



Complementarité des protéines de detoxication et trafic intracellulaire

Adeline Cavelier

► To cite this version:

Adeline Cavelier. Complementarité des protéines de detoxication et trafic intracellulaire. Sciences du Vivant [q-bio]. Université René Descartes - Paris V, 2007. Français. NNT: . tel-00553511

HAL Id: tel-00553511

<https://theses.hal.science/tel-00553511>

Submitted on 12 Jan 2011

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

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

UNIVERSITE PARIS 5 - RENE DESCARTES
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année 2007

N°

THESE

pour l'obtention du Diplôme d'Etat de

DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

par

Adeline CAVELIER

le 6 Juillet 2007

Titre :

COMPLEMENTARITE DES PROTEINES DE DETOXICATION
ET TRAFIC INTRACELLULAIRE :

Recherche de liens fonctionnels
entre le cytochrome P450 3A et la P-glycoprotéine

JURY

M. le Professeur Jean-Michel WARNET, Président
M. le Docteur Marcel DELAFORGE
M. le Docteur Patrice RAT
M. le Docteur Jean-Marc VERBAVATZ

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay au sein du Département de Biologie Joliot-Curie, portant désormais l'appellation iBiTec-S, Institut de Biologie et de Technologies de Saclay.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Michel WARNET qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse et qui m'a beaucoup apporté, d'un point de vue professionnel et personnel, pendant mes années d'études en Pharmacie.

J'exprime mes sincères remerciements à Marcel DELAFORGE, directeur de cette thèse, pour m'avoir permis d'effectuer des travaux de recherche au sein de son laboratoire et pour ses conseils avisés, sa grande disponibilité, son enthousiasme et sa patience.

Je remercie Jean-Marc VERBAVATZ, spécialiste en microscopie, pour son aide indispensable, sa gentillesse et ses conseils, et pour avoir accepté d'être membre du jury.

Je tiens à remercier Patrice RAT, pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie également Stéphane ORLOWSKI, pour son aide et sa passion communicative pour la P-glycoprotéine, ainsi que Solenne MARTIN.

Je tiens également à mentionner tout le plaisir que j'ai eu à travailler au sein du Service de Biophysique des Fonctions Membranaires, et je remercie ici tous les membres, pour leur accueil et leur sympathie, en particulier Geneviève BOUILLE, pour ses conseils techniques et sa gentillesse.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	4
LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION.....	7
1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES	11
1.1. Les phases du métabolisme.....	11
1.1.1. Phase I.....	11
1.1.2. Phase II.....	14
1.1.3. Phase III.....	18
1.2. Les cytochromes P450	21
1.2.1. Historique.....	21
1.2.2. Classification et nomenclature.....	21
1.2.3. Répartition.....	22
1.2.4. Structure.....	24
1.2.5. Cycle catalytique.....	25
1.2.6. Implications des P450s dans les évènements biologiques.....	27
1.2.7. Modèles d'études des P450s.....	30
1.2.8. Régulation de l'expression des P450s.....	33
1.3. La P-glycoprotéine.....	38
1.3.1. Historique – Résistance aux chimiothérapies anticancéreuses.....	38
1.3.2. Répartition – Localisation.....	38
1.3.3. Structure.....	40
1.3.4. Fonctions.....	41
1.3.5. Modulation de l'activité ATPasique de la P-glycoprotéine.....	44
1.4. Couplage fonctionnel entre le cytochrome P450 3A et la P-glycoprotéine.....	49
1.4.1. Substrats communs au CYP3A et à la P-gp.....	49
1.4.2. Co-régulation du CYP3A et de la P-gp.....	50
1.4.3. Interaction fonctionnelle entre le CYP3A et la P-gp au niveau intestinal.....	51
1.4.4. Interaction fonctionnelle entre le CYP3A et la P-gp au niveau hépatique.....	52
1.4.5. Différences entre les interactions fonctionnelles au niveau intestinal et hépatique.....	53
2. MATERIELS ET METHODES	57
3. RESULTATS ET DISCUSSION	86
3.1. Mesures <i>in vitro</i> pour le choix des substrats.....	86
3.1.1. Les précurseurs de la résorufine.....	86
3.1.2. La 7-benzyloxy-4-trifluorométhylcoumarine.....	89
3.1.3. Le vérapamil-bodipy.....	90
3.2. Microscopie à épifluorescence	92
3.2.1. Foie humain.....	92
3.2.2. Foie de rat.....	97
3.2.3. Hépatocytes de rat.....	101
3.2.4. Fibroblastes de Hamster Chinois D/ADX.....	102
CONCLUSION.....	116
BIBLIOGRAPHIE	119

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Métabolisme des composés exogènes hydrophobes au sein d'une cellule.....	8
Figure 2 : Métabolisme de l'Aflatoxine B1.....	12
Figure 3 : Métabolisme du paracétamol.....	13
Figure 4 : Concentrations plasmatiques d'isoniazide mesurées 6 heures après l'administration d'une dose moyenne de 9.8 mg/kg à 267 membres de 53 familles.....	15
Figure 5 : Métabolisme de l'isoniazide.....	15
Figure 6 : Réaction de glucuronoconjugaison – Exemple de la formation d'un acylglucuronide	16
Figure 7 : Exemples de médicaments pouvant conduire à la formation d'acylglucuronides toxiques après action de l'UGT.....	17
Figure 8 : Interaction entre le gemfibrozil et la cérvastatine.....	18
Figure 9 : Protéines de transport dans la résistance multidrogue.....	20
Figure 10 : Répartition des P450s dans le foie humain.....	23
Figure 11 : Protoporphyrine IX liée à un atome de fer, une cystéine et une molécule de dioxygène.....	25
Figure 12 : Cycle catalytique du cytochrome P450.....	26
Figure 13 : Représentation de la NADPH-cytochrome P450 réductase et du cytochrome P450...	27
Figure 14 : Pharmacogénétique du CYP2D6 – Ratios métaboliques urinaires « débrisoquine/4-hydroxydébrisoquine » calculés chez 1011 patients suédois.....	36
Figure 15 : Structure de la P-gp.....	40
Figure 16 : Modèle pharmacophorique de reconnaissance multispécifique de la P-gp.....	43
Figure 17 : Translocation active du cholestérol par la P-gp à partir du feuillet cytosolique vers le feuillet exoplasmique.....	43
Figure 18 : Corrélation entre le SNP C3435T au niveau de l'exon 26 et l'expression de MDR1 d'une part et la fonction de la P-gp d'autre part.....	47
Figure 19 : Fréquence des génotypes pour le polymorphisme C3435T situé au niveau de l'exon 26 chez les Africains (Ghanéens), les Afro-américains, les Caucasiens et les Japonais.....	48
Figure 20 : Induction du CYP3A ou de la P-gp dans le foie de rats mâles (n=4) après administration de dexaméthasone 100 mg/kg/jour, rifampicine 100 mg/kg/jour, triacétololéandomycine 500 mg/kg/jour et pregnénolone 16 α -carbonitrile 50 mg/kg/jour.....	51
Figure 21 : Représentation schématique du cheminement d'un couple substrat/métabolite dans un entérocyte.....	54
Figure 22 : Représentation schématique du cheminement d'un couple substrat/métabolite dans un hépatocyte.....	55
Figure 23 : Principe de la mesure de l'activité d'hydrolyse d'ATP de la P-gp par spectrophotométrie en présence des enzymes couplées PK et LDH.....	62
Figure 24 : Schéma du montage permettant l'isolement des hépatocytes à partir d'un foie de rat entier.....	70
Figure 25 : Dissection d'un rat.....	71
Figure 26 : Fluorescence en présence de BZR, MTR, ETR et PTR en fonction du temps avec NADPH 0.6 mM dans les microsomes de rat [P450] = 0.1 μ M.....	87
Figure 27 : Activité ATPasique de la P-gp sur vésicules résistantes en présence de RESO ou x-Rés à différentes concentrations.....	88
Figure 28 : Activité ATPasique de la P-gp sur vésicules résistantes en présence de RESO ou x-Rés à 40 μ M en fonction de la concentration en VRP.....	89
Figure 29 : Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-3A et anti-Pgp sur coupes de foie humain, dans deux conditions expérimentales : avec fixation par le PFA 3% et avec post-fixation par le PFA 3%.....	92

