₂ O)
Composé E	210	0,1	0,4	CLHP isocratique 100 μL (dans H ₂ O)
Composé F	210	0,1	0,3	CLHP gradient 100 μL , pH 10,0 / CLUHP gradient 10 μL
Composé G	210	0,1	0,3	CLUHP gradient 10 μL
Composé H	245	0,02	0,06	CLHP gradient 100 μL , pH 10,0 (H ₂ O) / CLHP isocratique 20 μL , pH 10,0 (particules SPP, dans H ₂ O)
Composé I	210	0,1	0,2	CLHP gradient 100 μL , pH 10,0 / CLUHP gradient 10 μL
Composé J	270	0,02	0,04	CLHP gradient 100 μL / CLHP isocratique 20 μL

3.3.2. CL-SM

3.3.2.1. Effet de matrice

Pour atteindre une sensibilité de l'ordre de $0,01\mu\text{M}$, nous avons poursuivi notre étude par l'évaluation du couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (simple quadripôle). De la même façon qu'en CL-UV, nous avons commencé par étudier l'existence d'un effet de matrice et, plus particulièrement, d'un effet de suppression d'ion. Les sources d'ionisation par électro-nébulisation sont, en effet, très sensibles à ce phénomène. [Annesley, 2003 ; Antignac *et al.*, 2005] Notre spectromètre de masse n'étant pas équipé d'une vanne différentielle et pour éviter un encrassement de la source d'ionisation par les sels du milieu hERG, l'effet de matrice en CL-SM a été évalué sur un spectromètre de masse en tandem (triple quadripôle) muni d'une telle vanne et du même type de source d'ion (ESI). En raison du manque de disponibilité de cet appareil, les essais n'ont été réalisés que sur les composés B et C. Le volume d'injection a été réduit à quelques dixièmes de microlitres en raison de la forte intensité du signal à 500ng/mL .

Tableau XII : Etude de l'effet de matrice en CL-SM/SM pour les composés B et C

	Composé B			Composé C		
	Cal	QC	hERG	Cal	QC	hERG
Volume d'injection	0,2 μL			0,1 μL		
Linéarité ($R \geq 0,99$)	4 à 500 ng/mL	ND	4 à 500 ng/mL	4 à 500 ng/mL	ND	4 à 500 ng/mL
Rapport S/N à 4ng/mL	24	ND	6	62	ND	36
CV à 4ng/mL	4,6%	ND	1,2%	7,8%	ND	3,4%
CV à 500ng/mL	0,2%	ND	2,1%	1,0%	ND	6,0%
r à 4ng/mL	N/A	ND	23%	N/A	ND	42%
r à 500ng/mL	N/A	104%	36%	N/A	103%	65%

En se basant sur le calcul du taux de recouvrement (r) et du rapport signal/bruit (S/N), nous avons observé, pour les deux composés, une très importante réduction du signal lorsque la matrice était le milieu physiologique hERG. Celle-ci a atteint plus de 75% ($r = 23\%$) pour la molécule B à une concentration de 4ng/mL (soit $0,01\mu\text{M}$) et environ 60% pour le composé C (**Tableau XII**). A la concentration la plus haute injectée, soit 500ng/mL , le taux de recouvrement était meilleur bien que très largement en-dessous du critère de 95,0% (65% au maximum pour le composé C). Ces résultats ont donc confirmé l'existence d'un effet de suppression d'ion important causé par les composés non-volatils du milieu hERG, malgré l'utilisation d'une vanne différentielle. De plus, le phénomène s'aggrave quand la concentration en substance active diminue. En conséquence, il ne peut être envisagé

d'injections d'échantillons en CL-SM sans purification préalable. En revanche, la linéarité est peu impactée par l'effet de matrice, la valeur du coefficient de corrélation restant conforme ($R \geq 0,99$) quel que soit le diluant. Concernant la répétabilité, les coefficients de variation élevés, observés tant pour les solutions d'étalonnage (Cal) que pour les échantillons, peuvent être imputés au très petit volume injecté. Nous ne pouvons l'attribuer à l'effet de suppression d'ion.

Pour aller plus loin dans l'étude de l'effet de matrice, nous avons voulu évaluer l'impact d'une dilution au dixième de l'échantillon dans un solvant organique. Pour cela, une solution échantillon de chaque substance (B et C), à une concentration de 40ng/mL, a été diluée dix fois soit dans le milieu physiologique hERG, soit dans un mélange d'eau et d'acétonitrile (1/1, v/v) de façon à obtenir une concentration finale de 4ng/mL. Ces solutions diluées ont été injectées en CL-SM/SM et un taux de recouvrement a été calculé en prenant comme référence une solution standard (Cal) à 4ng/mL. Nous avons obtenu ainsi, pour les solutions échantillons diluées dans le solvant organique, un taux de recouvrement proche de 100% (**Figure 26**). Ces dernières contenaient pourtant toujours 10% (v/v) de milieu physiologique. Le taux de recouvrement était inférieur à 50% pour les solutions en milieu hERG. Le phénomène de suppression d'ion a donc été entièrement corrigé par ce procédé.

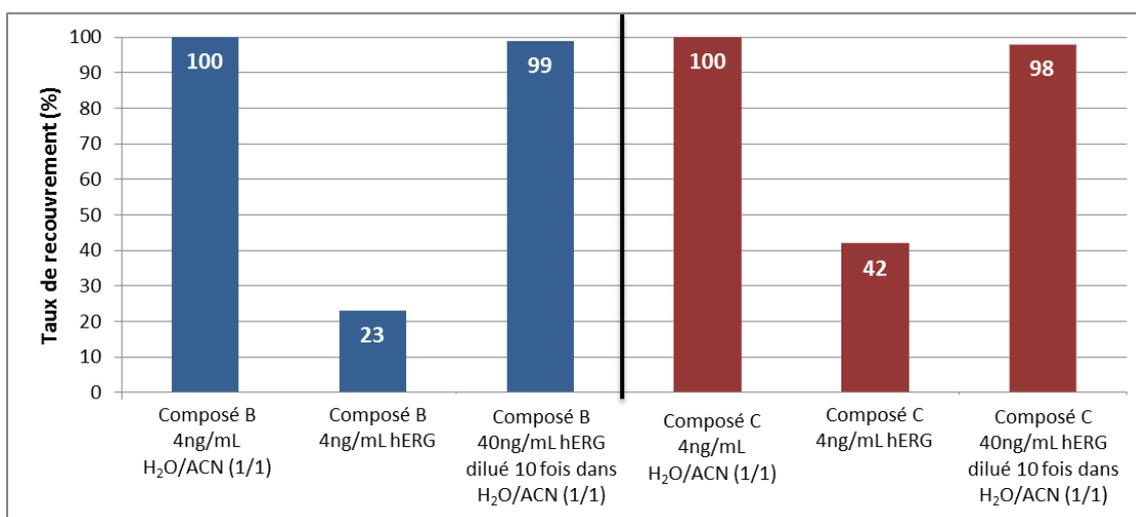


Figure 26 : Effet d'une dilution au 1/10^{ème} de l'échantillon hERG dans un solvant organique sur la réponse en CL-SM/SM

Au sein du laboratoire, une dilution des échantillons dans un solvant organique préalablement à leur analyse par CL-SM/SM a déjà été employée (avec succès) pour l'établissement de méthodes de dosage des échantillons hERG. Nous n'y reviendrons donc pas au cours de cette étude. Notre objectif est, en effet, d'évaluer les performances de méthodes alternatives à la spectrométrie de masse en tandem. Par ailleurs, nous ne pouvons affirmer avec certitude que cette approche serait applicable à un simple quadripôle (équipé d'une vanne différentielle).

3.3.2.2. Atteindre la sensibilité requise (CLUHP-SM)

Une purification des échantillons est donc nécessaire avant toute injection en CL-SM pour éviter une diminution du signal due aux sels du milieu HERG. Néanmoins, avant de nous intéresser à la technique d'extraction en phase solide (SPE), nous souhaitons d'abord évaluer si notre détecteur de masse simple quadripôle pouvait nous permettre d'atteindre le niveau de sensibilité espéré ($0,01\mu\text{M}$). En mode gradient, les particules superficiellement poreuses n'ont pas démontré d'amélioration conséquente en termes d'efficacité et de sensibilité (cf. 3.3.1.3). Nous n'avons donc pas jugé nécessaire de les réévaluer en CL-SM. En revanche, comme nous l'avons vu au paragraphe 3.3.1.4, la chromatographie liquide ultra-haute performance (CLUHP) permet de réduire le volume d'injection sans impacter la réponse de l'analyte. Une plus petite quantité de solvant atteignant la source d'ionisation associée à un débit de phase mobile réduit permettent, de plus, de diminuer le bruit de fond et le risque d'éventuelles interférences. [Guillarme, 2014 ; Zhao et Li, 2014] Nous pouvons donc espérer une augmentation du rapport signal/bruit par rapport à un CLHP « classique ». La haute fréquence d'acquisition de notre détecteur de masse intuitif nous permet de le coupler à la CLUHP (cf. chapitre 2.2.2).

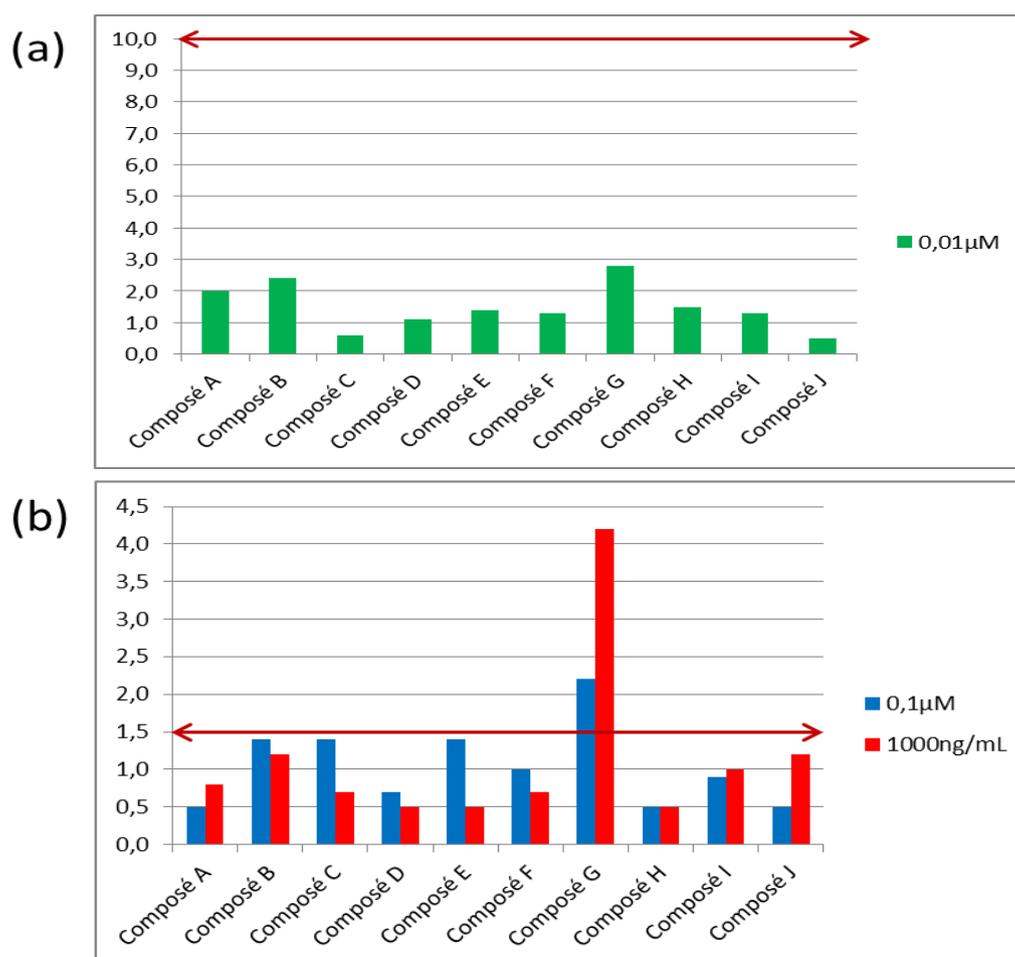


Figure 27 : Coefficients de variation sur trois injections de solutions Cal en CL-SM