Figure 30 : Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-3A et anti-Pgp sur coupes de foie humain, dans deux conditions expérimentales : avec SDS et sans SDS.....	93
Figure 31 : Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-P-gp C219 et anti-3A sur des coupes de foie humain.....	94
Figure 32 : Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-3A2 et anti-Pgp sur coupes de foie de rat, dans deux conditions expérimentales : rats traités à la dexaméthasone et rats témoins non traités à la dexaméthasone.....	98
Figure 33 : Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-Pgp et anti-3A2 sur coupes de foie de rat (traité à la dexaméthasone) incubé pendant 60 minutes avec la BZR.....	99
Figure 34 : Fluorescence des coupes de foie de rat (traité à la dexaméthasone) incubé pendant 30 ou 60 minutes avec RESO, BZR, ETR ou non incubé.....	100
Figure 35 : Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-3A et anti-P-gp C219 avec des fibroblastes pulmonaires de Hamster Chinois D/ADX observées par microscopie en épifluorescence.....	103
Figure 36 : Fluorescence de fibroblastes pulmonaires de Hamster Chinois D/ADX incubés pendant 18 minutes avec le vérapamil-bodipy 100 nM ou 1 µM en présence de glucose 1 mM, ou incubés avec du glucose 1 mM uniquement.....	107
Figure 37 : Quantification de la fluorescence après incubation des cellules D/ADX avec le VRP-BP ± VRP.....	112

TABLEAUX

Tableau I : Exemples d'enzymes participant au métabolisme des xénobiotiques.....	8
Tableau II : Réactions de phase I.....	11
Tableau III : Exemples de réactions de bioactivation et effets toxiques.....	11
Tableau IV : 49 transporteurs ABC humains.....	19
Tableau V : Exemples de médicaments substrats des P450s.....	23
Tableau VI : Exemples de médicaments substrats, inhibiteurs et inducteurs du CYP3A.....	24
Tableau VII : Avantages et limites des modèles hépatiques in vitro.....	32
Tableau VIII : Exemples d'inducteurs des P450s classés selon l'isoforme qu'ils induisent.....	34
Tableau IX : Exemples d'inhibiteurs des P450s classés selon l'isoforme qu'ils inhibent.....	35
Tableau X : Exemples de substrats, inhibiteurs et inducteurs de la P-glycoprotéine.....	42
Tableau XI : Eléments en faveur d'un couplage fonctionnel entre le CYP3A et la P-gp.....	49
Tableau XII : Exemples de médicaments substrats et/ou inhibiteurs communs au CYP3A et à la P-gp.....	50
Tableau XIII : Résumé de la coopération fonctionnelle entre le CYP3A et la P-gp dans les entérocytes et les hépatocytes.....	56
Tableau XIV : Protocoles d'accumulation et/ou d'efflux réalisés par incubation du VRP-BP avec des fibroblastes de Hamster chinois D/ADX surexprimant la P-gp.....	105
Tableau XV : Résultats des protocoles d'accumulation et/ou d'efflux réalisés avec des fibroblastes de Hamster chinois D/ADX surexprimant la P-gp.....	115

LISTE DES ABREVIATIONS

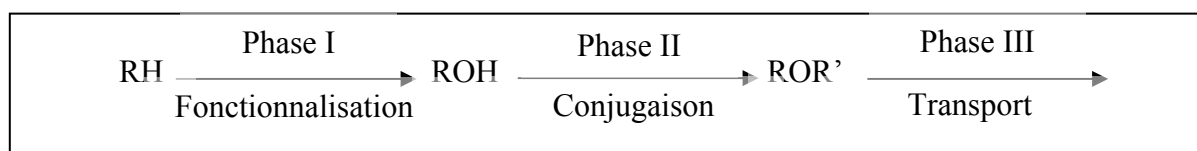
Ac : anticorps
ABC : ATP-binding cassette
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATP : adénosine triphosphate
BFC : 7-benzyloxy-4-trifluorométhylcoumarine
BSA : bovine serum albumin
BZR : 7-benzyloxyrésorufine
CEA : Commissariat à l'Energie Atomique
CsA : ciclosporine A
ETR : 7-éthoxyrésorufine
FITC : fluorescein isothiocyanate
HFC : 7-hydroxy-4-trifluorométhylcoumarine
MAR : mouse anti-rabbit
MDR : multi-drug resistance
MRP : multi-drug resistance protein
MTR : 7-méthoxyrésorufine
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
P450 : cytochrome P450
PBS : phosphate buffer saline
PFA : paraformaldéhyde
P-gp : P-glycoprotéine
PRG : progestérone
PTR : 7-pentoxyrésorufine
RAM : rabbit anti-mouse
RESO : résorufine
SDS : sodium dodécyl sulfate
SNP : single nucleotide polymorphism
VBL : vinblastine
VRP : vérapamil
VRP-BP : vérapamil-bodipy
x-Rés : différents précurseurs de la résorufine

INTRODUCTION

Dans notre environnement, nous sommes amenés à être exposés quotidiennement, directement ou indirectement, à des substances exogènes d'origines diverses, appelées xénobiotiques. Ces composés regroupent des médicaments, des produits naturels et des polluants de l'environnement : toxines végétales et animales, solvants, colorants, additifs alimentaires, pesticides, herbicides...

Généralement hydrophobes¹, ces molécules ont tendance à s'accumuler au niveau des lipides constituant les membranes cellulaires et risquent d'entraîner la mort des cellules. Pour lutter contre ces agressions, l'organisme humain s'est doté de systèmes enzymatiques permettant l'élimination des composés étrangers pour l'organisme entier, ou étrangers pour un certain type cellulaire (en effet, un médiateur neuronal par exemple ne trouvera pas sa place au niveau hépatique). L'élimination peut se faire soit directement, soit après transformation qui entraînera un changement de compartimentalisation et un changement d'affinité pour les constituants cellulaires.

Le processus de détoxification (Figure 1) se déroule en trois phases regroupant différentes enzymes de biotransformation afin d'éliminer les groupements hydrophobes et de neutraliser les groupements réactifs des xénobiotiques (phases I et II) et des transporteurs actifs permettant d'éliminer les substances exogènes de l'organisme (phase III).



¹ Selon la « Règle des 5 » de Lipinski [75], une molécule est considérée comme faiblement absorbée si :

- masse moléculaire > 500 Daltons
- $\log P \geq 5$
- nombre de donneurs d'hydrogène > 5
- nombre d'accepteurs d'hydrogène > 10

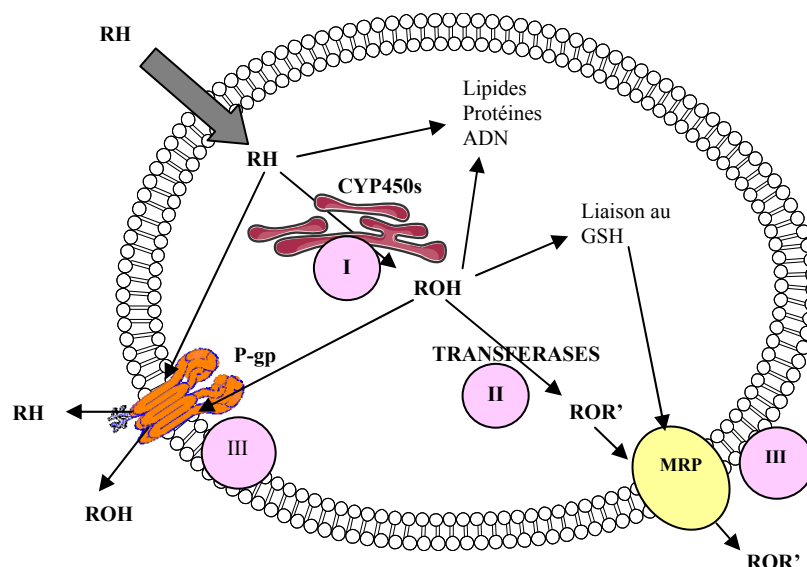


Figure 1 : Métabolisme des composés exogènes hydrophobes au sein d'une cellule
(D'après Dr Marcel Delaforge, CEA Saclay)

Légende : I, II, III : phases du métabolisme - R' : sucre, sulfate, acétate, méthyl

Les réactions de phase I (Tableau I) permettent la fonctionnalisation des molécules et ont ainsi une action générale de modification des propriétés d'oxydo-réduction des substrats, tendant à les rendre moins hydrophobes. Les enzymes de phase II amplifient le caractère hydrophile des substrats en les conjuguant à des groupements hydrophiles ou polaires (le plus souvent glutathion ou sucres). Ces molécules changent alors de compartiments, passant de la phase lipidique à la phase aqueuse. Enfin, les réactions de phase III font intervenir des transporteurs actifs multi-spécifiques d'efflux (principalement la P-gp et les MRP) permettant l'élimination des substances de l'organisme.