La linéarité, la répétabilité, l'exactitude et la limite de quantification ont été évaluées pour développer une méthode générique en CLUHP-SM. Les solutions étudiées (Cal et QC) étaient diluées dans un mélange H₂O/ACN (1/1, v/v). Les résultats complets de cette expérience sont rassemblés en Annexe 9. Premièrement, pour les dix substances actives de notre étude, un rapport signal/bruit (S/N) supérieur à 10 a pu être obtenu à la concentration de 0,01µM (soit de 2 à 4ng/mL selon la masse moléculaire du composé). De plus, un coefficient de corrélation supérieur ou égal à 0,99 a été calculé sur un domaine allant de 0,01µM à 1000ng/mL (avec un minimum de cinq points de gamme). En ce qui concerne la répétabilité, et à l'exception notable du composé G, le coefficient de variation (CV), calculé sur trois injections, n'excédait jamais 1,5%, tant à 0,1µM (20 à 40ng/mL selon la molécule) qu'à 1000ng/mL (**Figure 27b**). De même, à la limite de quantification, ce coefficient était très inférieur à 10,0%, y compris pour la molécule G (**Figure 27a**).

L'exactitude a été évaluée pour sept molécules, à 0,1µM et 1000ng/mL (**Figure 28**). Les taux de recouvrement calculés se situaient tous dans l'intervalle 95,0 - 105,0% ou très proche (105,7% pour une solution de composé F à 1000ng/mL). Au niveau de la limite de quantification visée (0,01µM), les sept taux de recouvrement calculés étaient compris entre 95,5% (composé H) et 102,3% (molécule C), donc largement dans l'intervalle 90,0 - 110,0% que nous avons défini à ce niveau (cf. Annexe 9). Par ailleurs, nous avons réalisé trois injections de « blanc » (H₂O/ACN, 1/1, v/v) directement après une injection de la solution la plus concentrée afin de quantifier une contamination résiduelle (*carry-over*). Pour les dix composés, nous n'avons observé, au temps de rétention de la molécule, aucun signal supérieur ou égal à celui mesuré dans la solution la plus diluée (0,01µM).

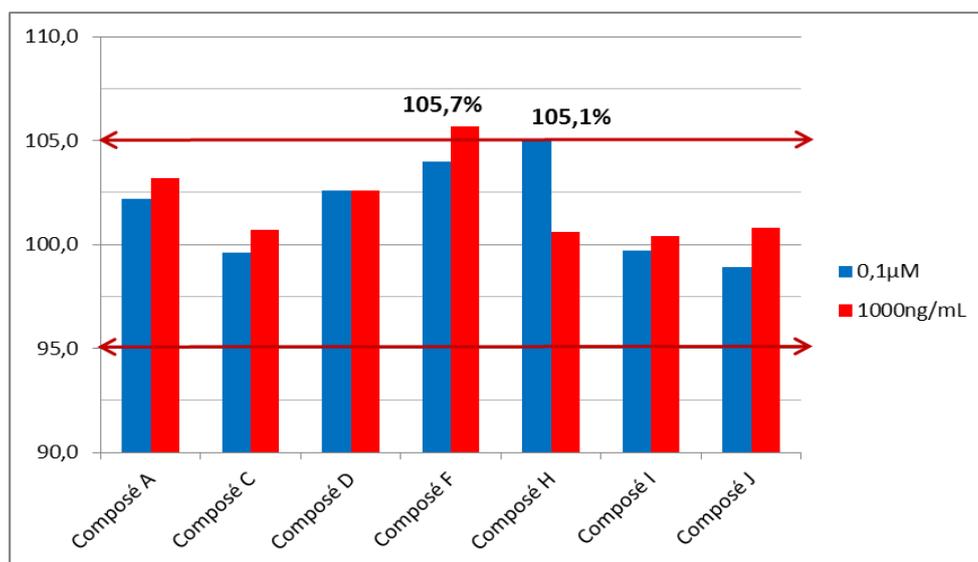


Figure 28 : Taux de recouvrement moyen sur trois injections de solutions QC en CL-SM

En conclusion, la chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse simple quadripôle a satisfait, sans nécessité d'un standard interne, tous les critères de performance définis en interne (cf. **Tableau VI** au chapitre 3.1). Une concentration de 0,01 μ M a ainsi pu, pour toutes les substances actives de notre panel, être quantifiée avec une bonne exactitude et répétabilité. Le développement, à partir de cette méthode générique, ne requiert que la détermination, au niveau de la source d'ionisation, du potentiel (*Cone Voltage*) idéal permettant l'acquisition d'une charge positive sans dissociation de la molécule. Pour le composé F uniquement, le pic présentait, en raison des conditions très acides, un élargissement trop important. L'acide formique a donc été remplacé, dans ce cas, par un tampon acétate d'ammonium (5mM). Le niveau de sensibilité requis ayant été atteint pour tous les composés, il n'est pas nécessaire d'augmenter le volume d'injection. Cependant, au vu de l'important effet de suppression d'ion généré par les sels du milieu hERG, il reste primordial de définir une technique de purification des échantillons.

3.3.2.3. Extraction en phase solide (SPE seule)

Pour purifier les échantillons avant analyse, notre choix s'est porté sur l'extraction en phase solide, bien adaptée au traitement d'échantillons aqueux (cf. chapitre 2.3). Nous nous sommes d'abord intéressés au seul procédé d'extraction, en négligeant les étapes d'évaporation du solvant d'élution et de remise en solution (cf. 3.2.5). Pour juger de la faisabilité de cette technique dans le cas particulier des études hERG, nous avons évalué deux critères majeurs, à savoir l'élimination des sels générant la suppression d'ion et le rendement d'extraction, soit le pourcentage de soluté récupéré en fin de processus. Nous avons, pour ce dernier point, imposé un critère de recouvrement de 95,0 à 105,0%. Cette étude a été réalisée en CLHP-UV, dont le signal n'est pas impacté par la présence éventuelle de sels résiduels. Le volume d'injection était 20 μ L.

Deux raisons majeures peuvent expliquer un mauvais rendement. Dans le cas d'une molécule polaire, une faible affinité du soluté pour l'adsorbant peut entraîner une élution de l'analyte lors des étapes de « dépôt » et de « lavage » (cf. **Figure 22** au chapitre 3.2.5). A l'opposé, une affinité trop importante pour la phase polymérique peut causer une rétention résiduelle des composés très apolaires après l'étape finale d'élution. [Pichon, 2006] Le solvant d'élution a ainsi dû être modifié pour cinq molécules (cf. **Tableau XIII** ci-dessous). Pour étudier ces deux phénomènes, nous avons travaillé à deux niveaux de concentration (haute et basse) et récolté la fraction élue. A la concentration haute, choisie de manière à pouvoir quantifier une perte de 1,0%, les fractions « dépôt » et « lavage » ont aussi été récupérées.

La fraction éluee (1mL) a été mélangée à un même volume d'eau purifiée avant injection. Puis, le signal a été quantifié en prenant comme référence la solution échantillon de départ (dont un millilitre avait été percolé dans le processus d'extraction) diluée au demi dans le milieu hERG. Les résultats, à la concentration haute, ont été rassemblés dans le **tableau XIII** ci-dessous. En premier lieu, aucune perte significative ($\geq 1,0\%$) n'a été observée lors des étapes de dépôt de l'échantillon, puis de rinçage de l'adsorbant. Pour sept composés, aucun

signal n'a été détecté dans ces fractions. Pour les molécules B, E et H, la perte s'est élevée, au maximum, à 0,4% (soit 40ng) pour le composé H sur l'ensemble des deux fractions. Ensuite, le taux de récupération dans la fraction éluée était compris, pour tous les composés, polaires comme apolaires, entre 96,9% et 103,6%. Nous pouvons donc considérer que la totalité du produit a été récupérée en fin de processus.

Tableau XIII : Taux de récupération par fraction après SPE seule à haute concentration

	Concentration étudiée (µg/mL)	Solvant d'éluion	Taux de recouvrement par fraction		
			« Dépôt » (%)	« Lavage » (%)	« Elution » (%)
Composé A	1,0	ACN/MeOH (1/1)	ND	ND	103,6
Composé B	2,5	ACN/MeOH (1/1)	ND	0,2 (5ng/mL)	97,2
Composé C	5	ACN/MeOH (1/1)	ND	ND	98,5
Composé D	10	ACN	ND	ND	101,2
Composé E	10	ACN	0,3 (30ng/mL)	ND	99,1
Composé F	5	ACN	ND	ND	96,9
Composé G	5	ACN/MeOH (1/1)	ND	ND	99,0
Composé H	10	ACN	0,2 (20ng/mL)	0,2 (20ng/mL)	97,3
Composé I	5	ACN	ND	ND	99,2
Composé J	5	MeOH	ND	ND	97,9

La concentration basse étudiée variait de 0,1 à 1,0µg/mL, selon la réponse du composé en UV. Elle a été calculée pour être au moins deux fois supérieure à la limite de quantification (pour un volume de 20µL). A ce niveau, le taux de récupération était, pour sept composés, compris entre 96,2 et 104,8% (**Figure 29**). Le recouvrement des molécules A et F dépassait légèrement le critère supérieur de 105,0% (106,4% au plus). Cette répartition plus grande des résultats s'explique par la variabilité analytique, plus importante quand nous approchons de la limite de quantification (cf. Annexe 7). En conséquence, nous avons conclu que les pertes en substance active lors du processus d'extraction n'étaient pas dépendantes de la concentration initiale de l'échantillon. Toutefois, un taux de recouvrement de 130% a été calculé pour le composé H. Ce résultat souligne les risques de contamination, notamment pour les basses concentrations, et d'autant plus que la détection UV est peu sélective.