ENZYMES DE PHASE I	
OXYDASES	REDUCTASES
Cytochromes P450	Cytochromes P450
Monooxygénases à flavine	Glutathion peroxydases
Peroxydases	Carbonylréductases
Xanthine oxydases	Alcool déshydrogénases
Monoamine oxydases	HYDROLASES
Alcool déshydrogénases	Estérases
Aldéhyde déshydrogénases	Epoxyde hydrolases
ENZYMES DE PHASE II	
UDP-glucuronyltransférases	O-, N-, S-méthyltransférases
Glutathion-S-transférases	N-acétyltransférases
Sulfotransférases	
PROTEINES DE PHASE III	
P-glycoprotéine	OATP, protéines de transport des anions organiques
MRP, protéines de résistance multi-drogue	
BCRP, protéines de résistance dans le cancer du sein	OCT, transporteur de cations organiques

Tableau I : Exemples d'enzymes participant au métabolisme des xénobiotiques

Le métabolisme médié par le CYP3A, famille de cytochromes P450 la plus représentée dans le foie humain, est reconnu pour être un facteur limitant la biodisponibilité de médicaments administrés *per os*. De plus, l'efflux de molécules par la P-gp, un transporteur responsable de la résistance multi-drogue, contribue également à la variabilité de l'absorption et de la biodisponibilité des médicaments.

Plusieurs articles tendent à démontrer une éventuelle coopération fonctionnelle entre ces deux protéines majeures de détoxification. Ce couplage fonctionnel entre le métabolisme oxydo-réductif et un système de transport actif assurerait une élimination plus rapide des xénobiotiques. Plusieurs éléments sont en faveur d'un tel couplage:

- ✧ Co-localisation tissulaire (foie et intestin en particulier)
- ✧ Substrats, inducteurs et inhibiteurs communs
- ✧ Co-régulation au niveau du récepteur nucléaire PXR
- ✧ Co-localisation chromosomale

Si une co-localisation membranaire des deux protéines de détoxification et des substrats était mise en évidence, une telle organisation ultra-structurale rendrait compte d'une grande efficacité de détoxification.

Afin d'éclaircir les mécanismes d'une telle interaction au niveau cellulaire, nous nous intéresserons au rôle de la localisation cellulaire du CYP3A et de la P-gp et de la nature des membranes cellulaires impliquées et au trafic intracellulaire de composés sélectionnés. Plusieurs questions peuvent se poser :

- ✧ Comment le substrat RH arrive-t-il au niveau du réticulum endoplasmique, où se situe le CYP3A, après pénétration dans la cellule?
- ✧ Ce substrat RH est-il expulsé de la cellule sous forme inchangée, après prise en charge par la P-gp située au niveau de la membrane plasmique ?
- ✧ Ce substrat RH est-il métabolisé par le CYP3A au niveau du réticulum endoplasmique ?
- ✧ Comment le métabolite ROH formé par action du CYP3A au niveau du réticulum endoplasmique se retrouve-t-il au niveau de la membrane plasmique ?
- ✧ Ce métabolite ROH est-il pris en charge par la P-gp lors de sa sortie hors de la cellule ?

La localisation cellulaire du CYP3A et de la P-gp, réalisée par immunomarquage, et le suivi fonctionnel de substrats fluorescents sont étudiés grâce à des techniques de microscopie à épifluorescence. Les préparations utilisées sont des coupes de foie de rat et humain, des cellules hépatiques de rat en culture primaire ou des lignées cellulaires de fibroblastes de hamster chinois surexprimant la P-gp.

Un préalable est d'identifier des couples substrat/métabolite dont les deux entités ont des comportements différents en fluorescence et vis-à-vis du CYP3A et de la P-gp, l'idéal étant d'avoir un substrat non fluorescent métabolisé par le CYP3A en un métabolite fluorescent seul pris en charge par la P-gp. Un tel couple rendrait l'observation au microscope à épifluorescence plus aisée. La métabolisation d'un composé par le CYP3A est déterminée par fluorimétrie sur microsomes de rat et microsomes humains. La prise en charge par la P-gp est précisée par mesure de l'activité ATPasique de la P-gp sur des vésicules membranaires en spectrofluorimétrie.

1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

1.1. Les phases du métabolisme

1.1.1. Phase I

Les réactions de phase I ou réactions de fonctionnalisation permettent la formation d'une nouvelle fonction chimique (-OH, -NH₂, -COOH) rendant la molécule plus polaire. Ces réactions sont le plus souvent des réactions d'oxydations catalysées par les P450s, mais il peut également s'agir de réductions, d'hydrolyses (Tableau II).

Réactions	Enzymes	Exemples de réactions	
Oxydation	Oxydase	Hydroxylation aliphatique	$R-CH_3 \rightarrow R-CH_2OH$
Réduction	Réductase	Nitroréduction	$R-NO_2 \rightarrow R-NH_2$
Hydrolyse	Hydrolase	Hydrolyse d'amide	$R-CONH_2 \rightarrow R-COOH + NH_3$

Tableau II : Réactions de phase I

Cependant, les métabolites formés par action des enzymes de phase I ne sont pas toujours dénués de toxicité et sont parfois plus toxiques que la molécule mère ; de telles réactions sont qualifiées de « bioactivations ». Les intermédiaires réactifs formés suite à l'action des enzymes de phase I, bien que pouvant être métabolisés et détoxifiés par la suite, peuvent conduire à des pathologies. Quelques exemples sont présentés dans le tableau III.

XENOBIOTIQUES MIS EN JEU	ACTIONS TOXIQUES
FORMATION D'EPOXYDES	
Benzo-[a]-pyrène	Tumeur pulmonaire ou cutanée
Aflatoxine B1	Tumeur hépatique
Benzène	Myélotoxicité
Bromobenzène	Hépatotoxicité
Chlorobenzène	Hépatotoxicité
FORMATION DE RADICAUX LIBRES	
Tétrachlorure de carbone	Hépatotoxicité, néphrotoxicité
Halothane	Hépatotoxicité, néphrotoxicité
Chloroforme	Hépatotoxicité
Paracétamol	Hépatotoxicité
FORMATION DE NEOANTIGENES	
Halothane	Hépatite auto-immune
Acide tiénique	Hépatite auto-immune
FORMATION DES DERIVES ALKYLANTS	
Nitrosamines	Tumeurs

*Tableau III : Exemples de réactions de bioactivation et effets toxiques
(D'après les cours dispensés pendant le cursus de Pharmacie)*

© Cas de l'aflatoxine B1

L'aflatoxine B1, mycotoxine produite par *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*, contamine les aliments de base des êtres humains (notamment les céréales et oléagineux). Elle exerce ses effets toxiques uniquement après métabolisation en époxyde par l'action des P450s (3A4 et 1A2 en particulier [51]) : toxicité aiguë, effets immunotoxique, mutagène, tératogène et cancérogène [87]. La forme 8,9-époxyde est hautement réactive et peut se lier de façon covalente avec différentes macromolécules, incluant l'ADN, l'ARN et les protéines. La liaison aux acides nucléiques (formation d'adduits par attaque électrophile de l'azote en position 7 de la guanine [51]) entraîne des tumeurs hépatiques essentiellement. L'époxyde formé par action des enzymes de phase I peut également se lier au glutathion, par l'intermédiaire de la glutathion-S-transférase, ce qui constitue la voie de détoxification principale (Figure 2).

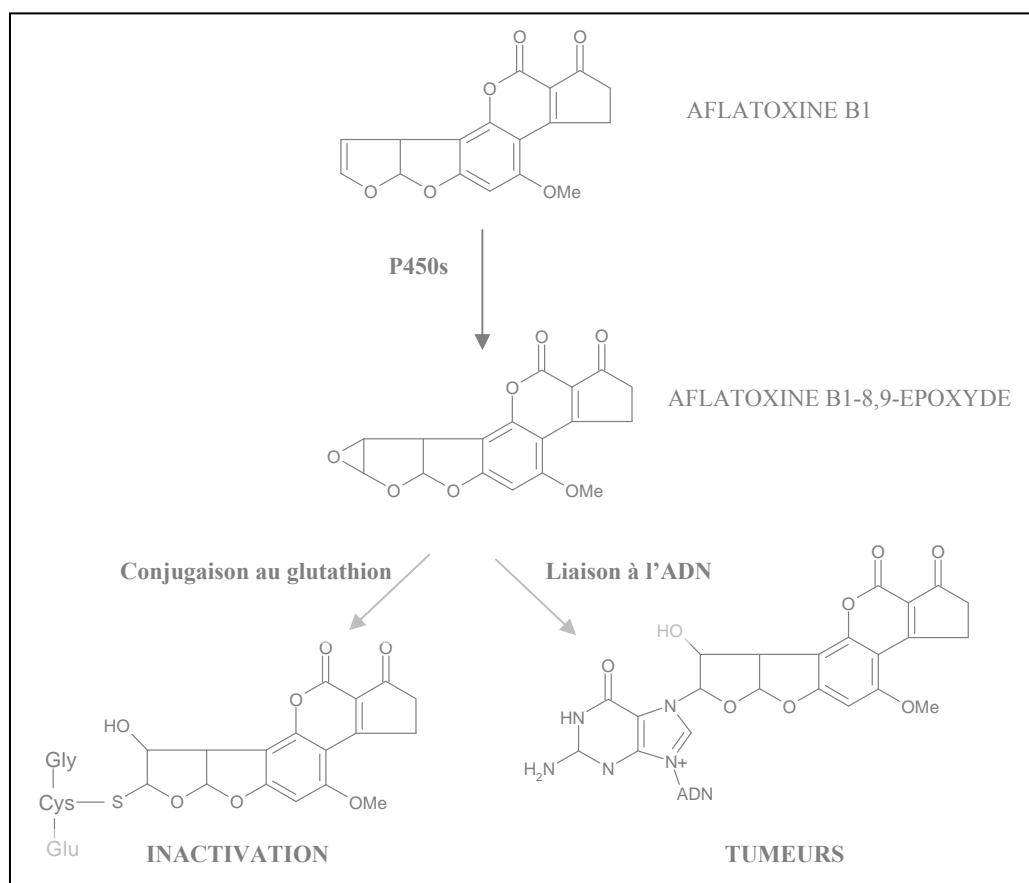


Figure 2 : Métabolisme de l'Aflatoxine B1
(D'après Guengerich, 2003 [49])

© Cas du paracétamol

Le paracétamol, ou acétaminophène, est un des analgésiques et antipyrétiques les plus utilisés au monde. Cependant, ce composé entraîne des effets hépatiques graves à forte dose. Ce n'est pas l'acétaminophène en lui-même qui est toxique, mais l'un de ses métabolites, le N-acétyl-*p*-benzoquinone imine, ou NAPQI, formé par action des P450s (2E1, 1A2, 3A4, 2A6 [63]). Aux doses thérapeutiques, la voie principale de métabolisation de l'acétaminophène est la sulfo- ou glucuroconjugaison, qui conduit à l'élimination du produit. Une faible proportion est oxydée en NAPQI, qui est détecté et éliminé de l'organisme après conjugaison avec le glutathion. Cependant, après ingestion de doses toxiques, le glutathion étant dépleté par les réactions de conjugaison, le métabolite réactif va se lier de façon covalente aux protéines. Cette liaison covalente aux macromolécules est à la source d'une toxicité hépatique qui se traduit par une nécrose au niveau centrilobulaire (Figure 3). Il existe un antidote clinique, la N-acétylcystéine, qui permet de stimuler la synthèse du glutathion au niveau hépatique et ainsi favoriser la voie d'élimination par conjugaison du NAPQI au glutathion [21, 63].

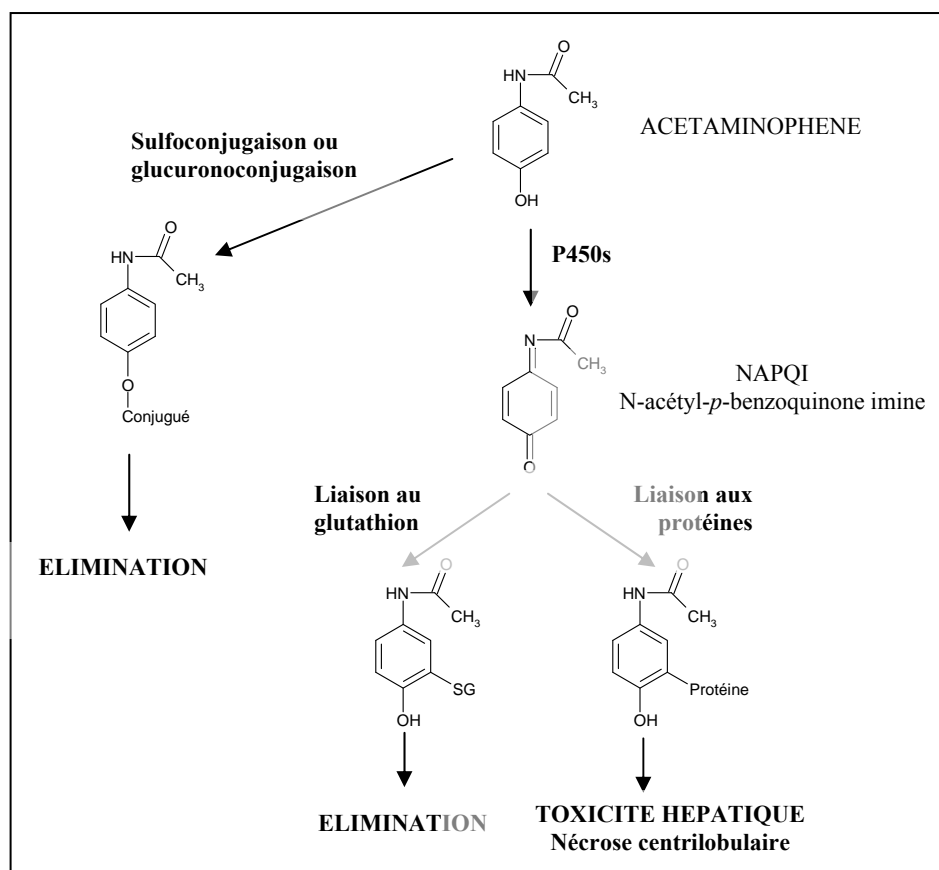
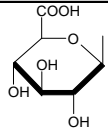


Figure 3 : Métabolisme du paracétamol
(D'après James, 2003 [63])

1.1.2. Phase II

Les réactions de phase II ou réactions de conjugaison permettent l'ajout d'un groupement hydrophile ou polaire soit sur le xénobiotique inchangé, soit sur le ou les métabolite(s) fonctionnalisés(s) produit(s) lors de la phase I. Les réactions de conjugaison les plus importantes sont les suivantes :

ROH + R'H → ROR'			
Réactions	Enzymes	R'	
Glucuronoconjugaison	UDP-glucuronosyl transférase	Acide glucuronique	
Conjugaison au glutathion	Glutathion-S-transférase	Glutathion	Acide γ-glutamique -S-Cystéine Glycine
Sulfoconjugaison	Sulfotransférase	Sulfate	-SO ₃ H
Méthylation	O-, N-, S-méthyl transférase	Méthyl	-CH ₃
Acétylation	N-acétyltransférase	Acétyl	-CO-CH ₃

Ces réactions de conjugaison augmentent l'hydrophilie de la molécule facilitant ainsi sa prise en charge par des protéines d'efflux conduisant à son transport et son élimination par voies rénale et biliaire. Cependant, les conjugaisons ne conduisent pas toujours à l'élimination du composé et peuvent au contraire être source de toxicité.

© Cas de l'isoniazide

L'isoniazide est une hydrazine utilisée dans la prophylaxie et le traitement de la tuberculose. L'isoniazide est acétylée en acétylisoniazide par la N-acétyltransférase 2 à localisation hépatique préférentielle et présentant un polymorphisme génétique. En effet, dans une population donnée, il existe une répartition bimodale de la capacité d'acétylation, définissant les acétyleurs rapides ($t_{1/2} \approx 2$ heures) et les acétyleurs lents ($t_{1/2} \approx 6$ heures) (Figure 4).

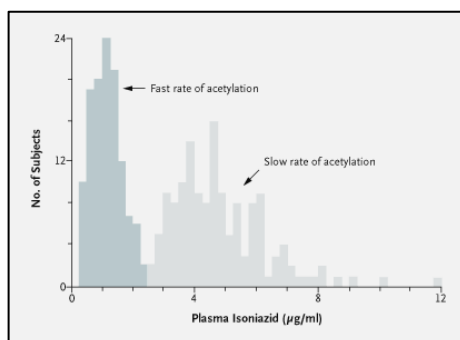


Figure 4 : Concentrations plasmatiques d'isoniazide mesurées 6 heures après l'administration d'une dose moyenne de 9.8 mg/kg à 267 membres de 53 familles (Weinshilbourn, 2003 [133])

La répartition de la capacité d'acétylation varie selon les ethnies, ainsi, environ 45% des Européens, 80 à 90% des Asiatiques, la quasi-totalité des Esquimaux, 17% des Egyptiens sont acétyleurs rapides. Le caractère acétyleur lent se transmet selon le mode autosomique récessif. Pour une posologie standard, les risques d'apparition d'effets indésirables par surdosage, en particulier neurologiques, sont plus élevés chez les acétyleurs lents. De plus, une exposition prolongée aux métabolites toxiques chez ces sujets entraîne une augmentation du risque de développement d'une hépatite induite par l'isoniazide [58, 106]. En effet, l'acétylisoniazide est hydrolysée en acétylhydrazine qui est en partie transformée en un radical acétyl, métabolite instable probablement responsable de l'hépatotoxicité de l'isoniazide par acétylation de macromolécules hépatiques [137] (Figure 5).