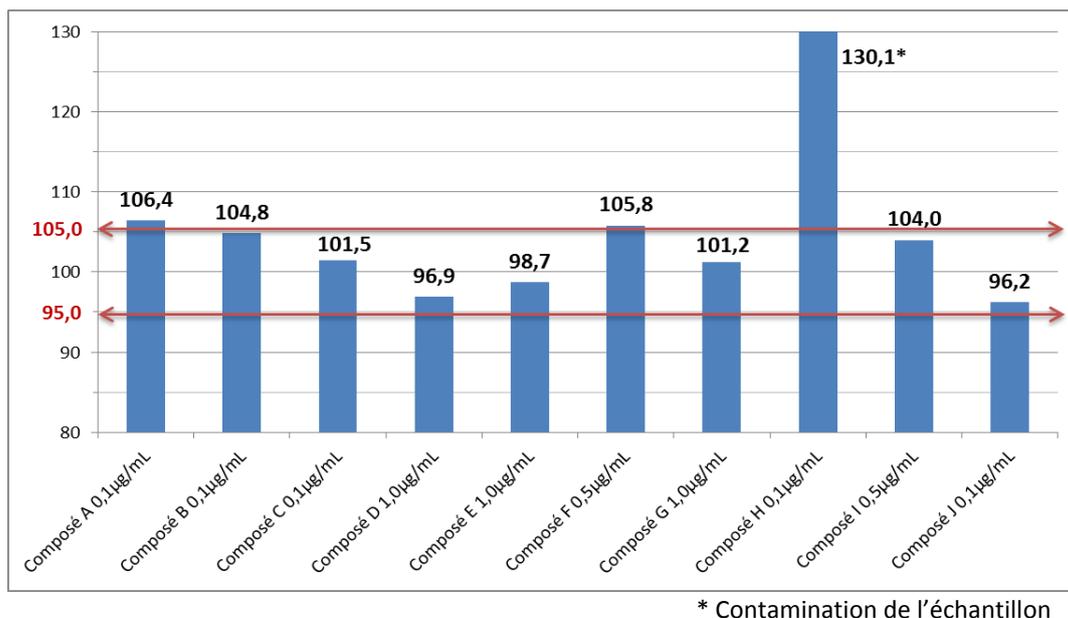


Figure 29 : Taux de récupération après SPE seule à basse concentration

En résumé, l'extraction en phase solide a permis une récupération totale des substances actives, quelle que soit leur concentration initiale. Cependant, en parallèle, nous devons confirmer que les composés hydrophiles du milieu hERG avaient bien été éliminés. Dans ce but, chaque constituant du milieu physiologique a été injecté individuellement à une longueur d'onde, non-spécifique, de 200nm. Seuls le chlorure de sodium et le tampon HEPES ont un signal observable en UV. Cependant, nous admettons que les autres substances (KCl, MgCl₂, CaCl₂ et glucose), présentes en moins grande quantité, se sont comportées de façon identique.

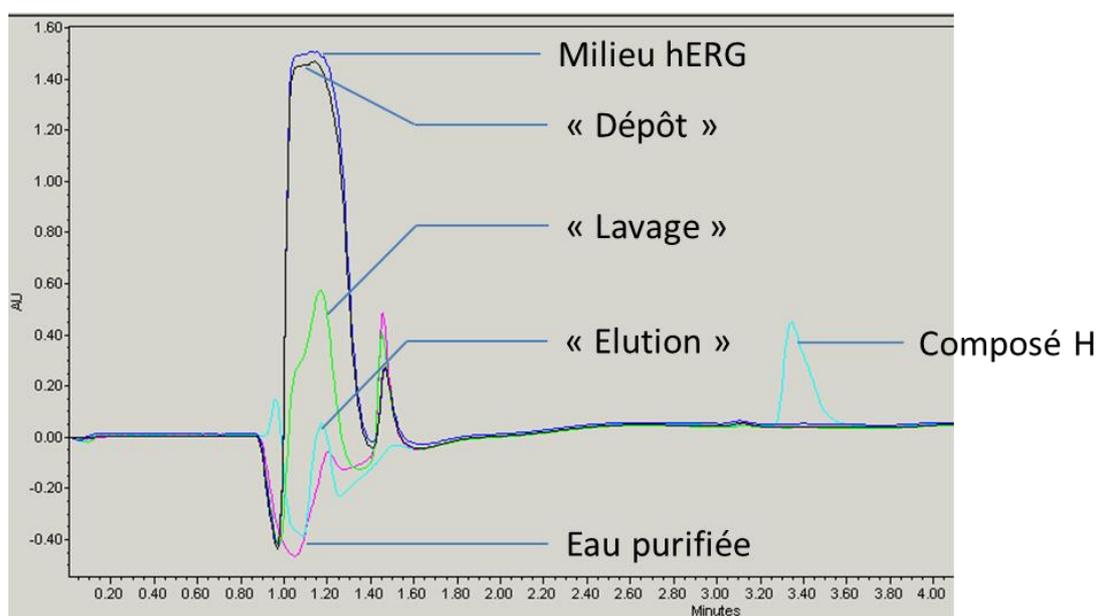


Figure 30 : Chromatogrammes à 200nm des différentes fractions extraites d'une solution échantillon de composé H (10µg/mL)

Chaque fraction issue de l'expérience à haute concentration (« Dépôt », « Lavage », « Elution ») a été réinjectée à la longueur d'onde de 200nm et leur signal comparé à une injection de milieu physiologique seul. Le cas du composé H est montré en exemple ci-dessus (**Figure 30**). Sur l'injection de milieu hERG seul, nous avons noté que l'élution des sels entraînait la formation d'un signal très important saturant au temps de rétention nulle. Un chromatogramme comparable étant observé lors de l'injection de la fraction « Dépôt », nous avons supposé qu'une grande partie de ces sels n'était pas retenue sur la cartouche lors du dépôt de l'échantillon. Une part non négligeable a été ensuite, visiblement, éliminée lors du rinçage de la phase à l'eau purifiée (chromatogramme « Lavage » sur la **figure 30**). Enfin, aucun signal significatif n'a été constaté dans la fraction éluée, de même que dans l'injection d'eau purifiée. Des résultats similaires ont été obtenus pour les neuf autres composés.

En conclusion, nous pouvons supposer que l'extraction en phase solide a permis d'éliminer les constituants non désirés du milieu hERG (responsables de la suppression de signal en spectrométrie de masse) tandis que la perte en substance active est demeurée inférieure à 5,0%. L'élimination totale de l'effet de suppression d'ion devait cependant être confirmée en spectrométrie de masse. Le processus complet d'extraction, que nous allons maintenant évaluer, permettra de répondre à cette interrogation.

3.3.2.4. SPE : processus complet

Connaissant les bonnes performances du procédé d'extraction en phase solide (cf. 3.3.2.3) et de la méthode analytique générique développée en CLUHP-SM (cf. 3.3.2.2), nous avons pu coupler ces deux techniques lors de l'évaluation du processus complet d'extraction. Pour cette expérience, nous sommes partis d'échantillons dans le milieu hERG à 0,01 μ M, 0,1 μ M et 1000ng/mL. Sept composés de notre panel ont ainsi été étudiés. Ces solutions ont été extraites par SPE, puis le solvant a été évaporé et l'extrait sec reconstitué dans un mélange eau/acétonitrile (1/1, v/v). Le processus a été réalisé trois fois pour chaque niveau de concentration. Les extraits reconstitués ont été ensuite injectés en CLUHP-SM. Un taux de recouvrement a été calculé en prenant comme référence trois injections d'une solution « Cal » de même concentration et une moyenne sur les trois répliques est présentée dans le tableau suivant (**Tableau XIV**).

A la concentration supérieure de 1000ng/mL, trois composés (C, D et I) présentaient un taux de recouvrement conforme à nos critères (95,0 à 105,0%), tandis que les résultats de six molécules étaient compris dans l'intervalle 90,0 à 110,0% exigé pour l'analyse des formulations (**Tableau XIV**). Le rendement d'extraction était moins bon à 0,1 μ M (20 à 40ng/mL). En effet, seul le composé I a présenté un taux de recouvrement supérieur à 95,0%, tandis que quatre substances actives avaient subi des pertes dépassant 10% de leur concentration initiale. Enfin, à la limite de quantification, les composés A, D et I ont montré un taux de recouvrement dans l'intervalle 90,0 - 110,0%. Cependant, pour les quatre autres, le rendement d'extraction s'échelonnait de 64,3% (composé A) à 127,1% (composé H).

Tableau XIV : Taux de recouvrement moyen (%) après processus complet

	0,01μM	0,1μM	1000ng/mL
Critères	90,0 - 110,0%	95,0 - 105,0%	95,0 - 105,0%
Composé A	94,5	86,2	91,8
Composé C	83,4	90,2	104,1
Composé D	91,7	92,2	96,5
Composé F	64,3	72,3	84,1
Composé H	127,1	89,0	90,5
Composé I	96,7	98,0	98,6
Composé J	76,2	76,3	92,5

Par ailleurs, la reproductibilité des résultats sur trois réplicas était satisfaisante, sans standard interne, puisque le coefficient de variation calculé n'excédait pas 5,0% tant à 1000ng/mL qu'à 0,1 μ M, à l'exception du composé H (**Tableau XV**). Lors de la validation de méthode, aucun critère n'est fixé à la limite de quantification. Cependant, nous avons également observé une bonne reproductibilité à ce niveau avec un seul résultat supérieur à 5,0% (5,3% pour le composé C).

Tableau XV : Reproductibilité des rendements d'extraction sur trois réplicas (CV%)

Composé	A	C	D	F	H	I	J
0,01μM	3,0	5,3	3,3	2,1	0,8	3,6	1,6
0,1μM	0,9	0,8	3,3	4,3	7,7	1,2	0,5
1000ng/mL	0,6	0,8	0,5	1,8	2,2	0,7	0,2

Enfin, nous avons, en parallèle et sur les mêmes injections, calculé les rendements d'extraction à 1000ng/mL en se basant sur le signal généré par le détecteur UV placé en amont du spectromètre de masse. Nous avons globalement noté une bonne corrélation des valeurs. Si le rendement mesuré était parfois nettement supérieur en spectrométrie de masse (composés C, D et F), il n'a jamais été inférieur à celui calculé en UV, détecteur non soumis à un effet de matrice dû au milieu hERG (**Figure 31**). Nous en avons donc déduit une absence de phénomène de suppression d'ion en spectrométrie de masse. Ces résultats confirment que l'extraction en phase solide permet d'éliminer efficacement les sels de notre milieu physiologique.