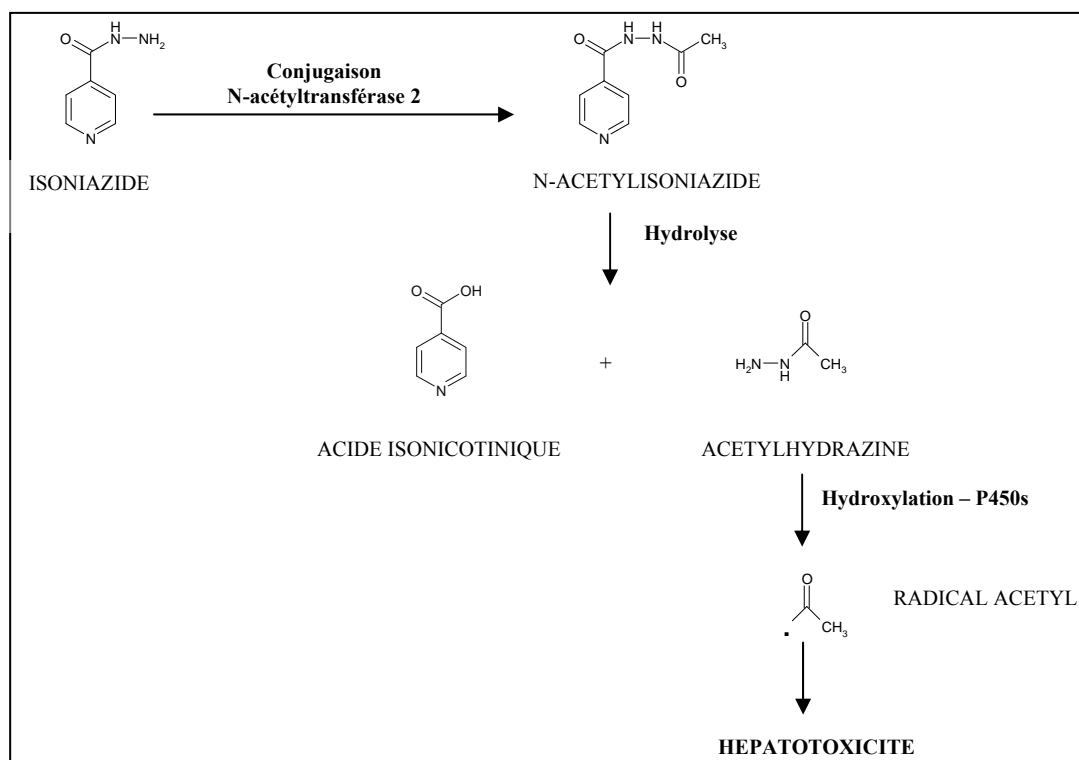


Figure 5 : Métabolisme de l'isoniazide
(D'après PM Woster [137])

© Cas des glucuronides

Les glucuroconjugués, formés par action d'enzymes de conjugaison, peuvent également conduire à une toxicité. En règle générale, les glucuronides, provenant de la conjugaison du xénobiotique avec l'acide glucuronique sous l'action de l'UDP-glucuronosyltransférase (Figure 6), famille d'enzymes microsomales hépatiques et rénales essentiellement, ne sont pas toxiques.

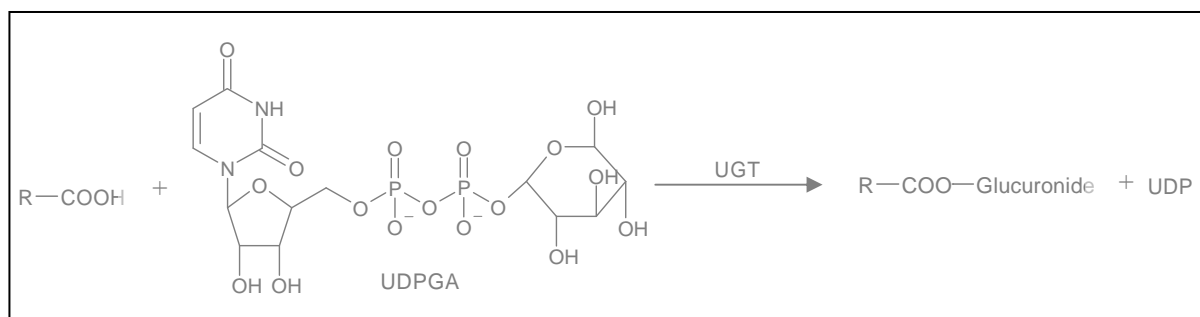


Figure 6 : Réaction de glucuroconjugaison – Exemple de la formation d'un acylglucuronide
(D'après Ritter, 2000 [112])

Légende : UDP : uridine diphosphate / UDPGA : acide uridine-5'-diphospho- α D-glucuronique / UGT : UDP-glucuronyltransférase

Cependant, un certain nombre de glucuronides, en particulier les acylglucuronides, formés sur des acides carboxyliques, sont connus pour être instables et réactifs et provoquer des toxicités. Ces métabolites, pouvant atteindre des taux plasmatiques importants, subissent des hydrolyses et des réarrangements intramoléculaires pH-dépendants conduisant à des isomères. Ils sont susceptibles de réagir avec les protéines plasmatiques, les protéines tissulaires et les acides nucléiques [33, 127]. Ces réactions sont suspectées d'entraîner des manifestations cytotoxiques, carcinogènes et immunologiques incluant des hépatotoxicités, des néphropathies et des réactions d'hypersensibilité allergique. Des exemples de médicaments contenant un groupement carboxylique dans leur formule chimique et pouvant conduire à ce type de réaction après action des enzymes de phase II de glucuroconjugaison sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (diclofénac), les hypolipémiants (clofibrate) et les anticonvulsivants (acide valproïque) (Figure 7) [112].

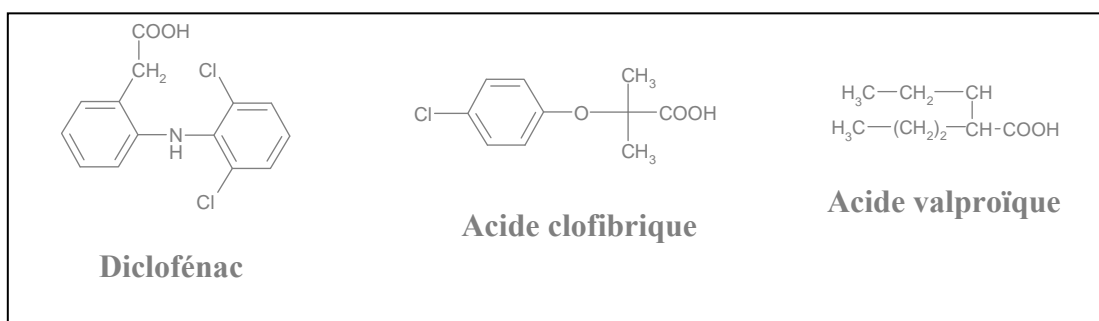


Figure 7 : Exemples de médicaments pouvant conduire à la formation d'acylglucuronides toxiques après action de l'UGT (D'après Ritter, 2000 [112])

© Cas du gemfibrozil

Les fibrates et les statines (ou inhibiteurs de la HMGCoA réductase) sont des agents hypocholestérolémiants fréquemment associés dans le but de traiter certains types d'hyperlipidémie. Cependant, cette association a souvent été reportée comme étant source d'interactions médicamenteuses, comme en témoigne le retrait du marché, en 2001, de la cériavastatine, dû à un nombre important de cas de rhabdomyolyses, parfois mortelles, survenant en grande majorité chez des patients co-traités par le gemfibrozil [110]. Le mécanisme d'interaction entre ces deux molécules a été longuement étudié [101, 132]. La cériavastatine est principalement métabolisée en un métabolite hydroxylé (M-23) par le CYP2C8. Le gemfibrozil est métabolisé en acylglucuronide (gemfibrozil 1-O-beta-glucuronide) par l'intermédiaire des enzymes de glucuroconjugaison de phase II. Cet acylglucuronide est à son tour transformé en un métabolite hydroxylé par l'intermédiaire du système P450. Ce sont ces métabolites qui sont à la source de l'interaction observée entre la cériavastatine et le gemfibrozil. En effet, ces composés, en particulier le dérivé hydroxylé, sont de puissants inhibiteurs du CYP2C8. L'IC₅₀ pour l'inhibition du CYP2C8 passe en effet de 24 µM pour l'acylglucuronide à 1.8 µM pour le métabolite hydroxylé [101]. Ils inhibent donc le métabolisme oxydatif de la cériavastatine, conduisant à une augmentation de la concentration plasmatique de la cériavastatine et aux effets indésirables en résultant (Figure 8).