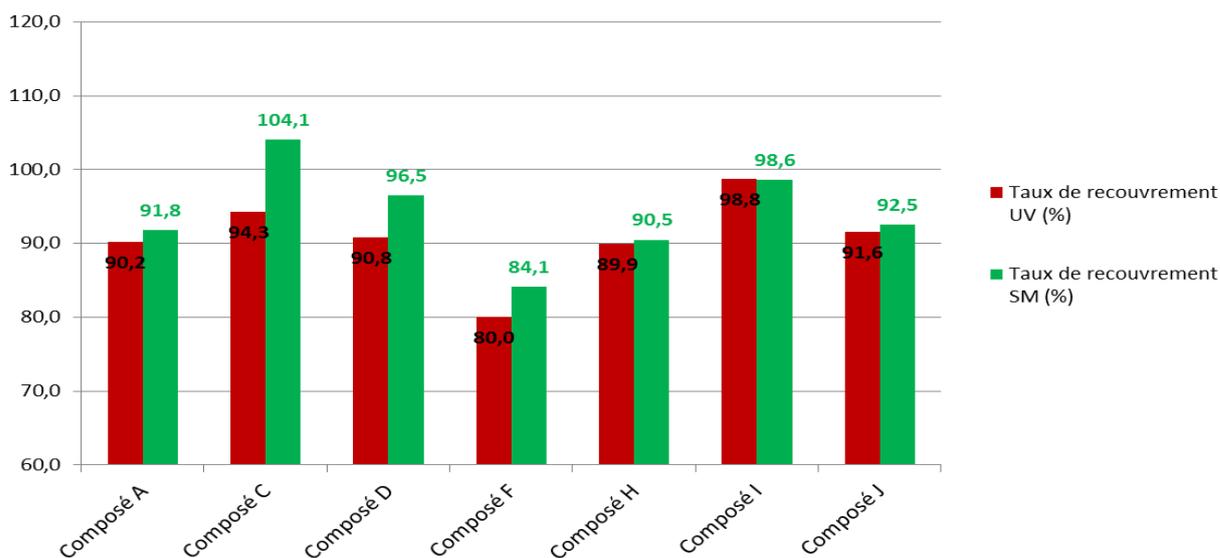


Figure 31 : Comparaison des rendements d'extraction calculés en CL-UV et CL-SM

En conclusion, le processus complet a produit des résultats satisfaisants en ce qui concerne la purification de l'échantillon et la reproductibilité des résultats. Le problème est venu, en revanche, du taux de recouvrement, souvent insuffisant. Le rendement d'extraction était pourtant bon après l'extraction seule, comme l'ont démontré les essais réalisés au paragraphe précédent (cf. **Tableau XIII** et **Figure 29**). En conséquence, nous avons supposé que les pertes provenaient des étapes supplémentaires ajoutées lors du processus complet, à savoir l'évaporation et la reconstitution. Les sources d'incertitude liées à ces deux techniques sont, en effet, multiples : dégradation de la substance active lors de l'évaporation, récupération incomplète lors de la remise en solution (produit restant sur les parois du tube), transferts de l'échantillon plus nombreux... Ainsi, les chromatogrammes des composés F et H présentaient, en UV et après évaporation et reconstitution, des pics supplémentaires caractéristiques d'une dégradation.

Pour résoudre ce problème de rendement, nous avons eu l'idée d'injecter directement la fraction éluée après SPE. Cela permettrait d'éviter les risques de pertes et de contamination liés à l'évaporation et diminuerait aussi le temps de préparation des échantillons. Cependant, deux obstacles s'opposent à ce projet. En premier lieu, la substance active est, à cette étape, dans un solvant organique (100% d'acétonitrile). Or, la différence de force d'élution entre ce diluant et la phase mobile (en partie aqueuse) peut fortement affecter l'efficacité de la séparation et conduire à une déformation voire un dédoublement du pic. [Snyder *et al.*, 1997] Expérimentalement, nous avons ainsi observé, pour la majorité des composés, des pics très déformés et donc impossible à quantifier quand la fraction éluée était injectée directement. Cette difficulté peut être contournée par une dilution au demi dans l'eau purifiée, comme nous l'avons réalisé précédemment (paragraphe 3.3.2.3).

Deuxièmement, il existe une incertitude sur le volume réel de la fraction éluée. Si celui-ci était inférieur au volume théorique de 1,0mL, la concentration de l'échantillon serait surestimée. Nous avons donc envisagé de récupérer la fraction éluée dans une fiole jaugée de 2,0mL (et non un tube à essai), puis d'ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau purifiée. L'incertitude sur le volume serait ainsi éliminée tout en diminuant la proportion de solvant organique.

Ce processus a été réalisé sur des solutions échantillons (hERG) des composés B (très apolaire), E (très polaire) et G (polarité intermédiaire) à 0,1 μ M et 0,01 μ M. Le taux de recouvrement, calculé par rapport à une solution « Cal » de même concentration, était compris dans l'intervalle 95,0 - 105,0% pour les molécules E et G aux deux niveaux de concentration, démontrant un très bon rendement d'extraction (**Tableau XVI**). Celui-ci n'était, au contraire, que de 75% pour le composé B. Nous avons attribué ce mauvais rendement à la faible solubilité aqueuse de cette substance, ces solutions étant préparées à partir d'une solution-mère à 1 μ g/mL dans le milieu hERG. Par ailleurs, nous avons calculé un coefficient de variation, sur trois injections, n'excédant pas 1,6% à 0,01 μ M (composés E et G) et 1,2% à 0,1 μ M (composé B). Les valeurs de répétabilité pour le composé G sont donc correctes dans ce cas, contredisant ce qui a été observé dans un essai précédent (cf. **Figure 27b** au paragraphe 3.3.2.2).

Tableau XVI : Taux de recouvrement après extraction seule dans une fiole jaugée de 2,0mL

	Composé B	Composé E	Composé G
<i>r</i> à 0,01μM (%)	75,1	96,9	98,7
<i>r</i> à 0,1μM (%)	75,5	99,4	103,4

3.4. Discussion

La détection UV nous a permis, pour tous les composés de notre panel représentatif, de quantifier des concentrations de 0,2 à 0,4 $\mu\text{g/mL}$ soit 1 μM . De plus, la présence d'une longueur d'onde d'absorption spécifique en UV supérieure à 240nm, a permis d'atteindre pour les cinq composés concernés (A, B, C, H et J) une sensibilité au moins égale à 0,1 μM (0,03 μM pour les molécules A, B et C, **Figure 32**). L'absorption à cette longueur d'onde représentait au minimum un tiers de l'intensité du signal à 210nm. L'optimisation de la méthode générique pour accéder à cette sensibilité est minime et concerne le volume d'injection, le diluant des échantillons (pour les composés polaires) et le pH de la phase mobile. Les essais nécessaires pour le développement d'une méthode pourraient donc être relativement limités.

L'absence d'effet de matrice lors des injections de solutions diluées dans le milieu hERG, nous dispense d'une étape de purification de l'échantillon. Nous jugeons, par conséquent, que la détection UV doit être le premier choix tant que la sensibilité demandée par l'étude *in vitro* reste modérée. En revanche, la concentration-cible de 0,01 μM n'a jamais été obtenue avec les équipements dont nous disposons (CLUHP, colonnes à particules superficiellement poreuses). Toutefois, une limite de quantification de 0,03 μM a été atteinte pour trois composés (A, B et C). Dans cette situation, l'utilisation d'un détecteur UV à long trajet optique aurait peut-être pu nous permettre de quantifier une concentration de 0,01 μM (cf. chapitres 2.1.4 et 2.2.4).

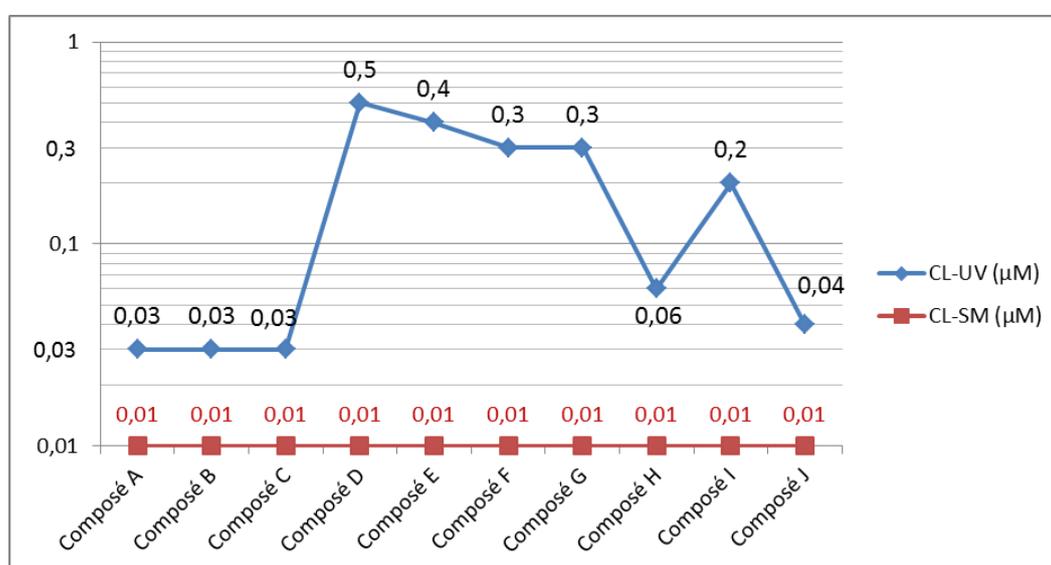


Figure 32 : Comparaison des limites de quantification atteintes selon le mode de détection (une concentration inférieure à 0,01 μM n'a pas été testée)

La chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse intuitif (simple quadripôle, ionisation par électrobulbion) nous a permis de quantifier

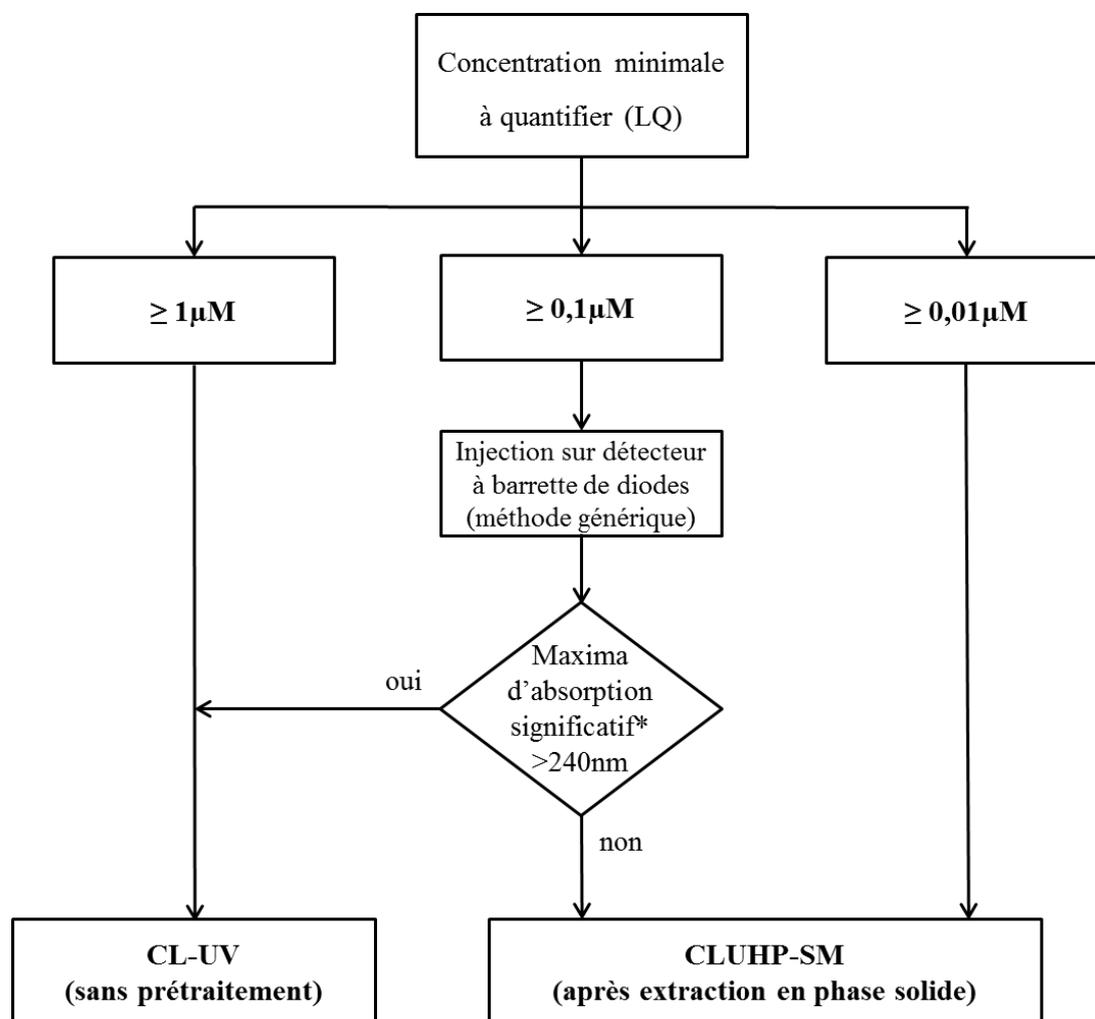
aisément, pour tout composé, une concentration de $0,01\mu\text{M}$ (**Figure 32**). De plus, une bonne répétabilité du signal permet d'envisager de se passer d'un standard interne. Ces résultats ont été obtenus à partir d'une méthode générique (cf. Annexe 5), dont la phase mobile a seulement dû être modifiée pour le composé F (utilisation d'un tampon acétate d'ammonium en remplacement de l'acide formique). La détermination des paramètres de détection est rapide et concerne principalement le potentiel électrique du cône de la source d'ionisation (*Cone Voltage*). Un développement aisé des méthodes chromatographique et spectrométrique peut donc être envisagé.

Toutefois, les sels contenus dans le milieu physiologique hERG causent un effet de suppression d'ion important (quantifié en spectrométrie de masse en tandem), malgré l'utilisation d'une vanne différentielle. Pour résoudre ce problème, l'extraction en phase solide présente le double avantage de purifier efficacement l'échantillon sans le diluer. Ce procédé a globalement montré des pertes de composé inférieures à 5% tant à haute qu'à basse concentration. L'utilisation d'un adsorbant polymérique contenant des groupements polaires produit ces bons résultats quelle que soit la substance active étudiée. Les bonnes répétabilités du détecteur et du processus d'extraction ne nous obligent pas, à première vue, à utiliser un standard interne. En revanche, le processus complet a entraîné un taux de recouvrement insuffisant pour la majorité des composés (64% à $0,01\mu\text{M}$ pour le composé F).

Afin d'éviter ces pertes, nous avons proposé de supprimer les étapes d'évaporation du solvant d'élution et de remise en solution de l'extrait sec. Ainsi, nous avons recueilli la fraction éluée dans une fiole jaugée de 2,0mL que nous avons complétée au trait de jauge avec de l'eau purifiée. Ce procédé a montré des résultats très satisfaisants pour deux des trois composés étudiés, avec un rendement d'extraction compris entre 97 et 103%. Nous avons attribué les mauvais résultats du composé B ($r = 75\%$) à la faible solubilité aqueuse de celui-ci. En effet, le manque de solubilité des molécules apolaires dans le milieu hERG est un problème que nous avons plusieurs fois rencontré au cours de cette étude. Malgré cela, nous pensons que le procédé de récupération après SPE dans une fiole jaugée est prometteur et devra être évalué davantage pour s'assurer de son efficacité. L'utilisation d'un standard interne pour couvrir les pertes de composé pourrait aussi être envisagée. Les solutions standards d'étalonnage (Cal) seraient alors préparées en milieu hERG et subiraient le même processus d'extraction que les échantillons. Le développement de cette approche serait alors un peu plus complexe.

En conséquence de ces résultats, nous avons construit notre arbre décisionnel (**Figure 33**) à partir de ces deux approches, qui permettent de couvrir tous les cas de figure habituellement rencontrés. En premier lieu, le choix de l'approche analytique repose sur la sensibilité nécessaire à l'étude *in vitro*. La concentration inhibitrice 50 (CI_{50}) est, en effet, très variable selon la substance active comme nous avons pu l'observer au chapitre 1.3 (**Tableau II**). Toutefois, une approximation de cette valeur est très souvent obtenue en amont du développement non-clinique par modélisation *in silico* ou par une expérience *in vitro* préliminaire. [Hancox *et al.*, 2008 ; Rampe et Brown, 2013]

Si la plus basse concentration à quantifier n'est pas inférieure à 1µM, la détection UV est toujours utilisable, sans nécessité d'une purification préalable de l'échantillon. Dans le cas où une sensibilité de 0,1µM est exigée, nous nous intéresserions au spectre UV de la molécule. Si cette dernière possède une longueur d'onde d'absorption spécifique supérieure à 240nm, la spectrophotométrie UV peut être utilisée. Nous pensons toutefois qu'il est nécessaire de confirmer ce résultat par une courte série d'injection sur un CLHP équipé d'un détecteur à barrette de diodes, afin de s'assurer d'une intensité d'absorption suffisante à cette longueur d'onde (arbitrairement, au moins un tiers de la réponse à 210nm). La spectrométrie de masse, simple quadripôle, après extraction en phase solide, couvre toutes les autres situations habituellement rencontrées. Au sein du laboratoire réalisant l'étude, nous avons relevé que les deux tiers des molécules en développement préclinique présentaient une CI₅₀ supérieure ou égale à 10µM. La détection UV pourrait donc souvent être utilisée.



* Au moins 1/3 de l'absorbance mesurée à 210nm

Figure 33 : Arbre décisionnel pour orienter le développement d'une nouvelle méthode

Par ailleurs, nous avons pu observer, en spectrométrie de masse en tandem, qu'une dilution au dixième de l'échantillon dans un solvant organique (ici un mélange eau/acétonitrile) permettait de corriger entièrement le phénomène de suppression de signal dû aux sels du milieu hERG. La dilution s'accompagnait de l'utilisation d'une vanne différentielle. Cette approche a été employée précédemment, avec succès, par le laboratoire de « Formulation non-clinique », mais requiert un spectromètre de masse triple quadripôle dont nous ne disposons pas. Selon son concepteur, il est possible d'installer une vanne différentielle sur le spectromètre de masse intuitif que nous avons utilisé pour cette étude. Il serait donc intéressant de savoir si ce procédé peut produire des résultats satisfaisants sur un spectromètre de masse simple quadripôle. Sur notre arbre décisionnel, à la concentration de $0,1\mu\text{M}$, cette approche permettrait d'étudier les échantillons des composés dépourvus d'absorbance spécifique en UV, après une simple dilution au dixième, sans besoin d'une extraction en phase solide.

Pour finir, les conclusions de cette étude, bien qu'obtenues sur un panel représentatif de dix molécules, ne sont que le fruit d'un travail exploratoire. Les performances des approches que nous avons présentées, et notamment la spectrométrie de masse combinée à l'extraction en phase solide, devront être confirmées en conditions réelles lors d'une validation complète de méthode. Le second point à approfondir est l'étude de la solubilité, de la stabilité et de l'adsorption. Nous n'avons, en effet, pas étudié expérimentalement ces trois difficultés potentielles, citées dans la directive ICH S7B et que nous avons décrites dans les deux premières parties de cette thèse. Or, le manque de solubilité des composés apolaires est un problème que nous avons rencontré au cours de cette étude expérimentale (paragraphes 3.3.1.1 et 3.3.2.4).

CONCLUSION

Un nombre conséquent de substances actives, de différentes classes thérapeutiques, sont aujourd'hui classées comme torsadogènes (cf. Annexe 1). Il est important pour le prescripteur et le pharmacien d'avoir connaissance de cette liste pour éviter une interaction médicamenteuse. La co-prescription de deux médicaments allongeant l'intervalle QT est ainsi généralement contre-indiquée. Cependant, certaines associations sont uniquement déconseillées quand la prescription contient des neuroleptiques, la méthadone ou des antiparasitaires. La mise en place d'un traitement par un médicament torsadogène doit s'associer à un suivi cardiologique (ECG, identifications de facteurs favorisants comme la bradycardie et l'hypokaliémie). Le professionnel de santé doit aussi connaître le risque d'associer au traitement un médicament hypokaliémiant tel que les diurétiques thiazidiques ou les laxatifs stimulants (disponibles sans ordonnance). [ANSM, 2001 ; HAS, 2009 ; Richard et Dejean, 2009]

La mise en place de la directive internationale ICH S7B a généralisé l'étude de l'allongement de l'espace QT dès la recherche non-clinique. Composante essentielle de ce texte, le test *in vitro* étudie l'inhibition du canal hERG et permet l'établissement d'une relation effet-concentration, puis le calcul de la CI_{50} de la substance active. Cet essai demeure cependant imparfait, en raison notamment d'un nombre élevé de cas de faux positifs (molécules identifiées à tort comme torsadogènes). Sa combinaison avec les résultats *in vivo* obtenus chez l'animal a, en revanche, un bon pouvoir prédictif. Ces résultats, mis en regard de la concentration plasmatique et de la gravité de la maladie à traiter, contribuent à la décision de continuer le développement de la molécule chez l'Homme. Par ailleurs, la multiplication des données d'inhibition a permis l'établissement de relations structure-activité et le développement de modèles informatiques prédictifs.