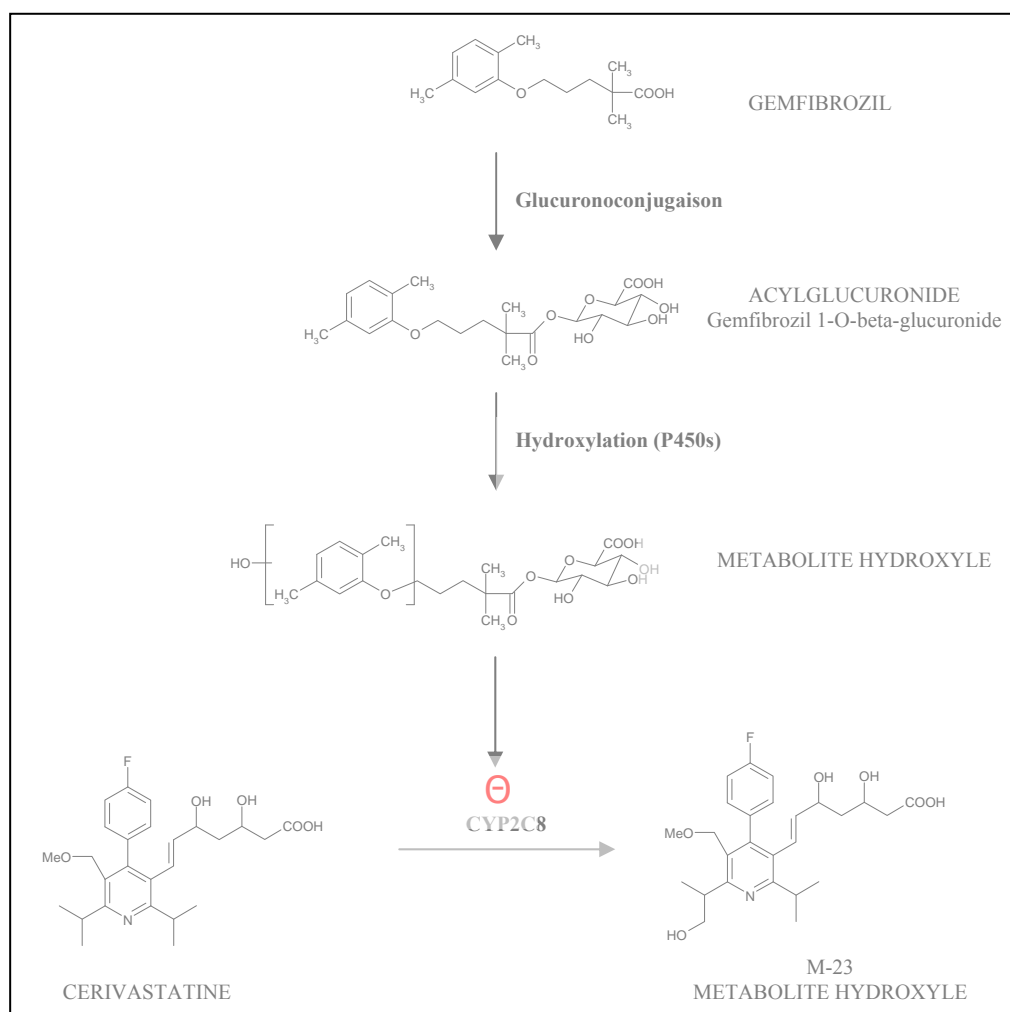


Figure 8 : Interaction entre le gemfibrozil et la cérvastatine
(D'après Ogilvie, 2006 [101])

1.1.3. Phase III

Les protéines de phase III permettent l'élimination active des xénobiotiques inchangés polaires et/ou de leurs métabolites conjugués hydrophiles. Ces transporteurs membranaires peuvent se situer sur la face apicale ou basolatérale de la cellule et ainsi éliminer les composés dans le sang, la lumière intestinale, la bile, l'urine. Cette excrétion permet ainsi une élimination rénale, fécale ou un cycle entéro-hépatique, responsable d'un temps d'élimination des médicaments anormalement élevé.

Ces transporteurs de phase III sont des systèmes de transport actifs, utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter les substrats à travers les membranes biologiques. C'est pourquoi on les appelle les ABC-transporteurs, pour ATP-Binding

Cassette. Il s'agit d'une grande superfamille de protéines transmembranaires. A l'heure actuelle, 7 sous-familles de transporteurs ABC humains (ABCA à ABCG) et 49 transporteurs ont été caractérisés (Tableau IV) [93].

Sous-famille	A	B	C	D	E	F	G
Nom	ABC1	MDR/TAP	CFTR/MRP	ALD	OABP	GCN20	White
Symbole	ABC A	ABC B	ABC C	ABC D	ABC E	ABC F	ABC G
Membres	12	11	13	4	1	3	5 (+1?)
Membres impliqués dans la résistance multidrogue		MDR1/P-gp (ABCB1)	MRP1, 2, 3, 4, 5, 6 (ABCC1, 2, 3, 4, 5, 6)				BCRP (ABCG2)

Tableau IV : 49 transporteurs ABC humains ([93])

Abbreviations : ABC, ATP-binding cassette ; ALD, adrenoleukodystrophy ; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ; GCN, General Control Nonderepressible ; MDR, multidrug resistance ; MRP, multidrug resistance protein ; OABP, organic anion binding protein ou oligoadenylate binding protein ; P-gp, P-glycoprotéine ; TAP, transporter associated with antigen processing.

Une très grande variété de substrats peut être transportée au travers des membranes cellulaires par les protéines ABC : acides aminés, lipides, ions, sucres, drogues... Certains transporteurs de la famille ABC assurent des fonctions physiologiques essentielles : élimination des toxines au niveau de l'intestin ou du foie, limitation de la pénétration de toxiques dans les organes les plus sensibles comme le cerveau ou le placenta.

Cependant, certains sont également impliqués dans l'apparition de pathologies chez l'Homme [92]. En effet, l'inactivation de certains transporteurs est à l'origine de maladies génétiques dont voici quelques exemples : syndrome de Dubin-Johnson, mucoviscidose, hyperinsulinisme familial, adrénoleucodystrophie, dégénérescence maculaire, cholestase intra-hépatique progressive familiale.

De plus, une surexpression de certains transporteurs ABC peut provoquer une résistance des agents infectieux aux médicaments, une virulence des bactéries pathogènes, ou encore une résistance des cellules tumorales à des agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie, conduisant à un échec de la chimiothérapie anticancéreuse. En effet, la P-gp et d'autres enzymes de résistance multidrogue sont responsables dans les cellules tumorales de l'excrétion hors de la cellule des agents anticancéreux (MDR1/P-gp, MRPs, BCRP), et/ou

de leur séquestration intracellulaire (LRP, MDR1/P-gp, MRPs, BCRP), conférant aux cellules le phénotype de résistance multidrogue (Figure 9) [6, 36].

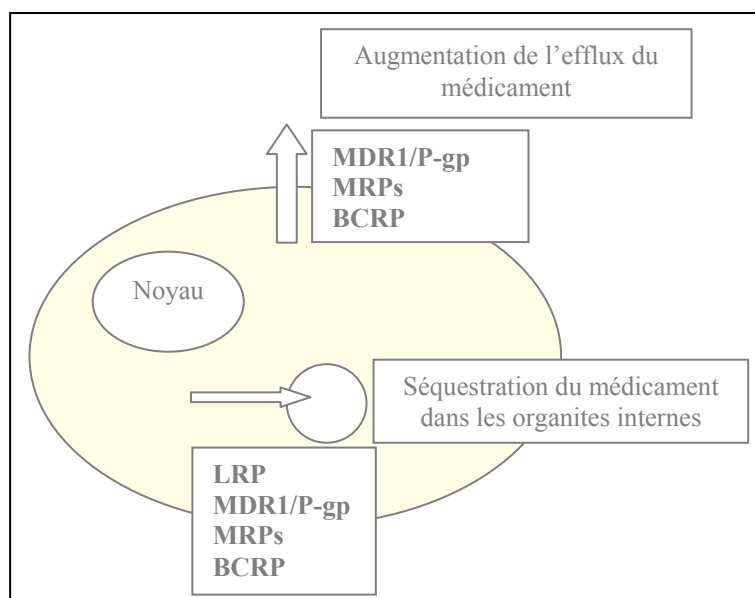


Figure 9 : Protéines de transport dans la résistance multidrogue
(D'après Filipits, 2004 [36])

Abréviations : BCRP, breast cancer resistance protein ; LRP, lung resistance protein ; MDR, multidrug resistance ; MRP, multidrug resistance protein ; P-gp, P-glycoprotein.