Le test hERG est soumis à des sources d'incertitude parmi lesquelles le manque de solubilité dans le milieu physiologique aqueux, l'adsorption du composé sur le système de perfusion et la dégradation chimique de la molécule en solution. En accord avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire, la concentration en substance active dans les formulations perfusées est quantifiée par une méthode chromatographique. Les récentes avancées technologiques dans ce domaine sont parfaitement utilisables pour l'analyse des échantillons hERG. Ils nous permettent d'élargir le domaine d'utilisation des détecteurs UV et des détecteurs de masse à simple quadripôle. Ces deux approches représentent un investissement raisonnable en comparaison à la spectrométrie de masse en tandem, la méthode de référence en Bioanalyse.

Dans la troisième partie de cette thèse, nous avons montré que la CL-UV permet de quantifier une concentration de $1\mu\text{M}$ pour tout composé. Une sensibilité de l'ordre de $0,1\mu\text{M}$ (et en deçà) peut être atteinte si la molécule étudiée possède un pic d'absorption spécifique dans l'UV. Ces résultats peuvent être obtenus sur un système CLHP traditionnel, sans prétraitement de l'échantillon, en augmentant simplement le volume d'injection. En revanche, les particules

superficiellement poreuses n'ont pas montré d'intérêt significatif pour augmenter la sensibilité des méthodes préexistantes. Leur apport serait donc plus à attendre pour la séparation de deux analytes de temps de rétention proche (cas qui ne se présente généralement pas dans les études hERG).

Nous avons ensuite démontré l'intérêt du couplage de la chromatographie liquide ultra-haute performance à un spectromètre de masse (simple quadripôle) intuitif et à haute fréquence d'acquisition. Ce système permet d'atteindre une sensibilité de l'ordre de $0,01\mu\text{M}$ quelle que soit la substance active. L'analyse par CL-SM nécessite toutefois un prétraitement de l'échantillon pour éliminer les effets de matrice. L'extraction en phase solide (sur une phase polymérique) a montré son efficacité pour éliminer les composés hydrophiles du milieu physiologique tout en offrant un bon taux de récupération tant à haute qu'à basse concentration. En résumé, la CL-UV et la CLUHP-SM décrites ci-dessus couvrent tout le domaine de concentration sur lequel l'analyste peut être amené à travailler en support des études *in vitro* ($0,01\mu\text{M}$ à $100\mu\text{M}$). Un arbre décisionnel a été construit en ce sens (cf. **Figure 33** au chapitre 3.4) pour orienter rapidement le choix de l'analyste en fonction de la limite de quantification visée.

Toutefois, le dosage des échantillons peut être rendu difficile par la dégradation des composés entre le moment du test *in vitro* et l'analyse chromatographique, de même que la précipitation des analytes, qui est aggravée par la congélation des échantillons. Le manque de solubilité des composés apolaires, majoritaires lors du développement non-clinique, est le principal frein au bon déroulement de ces études. Ainsi, en face de faibles taux de recouvrement calculés, le risque d'une dégradation ou d'une précipitation du composé étudié doit être pris en compte. Une bonne connaissance des limites de solubilité en milieu hERG, de la cinétique de dégradation et de la capacité d'adsorption du composé sont nécessaires pour assurer la qualité des résultats analytiques. Par ailleurs, des techniques alternatives à la chromatographie peuvent être envisagées. Nous avons ainsi présenté le principe d'une détection « en ligne » permettant de s'affranchir des questions de solubilité, d'adsorption et de stabilité. Cependant, une bonne coordination de l'essai *in vitro* et de l'analyse chromatographique est aujourd'hui le meilleur moyen de contribuer à la qualité des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

ANNESLEY T. Ion Suppression in Mass Spectrometry. Clin Chem, 2003, 49 (7), pp.1041-1044.

ANTIGNAC J.-P., DE WASCH K., MONTEAU F., DE BRABANDER H., ANDRE F., LE BIZEC B. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. Anal Chim Acta, 2005, 529, pp.129-136.

ARPINO P. Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. I. [P 1490] Techniques de l'Ingénieur, 2007.

ARPINO P. Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. III. [P 1492] Techniques de l'Ingénieur, 2009.

BORCHARDT R., KERNS E., LIPINSKI C., THAKKER D., WANG B. Pharmaceutical Profiling in Drug Discovery for Lead Selection. AAPS Press Ed. Arlington, VA. 2004, 482p.

BOUCHOUX G, SABLIER M. Spectrométrie de masse - Principe et appareillage. [P 2645] Techniques de l'Ingénieur, 2005.

BRIMECOMBE J., KIRSCH G., BROWN A. Test article concentrations in the hERG assay: Losses through the perfusion, solubility and stability. J Pharmacol Toxicol Methods, 2009, 59, pp.29-34.

CARR G. Using Tandem LC-MS for Cleaning Validation. Pharma Tech Europe, 2013, 25 (8), pp.28-29.

CAUDE M., JARDY A. Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation. [P 1455] Techniques de l'Ingénieur, 1994.

CHORGHADE M. Drug Discovery and Development, Vol.2, Drug Development. John Wiley & Sons Ed. Hoboken, NJ. 2007, 400p.

DE HOFFMANN E., STROOBANT V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. 3ème édition. John Wiley & Sons Ltd Ed. Chichester, UK. 2007, 489p.

DE JAGER A., BAILEY N. Online extraction LC–MS/MS method for the simultaneous quantitative confirmation of urine drugs of abuse and metabolites: Amphetamines, opiates, cocaine, cannabis, benzodiazepines and methadone. J Chromatogr B, 2011, 879, pp.2642-2652.

DI L., FISH P., MANO T. Bridging solubility between drug discovery and development. *Drug Discov Today*, 2012, 17 (9/10), pp.486-495.

EMA (European Medicines Agency). Guideline on bioanalytical method validation. 2011.

FANALI S., HADDAD P., POOLE C., SCHOENMAKERS P., LLOYD D. *Liquid Chromatography: Applications*. Elsevier Ed. Waltham, MA. 2013, 688p.

FDA. Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation. 2001.

FERNÁNDEZ-RAMOS C., ŠATÍNSKÝ D., SOLICH P. New method for the determination of carbamate and pyrethroid insecticides in water samples using on-line SPE fused core column chromatography. *Talanta*, 2014, 129, pp.579-585.

FLORENCE A., ATTWOOD D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. 5^{ème} édition. Pharmaceutical Press Ed. Londres. 2011, 510p.

GOINEAU S., LACAUD J., LEGRAND C., EVEILLEAUX E., FROGET G. Unsuitability of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin for use in the hERG channel test. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2014, 70 (3), p.316.

GRITTI F., GUIOCHON G. Facts and Legends on Columns Packed with Sub-3- μ m Core-Shell Particles. *LCGC North America*, 2012, 30 (7), pp.586-595.

GUENARD H. *Physiologie humaine*. 3^{ème} édition. Pradel Ed. Paris. 2001, 606p.

GUILLARME D. Evolutions majeures en chromatographie liquide. [P 1494] *Techniques de l'Ingénieur*, 2014.

HANCOX J., McPATE M., EL HARCHI A., ZHANG Y. The hERG potassium channel and hERG screening for drug-induced *torsades de pointes*. *Pharmacol Ther*, 2008, 119, pp.118-132.

HAS (Haute Autorité de Santé). Guide - Affection de longue durée. Troubles du rythme ventriculaire graves chroniques. Juillet 2009.

HERRON W., TOWERS C., TEMPLETON A. Experiences in method development for the analysis of in vitro study solutions for content. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2004, 49, pp.211-216.

HIMMEL H. Suitability of commonly used excipients for electrophysiological *in-vitro* safety pharmacology assessment of effects on hERG potassium current and on rabbit Purkinje fiber action potential. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007, 56, pp.145-158.

HOFFMANN P., WARNER B. Are hERG channel inhibition and QT interval prolongation all there is in drug-induced torsadogenesis? A review of emerging trends. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2006, 53, pp.87-105.

ICH (International Conference on Harmonisation). Directive S7A. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals. 2000.

ICH. Directive S7B. The Non-Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals. 2005.

JOSEFSSON M., SABANOVIC A. Sample preparation on polymeric solid phase extraction sorbents for liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of human whole Blood-A study on a number of beta-agonists and beta-antagonists. *J Chromatogr A*, 2006, 1120, pp.1-12.

LANDRY Y., GIES J. *Pharmacologie. Des cibles vers l'indication thérapeutique*. 2^{ème} édition. Dunod Ed. Paris. 2009, 531p.

LAW B., TEMESI D. Factors to consider in the development of generic bioanalytical high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric methods to support drug discovery. *J Chromatogr B*, 2000, 748, pp.21-30.

LEE M., OH S.Y., PATHAK T.S., PAENG I.R., CHO B.-Y., PAENG K.-J. Selective solid-phase extraction of catecholamines by the chemically modified polymeric adsorbents with crown ether. *J Chromatogr A*, 2007, 1160, pp.340-344.

LI W., ZHANG J., TSE F. *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations*. John Wiley & Sons Ed. Hoboken, NJ. 2013, 704p.

LIPINSKI C. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today: Technologies*, 2004, 1 (4), pp.337-341.

LOFTSSON T. *Drug Stability for Pharmaceutical Scientists*. Academic Press Ed. Oxford. 2014, 170p.

MAHATO R., NARANG A. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery*. 2^{ème} édition. CRC Press Ed. Boca Raton, FL. 2011, 512p.

MONEGIER B. *Électrospray*. [P 3350] *Techniques de l'Ingénieur*, 1997.

OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), Direction de l'environnement. *Les Principes de l'OCDE de Bonnes pratiques de laboratoire*, ENV/MC/CHEM(98)17, § 6.2, p.24, 1998.

ÖZKAN Y., YILMAZ N., ÖZKAN S., BIRYOL I. High-performance liquid chromatographic analysis of verapamil and its application to determination in tablet dosage forms and to drug dissolution studies. *Il Farmaco*, 2000, 55 (5), pp.376-382.

PHARMACOPEE EUROPEENNE (Ph. Eur.), 8^e Edition (8.3), Janvier 2015. Paragraphe 2.2.46. Techniques de séparation chromatographique.

PICHON V. Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques. [P 1420] Techniques de l'Ingénieur, 2006.

QU Y., SCHNIER P., ZANON R., VARGAS H. hERG potency estimates based upon dose solution analysis: What have we learned? *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2011, 64, pp.251-257.

RAMPE D., BROWN A. A history of the role of the hERG channel in cardiac risk assessment. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2013, 68, pp.13-22.

RAST G., GUTH B. Solubility assessment and on-line exposure confirmation in a patch-clamp assay for hERG (human ether-a-go-go-related gene) potassium channel inhibition. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2014, 70, pp.182-187.

REDFERN W., CARLSSON L., DAVIS A., LYNCH W., MACKENZIE I., PALETHORPE S., SIEGLF P., STRANG I., SULLIVAN A., WALLIS R., CAMM A., HAMMOND T. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res*, 2003, 58, pp.32-45.

RICHARD D., DEJEAN C. Allongement du QT et torsades de pointes. *Le Moniteur Hospitalier*, 2014, 266. Disponible sur : <http://www.lemoniteurdespharmacies.fr/revues/lemoniteur-hospitalier/article/n-266/allongement-du-qt-et-torsades-de-pointes.html>

ROUESSAC F., ROUESSAC A. Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales. 7^{ème} édition. Dunod Ed. Paris. 2009, 512p.

ROUQUEROL F., CHAMBAUD G., LISSILLOUR R., BOUCEKKINE A. Chimie générale. 7^{ème} édition. Dunod Ed. Paris. 2013, 672p.

SANCHEZ C., ANSPACH J., FARKAS T. Performance optimizing injection sequence for minimizing injection band broadening contributions in high efficiency liquid chromatographic separations. *J Chromatogr A*, 2012, 1228, pp.338-348.

SNYDER L., KIRKLAND J., GLAJCH J. Practical HPLC Method Development. 2^{ème} édition. John Wiley & Sons Ed. Hoboken, NJ. 1997, 800p.

SWARTZ M. Seeing is Believing: Detectors for HPLC. LCGC North America, 2010, 28 (10).
Disponible sur : <http://www.chromatographyonline.com/seeing-believing-detectors-hplc>

VANDENBERG J., WALKER B., CAMPBELL T. HERG K⁺ channels: friend and foe. Trends Pharmacol Sci, 2001, 22 (5), pp.240-246.

WALLIS M. Integrated risk assessment and predictive value to humans of non-clinical repolarization assays. Br J Pharmacol, 2010, 159, pp.115-121.

WALTER T., ANDREWS R. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. Trends Analyt Chem, 2014, 63, pp.14-20.

YAO J-A., DU X., LU D., BAKER R., DAHARSH E., ATTERSON P. Estimation of potency of HERG channel blockers: Impact of voltage protocol and temperature. J Pharmacol Toxicol Methods, 2005, 52, pp.146-153.

YOSHIOKA S., STELLA V. Stability of Drugs and Dosage Forms. Plenum Publishers Ed. New York, NY. 2000, 268 p.

ZHAO L., LI F. UHPLC-MS strategies and applications for bioanalyses related to pharmacokinetics and drug metabolism. Trends Analyt Chem, 2014, 63, pp.170-179.

Ressources internet

AGILENT. Manuel d'utilisation du détecteur Agilent 1200 Infinity Series Diode Array, disponible sur : http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4212-90013_DAD-A-B_USR_EN.pdf (Page consultée le 05/12/2014)

ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé). Interactions médicamenteuses des neuroleptiques donnant des torsades de pointes : modification de libellé. Lettre aux professionnels de santé du 21/12/2001. Disponible sur : <http://ansm.sante.fr/S-informer/Informations-de-securite-Lettres-aux-professionnels-de-sante/Interactions-medicam-enteuses-des-neuroleptiques-donnant-des-torsades-de-pointes-modification-de-libelle>

FDA (Food & Drug Administration). Code of Federal Regulations. Good Laboratory Practice for Non Clinical Laboratory Studies, § 58.113. 21CFR58.113. Disponible sur : <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=58.113> (texte révisé le 01/04/2014).

LATEEF S., DONG M., GU C. A Generic UHPLC/UV/MS Method for Cleaning Verification of Highly Potent Drugs. Note d'application d'Agilent Technologies, 2014, disponible sur : <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5991-4509EN.pdf> (Page consultée le 12/12/2014)

LEEM (Les Entreprises du Médicament). Recherche et Développement, disponible sur : <http://www.leem.org/article/recherche-developpement>. (Page consultée le 29/10/2014)

PERKIN ELMER. Présentation du détecteur Flexar PDA Plus, disponible sur : http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-152280PRD_Flexar_PDA_Plus.pdf (Page consultée le 04/12/2014)

PHENOMENEX. Produits pour l'extraction en phase solide (SPE), disponible sur : <http://www.phenomenex.com/Products/Search/SPE> (Page consultée le 16/12/2014)

SHIMADZU. Liste des détecteurs UV-VIS et « Photodiode Array », disponible sur : <http://www.shimadzu.com/an/hplc/detector/spd.html> (Page consultée le 06/12/2014)

SIGMA-ALDRICH. Spécifications du produit « Dimethyl sulfoxide for UV-spectroscopy, ≥99.8% », disponible sur : <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/41641> (Page consultée le 02/12/2014)

WATERS. Gamme de produits d'extraction Oasis® SPE, disponible sur : http://www.waters.com/waters/fr_FR/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?locale=fr_FR&cid=513209# (Page consultée le 15/12/2014)

ANNEXES

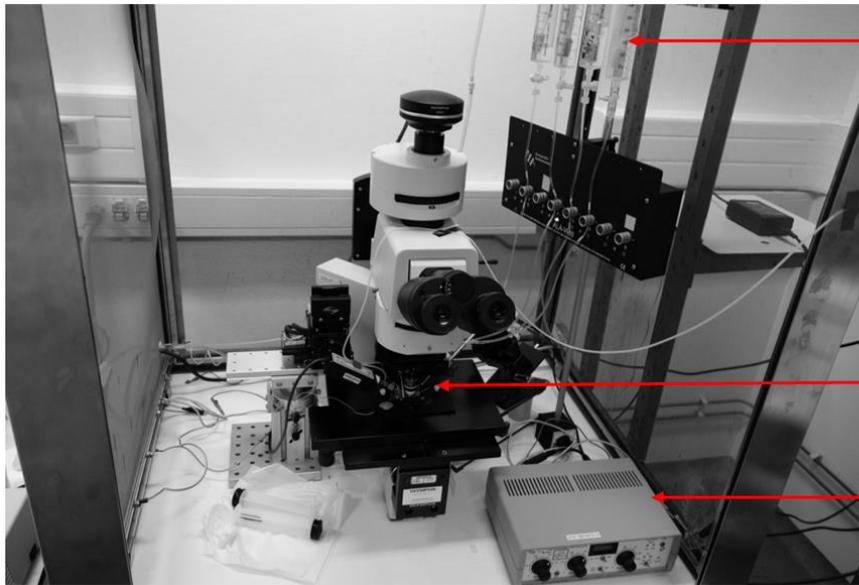
Annexe 1 : Liste non exhaustive des substances actives commercialisées allongeant l'espace QT

Molécule	Classification
Amiodarone	Anti-arythmique de classe III
Amisulpride	Neuroleptique
Amitriptyline	Antidépresseur tricyclique
Azithromycine	Antibiotique (famille des Macrolides)
Chloroquine	Antipaludique
Chlorpromazine	Neuroleptique
Citalopram	Antidépresseur
Clarithromycine	Antibiotique (Macrolides)
Cyamémazine	Neuroleptique
Disopyramide	Anti-arythmique de classe Ia
Dofétilide	Anti-arythmique de classe III
Dompéridone	Antiémetique
Dronédarone	Anti-arythmique de classe III
Dropéridol	Antiémetique (post-opératoire)
Érythromycine (IV)	Antibiotique (Macrolides)
Escitalopram	Antidépresseur
Fluconazole	Antifongique
Flupentixol	Neuroleptique
Fluphénazine	Neuroleptique
Halofantrine	Antiparasitaire
Halopéridol	Neuroleptique
Hydroquinidine	Anti-arythmique de classe Ia
Lévofloxacine	Antibiotique (famille des Fluoroquinolones)
Luméfántrine	Antiparasitaire
Méquitazine	Antihistaminique H ₁
Méthadone	Prise en charge de la dépendance aux opiacées (substitution)
Mizolastine	Antihistaminique H ₁
Moxifloxacine	Antibiotique (Fluoroquinolones)
Odansétron	Antiémetique
Pentamidine	Antiparasitaire
Pimozide	Neuroleptique
Pipampérone	Neuroleptique

Pipotiazine	Neuroleptique
Prucalopride	Médicament de la constipation
Quinidine	Anti-arythmique de classe Ia
Sotalol	Bêtabloquant non sélectif
Spiramycine (IV)	Antibiotique (Macrolides)
Sulpiride	Neuroleptique
Tamoxifène	Antiestrogènes (indiqué dans le cancer du sein)
Tiapride	Neuroleptique
Vandétanib	Antinéoplasique (indiqué dans le cancer de la thyroïde)
Zuclopenthixol	Neuroleptique

[Richard et Dejean, 2014 ; HAS, 2009]

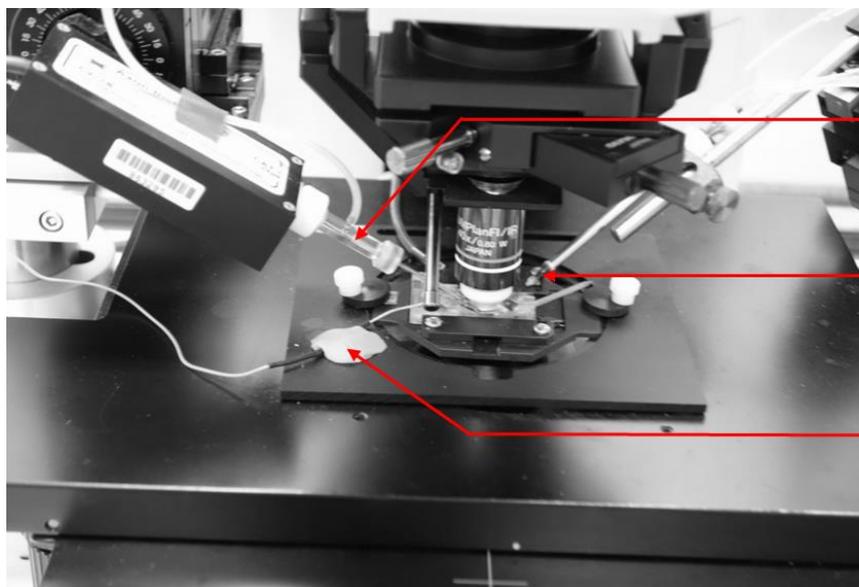
Annexe 2 : Poste de « patch-clamp » manuel et détail de la chambre d'enregistrement



Solutions perfusées

Chambre de mesure

Amplificateur



Electrode

Système de perfusion

Système d'efflux

Annexe 3 : Conditions analytiques utilisées en CLHP-UV

Colonne : XBridge® C18

Longueur : 75mm

Diamètre : 4,6mm

Particules : 2,5µm

Température : 45°C

Phases mobiles :

- Phase mobile A : Tampon acétate d'ammonium 10,5mM pH 4,5 / ACN (95/5)
- Phase mobile B : Tampon acétate d'ammonium 100mM pH 4,5 / ACN (10/90)

Gradient :

Temps (min)	Flux (mL/min)	% Phase mobile A	% Phase mobile B
0,0	0,8	90	10
6,0	0,8	0	100
6,1	0,8	90	10
9,0	0,8	90	10