1.2. Les cytochromes P450

1.2.1. Historique

Dès 1955, Axelrod [4] et Brodie *et al.* [12] identifient un système enzymatique, dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes, capable d'oxyder les xénobiotiques. Mais ce n'est qu'en 1958 que Garfinkel et Klingenberg [40, 67] détectent un pigment liant le monoxyde de carbone dans des microsomes hépatiques de rat et de porc. Ils remarquent alors que le complexe monoxyde de carbone-enzyme réduite (le fer est sous la forme ferreux) présente un maximum d'absorption à 450 nm. Il fut démontré plus tard qu'il s'agit d'une hémoprotéine, identifiée comme un nouveau membre des cytochromes de type b [102, 103]. Cette hémoprotéine sera alors appelée cytochrome P450. La première voie métabolique étudiée impliquant le P450 fut l'hydroxylation des stéroïdes au niveau des glandes corticosurrénales [16, 32]. Ce rôle d'oxydase fut confirmé dans le système microsomal hépatique, au niveau du réticulum endoplasmique [25].

Depuis la découverte des P450s, le nombre de publications concernant ce sujet ne cesse d'augmenter. Entre 1990 et 2000, 21000 articles ont été publiés dans la base de données PubMed [111] (1500 en 1990 jusqu'à 2500 en 2000) contre seulement 11000 entre 1980 et 1990, et 4500 entre 1970 et 1980. En 2006, on comptait 3400 articles et ce nombre devrait encore augmenter dans les années à venir.

1.2.2. Classification et nomenclature

Les P450s dériveraient d'un gène ancestral commun datant de 3,5 milliards d'années et les premiers P450s seraient issus des bactéries, des levures et des plantes [46].

En 1995, Nelson *et al.* [99] répertoriaient 481 gènes codant pour les P450s et 22 pseudogènes. Ces gènes ont été décrits chez 85 eucaryotes (incluant les vertébrés, les invertébrés, les champignons et les plantes) et 20 procaryotes. De nombreux autres P450s ont été isolés depuis. On dénombre ainsi pour le moment 708 familles et 814 sous-familles, et 125 allèles, correspondant à 3043 séquences différentes [98].

A l'heure actuelle, on dénombre 18 familles de P450s humains et 43 sous-familles. Cinquante-sept gènes codant pour les P450s humains et 58 pseudogènes ont été séquencés.

Ces enzymes sont classées selon une méthode basée sur les homologies de séquences en acides aminés [96]. Ainsi, deux P450s appartiennent à la même famille lorsque leur séquence en acides aminés présente une homologie de plus de 40% (par exemple la famille 3). Les séquences avec plus de 55% d'homologies appartiennent à la même sous-famille (par exemple la sous-famille A) [97].

Les P450s sont abrégés ainsi : CYP pour cytochrome P450, un nombre pour la famille, une lettre majuscule pour la sous-famille puis un nombre pour l'isoforme. Par exemple, CYP3A4 est le 4^{ème} isoforme du cytochrome P450 appartenant à la famille 3 et à la sous-famille A.

1.2.3. Répartition

Les P450s [73] sont présents chez de nombreuses espèces : les mammifères, les oiseaux, les poissons, les reptiles, les insectes, les mollusques, les arthropodes, les crustacées, les champignons, les plantes, les bactéries. Chez les mammifères, ces enzymes sont présentes dans de nombreux tissus : foie, rein, peau, épithélium nasal, gonades, placenta, cerveau, poumon, rate, pancréas, tractus gastro-intestinal. Les P450s sont en revanche absents des muscles, des os et des globules rouges, mais néanmoins présents au niveau de l'endothélium vasculaire et des globules blancs.

Dans le foie, les P450s se trouvent dans les hépatocytes dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse. Entre 12 et 15% des protéines du réticulum endoplasmique sont composées de P450s. Les P450s représentent 1 à 2% du poids d'un hépatocyte. Les P450s les plus abondants dans le foie sont ceux de la famille 3A, 2C et 1A (Figure 10). Ces P450s sont donc en particulier impliqués dans la métabolisation des molécules exogènes absorbées *per os*, et sont donc indispensables à considérer lors des études de toxicologie et de pharmacologie. En effet, le foie est le premier organe responsable de forte métabolisation rencontré par les médicaments (par l'intermédiaire du système porte après passage au niveau de l'intestin), ce qui a pour conséquence un effet de premier passage hépatique pouvant diminuer fortement la biodisponibilité des médicaments administrés *per os*. Nous étudierons en particulier les P450s de la famille 3A, puisque ceux-ci métabolisent environ 60% des médicaments actuellement sur le marché. Quelques exemples de substrats des P450s sont présentés dans le tableau V et des exemples de substrats du CYP3A4 en particulier sont indiqués dans le tableau VI.

Chez les mammifères, il existe une autre classe de P450s : les P450s mitochondriaux. Ils sont intégrés dans les membranes internes des mitochondries. Les plus connus sont ceux du cortex des glandes surrénales. Ils interviennent dans la biosynthèse des hormones stéroïdes, mais semblent également avoir un rôle dans le métabolisme des xénobiotiques [2].

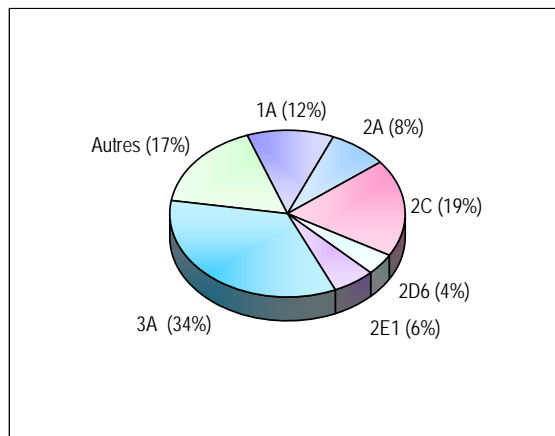


Figure 10 : Répartition des P450s dans le foie humain (D'après Shimada, 1994 [126])

1A2	- Antidépresseurs tricycliques imipraminiques : amitriptyline, clomipramine, imipramine - Autres : caféine, estradiol, fluvoxamine, halopéridol, ondansétron, paracétamol, propranolol, théophylline, vérapamil, zolmitriptan
2B6	- Alkylants : cyclophosphamide, ifosfamide - Autres : bupropion, efavirenz, méthadone
2C8	Paclitaxel
2C19	- Antidépresseurs tricycliques imipraminiques : amitriptyline, clomipramine, imipramine - Inhibiteurs de la pompe à protons : lansoprazole, oméprazole - Autres : citalopram, cyclophosphamide, diazépam, indométhacine, nelfinavir, phénytoïne, progestérone, proguanil, propranolol, R-warfarine
2C9	- Antagonistes de l'angiotensine II : losartan, irbesartan - Anti-inflammatoires non stéroïdiens : diclofénac, ibuprofène, méloxicam, naproxène, piroxicam - Sulfonylurées : glibenclamide, glipizide, glimépiride - Autres : amitriptyline, célécoxib, fluoxétine, fluvastatine, phénytoïne, rosiglitazone, tamoxifène, S-warfarine
2D6	- Antidépresseurs : amitriptyline, clomipramine, fluoxétine, imipramine, paroxétine - Antitussifs : codéine, dextrométhorphan - Bêta-bloquants : carvedilol, S-métoprolol, propafénone, timolol - Neuroleptiques : halopéridol, perphénazine, rispéridone - Autres : chlorphénamine, chlorpromazine, flécainide, fluvoxamine, lidocaïne, métoclopramide, ondansétron, propranolol, tamoxifène, tramadol
2E1	- Anesthésiques : enflurane, halothane, isoflurane, sévoflurane - Autres : paracétamol, théophylline
3A4, 5, 7	- Antagonistes calciques : diltiazem, fêlodypine, nifédipine, vérapamil - Anti-arythmiques : amiodarone, lidocaïne, quinidine - Antibiotiques macrolides : clarithromycine, érythromycine, azithromycine, télicycline - Antirétroviraux : indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir - Benzodiazépines : alprazolam, diazépam, midazolam - Immunomodulateurs : ciclosporine, sirolimus, tacrolimus - Statines : atorvastatine, lovastatine, pravastatine, simvastatine - Stéroïdes : estradiol, hydrocortisone, progestérone, testostérone - Autres : alfentanil, caféine, codéine, dapsone, dextrométhorphan, docétaxel, dompéridone, fentanyl, halopéridol, lidocaïne, méthadone, propranolol, sildénafil, tamoxifène, zolpidem

Tableau V : Exemples de médicaments substrats des P450s ([61])

SUBSTRATS		
Agents anticancéreux	Benzodiazépines	Inhibiteurs des canaux calciques
Etoposide	Alprazolam	Amlodipine
Doxorubicine	Diazépam	Diltiazem
Paclitaxel	Midazolam	Féلودipine
Vinblastine	Triazolam	Nicardipine
Vincristine	Hormones	Nifédipine
Vindésine	Dexaméthasone	Nitrendipine
Anti-arythmiques	Estradiol	Vérapamil
Amiodarone	Hydrocortisone	Autres
Lidocaïne	Progestérone	Cisapride
Quinidine	Testostérone	Digitoxine
Antibiotiques macrolides	Immunosuppresseurs	Halopéridol
Clarithromycine	Ciclosporine	Méthadone
Erythromycine	Sirolimus	Tamoxifène
Antirétroviraux	Tacrolimus	Terfénadine
Indinavir	Inhibiteurs de la HMGCoA réductase	
Ritonavir	Atorvastatine	
Saquinavir	Lovastatine	
INHIBITEURS		
Anti-arythmiques	Antirétroviraux	Autres
Amiodarone	Indinavir	Cimétidine
Quinidine	Nelfinavir	Ciclosporine
Antibiotiques macrolides	Ritonavir	Fluvoxamine
Clarithromycine	Inhibiteurs des canaux calciques	Mifépristone
Erythromycine	Diltiazem	Tamoxifène
Antifongiques	Nicardipine	Troléandomycine
Itraconazole	Nifédipine	
Kétoconazole	Vérapamil	
INDUCTEURS		
Carbamazépine	Phénytoïne	Millepertuis
Dexaméthasone	Rifabutine	Troglitazone
Phénobarbital	Rifampicine	

Tableau VI : Exemples de médicaments substrats, inhibiteurs et inducteurs du CYP3A4
(D'après Loeffler, 2007 [78] et Wachter, 1995 [131])

1.2.4. Structure

Les P450s sont des hémoprotéines : ils sont constitués d'une partie protéique, l'apoprotéine, et d'un groupement prosthétique constitué d'une protoporphyrine IX liée à un atome de fer par quatre liaisons covalentes. La cinquième liaison de coordination du fer est réalisée avec le groupement thiolate d'une cystéine conservée au niveau du site actif de l'enzyme [97]. Diverses molécules comme l'eau, le monoxyde de carbone et l'oxygène moléculaire peuvent se fixer au niveau de la sixième liaison, mais un atome d'azote peut

également s'y fixer, c'est le cas par exemple avec les antifongiques azolés qui entraînent des inhibitions du CYP3A (Figure 11).

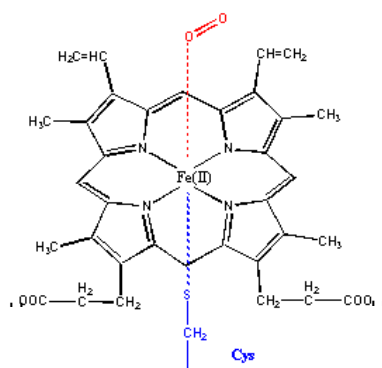
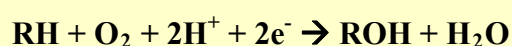


Figure 11 : Protoporphyrine IX liée à un atome de fer, une cystéine et une molécule de dioxygène (D'après Jakubowski, 2006 [62])

En absence de substrat, le fer ferrique est hexacoordonné et l'enzyme est alors dans un état de bas spin. Il existe un équilibre entre l'état de haut spin et l'état de bas spin. La fixation du substrat dans le site hydrophobe par l'intermédiaire de liaisons de faible énergie labiles (liaisons qui peuvent être covalentes dans certaines manifestations toxiques) va provoquer le déplacement de la molécule d'eau liée au fer et provoquera une modification de l'équilibre en faveur de l'état de haut spin (Figure 12) [104]. L'affinité d'un substrat pour un P450 dépendra du nombre et de l'intensité des liaisons formées entre le substrat et le site actif.

1.2.5. Cycle catalytique

Le rôle physiologique principal des enzymes de la superfamille P450 est la mono-oxygénation. La réaction catalysée peut être résumée ainsi :



RH étant le substrat et ROH le métabolite formé.

La réaction médiée par le P450 implique en effet la combinaison d'une molécule de dioxygène avec un substrat organique RH pour produire une molécule d'eau et un métabolite mono-oxygéné. Les 2 équivalents réduits sont apportés par le NADPH ou le NADH, en fonction du type de P450 [73].

A l'état « normal », l'enzyme est ferrique dans un état de bas spin. La fixation du substrat entraîne un changement de spin vers le haut spin. Le potentiel redox est alors suffisamment bas pour que l'enzyme puisse être réduite par un électron. Le fer devenu ferreux peut alors fixer l'oxygène moléculaire. Le complexe oxygéné formé, en équilibre entre deux formes isoélectroniques, peut alors être réduit par un deuxième électron. C'est cette réaction qui initie l'étape catalytique et l'activation de l'oxygène. S'en suit un apport de deux protons avec libération d'une molécule d'eau, puis la libération du produit métabolisé par le P450 (Figure 12).

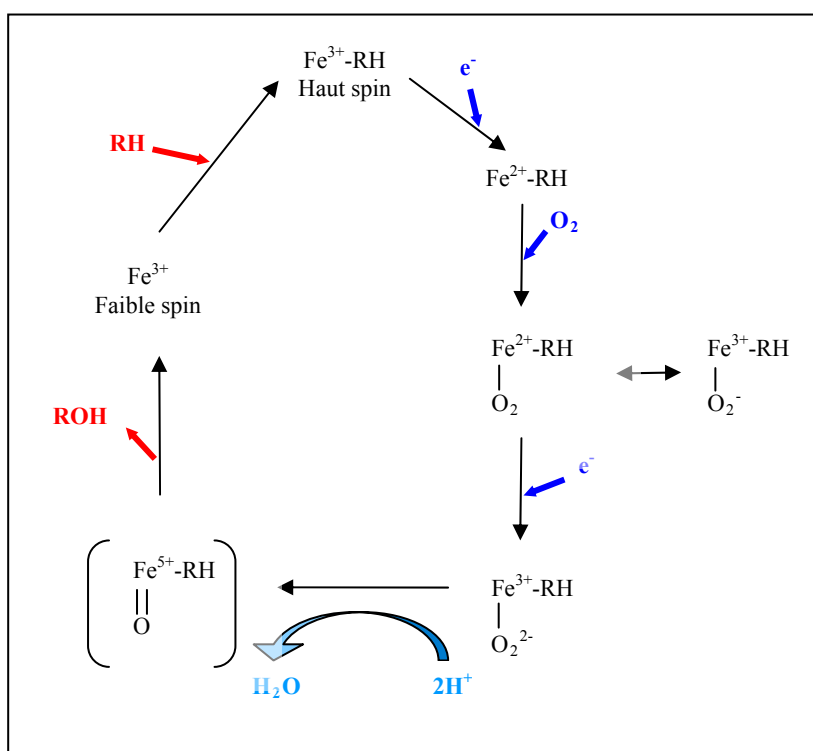


Figure 12 : Cycle catalytique du cytochrome P450
(D'après Bienvenüe, 2004 [11])

Légende : Les différents états redox successifs de la protéine sont abrégés en désignant uniquement l'état du fer au centre de l'hème.

Concernant les P450s microsomaux, les deux électrons sont apportés par la NADPH-cytochrome P450 réductase. Cette enzyme permet en effet le transfert de l'électron apporté par le NADPH vers le P450. Il s'agit d'une flavoprotéine, qui nécessite 2 cofacteurs : le FAD (Flavo-adénine-dinucléotide) et le FMN (Flavo-mono-nucléotide) (Figure 13). Une autre réductase, l'adrénodoxine-réductase, est mise en jeu dans le cas des P450s mitochondriaux.

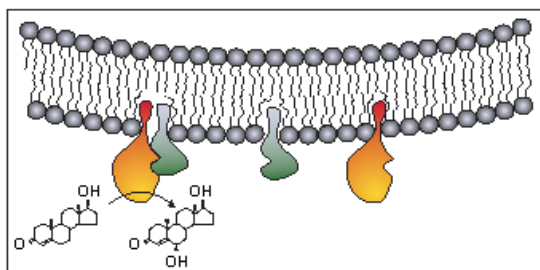


Figure 13 : Représentation de la NADPH-cytochrome P450 réductase et du cytochrome P450 ([95])

Légende : La NADPH-cytochrome P450 réductase interagit avec le cytochrome P450, permettant le transfert des électrons du NADPH vers l