Volume d'injection : 20µL

Détection : Selon le composé (210nm par défaut)

Annexe 4 : Conditions analytiques utilisées en CLUHP-UV

Colonne : Acquity UPLC® BEH C18

Longueur : 50mm

Diamètre : 2,1mm

Particules : 1,7µm

Température : 65°C

Phases mobiles :

- Phase mobile A : Tampon acétate d'ammonium 5,25mM pH 4,5 / ACN (95/5)
- Phase mobile B : Tampon acétate d'ammonium 50mM pH 4,5 / ACN (10/90)

Gradient :

Temps (min)	Flux (mL/min)	% Phase mobile A	% Phase mobile B
0,00	0,8	99	1
3,00	0,8	1	99
3,02	0,8	99	1
4,00	0,8	99	1

Volume d'injection : 4µL

Détection : Selon le composé (210nm par défaut)

Annexe 5 : Conditions analytiques utilisées en CLUHP-SM

Colonne : Acquity UPLC® HSS T3

Longueur : 50mm

Diamètre : 2,1mm

Particules : 1,8µm

Température : 50°C

Phases mobiles :

- Phase mobile A : H₂O, 0,1% acide formique
- Phase mobile B : ACN, 0,1% acide formique

Gradient :

Temps (min)	Flux (mL/min)	% Phase mobile A	% Phase mobile B
0,00	0,45	98	2
2,00	0,45	0	100
3,00	0,45	0	100
3,02	0,45	98	2
4,00	0,45	98	2

Volume d'injection : 5 µL

Détection UV : Selon le composé (210nm par défaut)

Détection SM : Selon le composé (mode SIR)

Réglages du spectromètre de masse :

- Electrospray : mode positif
- Température de désolvatation : 600°C
- Potentiel du capillaire : 1,2kV
- Potentiel du cône (*cone voltage*) : 5 à 30V (selon le composé)
- Gain : 2

Annexe 6 : Conditions analytiques utilisées en CLUHP-SM/SM

Colonne : XBridge® C18

Longueur : 50mm

Diamètre : 2,1mm

Particules : 2,5µm

Température : 40°C

Phases mobiles :

- Phase mobile A : H₂O, 0.1% acide formique
- Phase mobile B : ACN, 0.1% acide formique

Gradient :

Temps (min)	Flux (mL/min)	% Phase mobile A	% Phase mobile B
0,00	0,40	80	20
1,00	0,40	80	20
4,00	0,40	50	50
4,01	0,40	0	100
4,50	0,40	0	100
4,51	0,40	80	20
5,50	0,40	80	20

Volume d'injection : 0,1 ou 0,2µL

Détection : Selon le composé (mode MRM)

Fonctionnement de la vanne différentielle :

- 0,00 à 2,00min : élimination
- 2,01 à 5,50min : source d'ionisation

Annexe 7 : Evaluation de l'effet de matrice en CLHP-UV

	Diluant du standard	pH de la phase mobile	Longueur d'onde (nm)	Domaine de linéarité étudié ($R \geq 0,99$)	Répétabilité à la LQ (CV%)	Répétabilité à la plus haute concentration (CV%)
Composé A	H ₂ O/ACN (1/1)	4,5	305	0,01 - 1µg/mL	1,4	0,3
Composé B	H ₂ O/ACN (1/1)	4,5	260	0,01 - 1µg/mL	0,8	0,1
Composé C	H ₂ O/ACN (1/1)	4,5	260	0,02 - 5µg/mL	4,0	0,1
Composé D	H ₂ O	4,5	210	0,2 - 10µg/mL	1,0	0,5
Composé E	H ₂ O	4,5	210	0,2 - 10µg/mL	1,4	0,2
Composé F	H ₂ O/ACN (1/1)	10,0	210	0,1 - 5µg/mL	2,8	0,2
Composé G	H ₂ O/ACN (1/1)	4,5	210	0,2 - 5µg/mL	1,8	0,4
Composé H	H ₂ O	10,0	245	0,1 - 10µg/mL	1,2	0,6
Composé I	H ₂ O/ACN (1/1)	10,0	210	0,2 - 5µg/mL	1,7	0,9
Composé J	H ₂ O/ACN (1/1)	4,5	270	0,02 - 5µg/mL	0,1	1,0

Annexe 8 : Etude des particules superficiellement poreuses en mode isocratique

	Conditions analytiques						Particules entièrement poreuses		Particules superficiellement poreuses	
	Matrice	pH	Ratio phases mobiles (A/B)	Volume inj. (μL)	λ (nm)	Domaine de linéarité (ng/mL)	N	LQ (μg/mL)	N	LQ (μg/mL)
Composé A	H ₂ O/ACN	4,5	60/40	20	305	0,01 - 5	4 500	0,01	5 800	0,01
Composé B	H ₂ O/ACN	4,5	55/45	20	260	0,02 - 2,5	4 100	0,02	5 600	0,01
Composé C	H ₂ O/ACN	4,5	70/30	20	260	0,01 - 5	1 900	0,01	2 500	0,01
Composé D	H ₂ O	4,5	75/25	100	210	0,1 - 10	9 000	0,1	11 000	0,1
Composé E	H ₂ O	4,5	75/25	100	210	0,1 - 10	9 000	0,1	12 000	0,1
Composé F	H ₂ O/ACN	10,0	50/50	50	210	0,4 - 5	4 500	0,4	6 800	0,2
Composé G	H ₂ O/ACN	4,5	65/35	20	210	0,4 - 5	4 000	0,4	4 500	0,2
Composé H	H ₂ O	10,0	60/40	100	245	0,05 - 5	7 000	0,05	16 000	0,02
Composé I	H ₂ O/ACN	10,0	55/45	50	210	0,3 - 5	2 000	0,3	3 900	0,3
Composé J	H ₂ O/ACN	4,5	60/40	20	270	0,02 - 5	5 500	0,02	8 000	0,02

Le nombre de plateaux théoriques est calculé à la plus haute concentration.

Annexe 9 : Linéarité, sensibilité, répétabilité et exactitude en CLUHP-SM

	Domaine de linéarité	S/N à 0,01µM	CV (%) 0,01µM	Exactitude* 0,01µM (%)	CV (%) 0,1µM	CV (%) 1000ng/mL	Exactitude* 0,1µM (%)	Exactitude* 1000ng/mL(%)
Critères	R ≥ 0,99	S/N ≥ 10	CV ≤ 10,0%	90,0 - 110,0%	CV ≤ 1,5%		95,0 - 105,0 %	
Composé A	4 à 1000 ng/mL	> 100	2,0	99,0	0,5	0,8	102,2	103,2
Composé B	4 à 1000ng/mL	16	2,4	ND	1,4	1,2	ND	ND
Composé C	4 à 1000ng/mL	> 100	0,6	102,3	1,4	0,7	99,6	100,7
Composé D	2 à 1000ng/mL	12	1,1	99,5	0,7	0,5	102,6	102,6
Composé E	3 à 1000ng/mL	22	1,4	ND	1,4	0,5	ND	ND
Composé F	4 à 1000ng/mL	24	1,3	98,6	1,0	0,7	104,0	105,7
Composé G	3 à 1000ng/mL	42	2,8	ND	2,2	4,2	ND	ND
Composé H	3 à 1000ng/mL	> 100	1,5	95,5	0,5	0,5	105,1	100,6
Composé I	4 à 1000ng/mL	> 100	1,3	97,9	0,9	1,0	99,7	100,4
Composé J	4 à 1000ng/mL	> 100	0,5	101,0	0,5	1,2	98,9	100,8

* Pas d'injection de solutions « QC » pour les composés B, E et G.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 12 juin 2015

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par : Laurent LILTI

Sujet : Méthodes de dosage en milieu physiologique des nouvelles substances actives pour valider les résultats du test hERG.

Jury :

Président : M. Igor CLAROT, Maître de Conférences
 Directeur : M. Willy BRIÛNE, Responsable scientifique
 Juges : Mme Isabelle LARTAUD, Professeur
 M. Thomas WENDLING, Pharmacien

Vu,

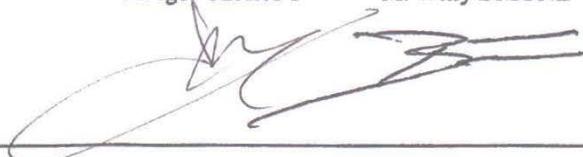
Nancy, le 04 Mai 2015

Le Président du Jury

Directeur de Thèse

M. Igor CLAROT

M. Willy BRIÛNE



Vu et approuvé,

Nancy, le 11.05.2015

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,



Vu,

Nancy, le 15 MAI 2015

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement :

6708

N° d'identification : 6708

TITRE

**METHODES DE DOSAGE EN MILIEU PHYSIOLOGIQUE DES NOUVELLES
SUBSTANCES ACTIVES POUR VALIDER LES RESULTATS DU TEST HERG**

Thèse soutenue le 12 juin 2015

Par Laurent LILTI

RESUME :

L'étude *in vitro* de l'inhibition du canal hERG intervient lors du développement non-clinique d'un nouveau médicament. Ce test, qui s'inscrit dans le cadre des essais de pharmacologie de sécurité cardiovasculaire, a pour but d'identifier les substances actives allongeant l'intervalle QT et de prévenir le risque de survenue de torsades de pointe, un type particulier d'arythmie ventriculaire. En effet, de nombreux médicaments, de différentes classes thérapeutiques et sans relation structurale, sont aujourd'hui identifiées comme torsadogènes. Cependant, le test hERG est soumis à plusieurs sources d'incertitude parmi lesquelles la solubilité, l'adsorption et la stabilité chimique. Ainsi, en accord avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire, les formulations perfusées sont échantillonnées et dosées par une méthode chromatographique. Trois difficultés majeures se présentent pour l'analyste : le milieu physiologique dans lequel sont dilués les échantillons qui peut causer un effet de matrice, la détection de potentielles très faibles concentrations (de l'ordre du ng/mL) et la faible solubilité aqueuse des composés apolaires. De récentes avancées technologiques (CLUHP, particules superficiellement poreuses...) peuvent être appliquées à l'analyse des échantillons hERG. Elles permettent d'élargir le domaine d'utilisation des détecteurs UV et des détecteurs de masse à simple quadripôle. Par une étude expérimentale nous montrons que ces deux modes de détection couvrent tout le domaine de concentration sur lequel l'analyste peut être amené à travailler en support des études *in vitro*, soit de 0,01µM à 100µM. Par ailleurs, l'extraction en phase solide (SPE) permet de purifier efficacement les échantillons avant leur analyse.

MOTS CLES : hERG Développement non-clinique CL-UV CL-SM
CLUHP SPE

Directeurs de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mr Igor Clarot	Chimie Analytique	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
Mr Willy Briône	UCB Pharma	Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Thème <input type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle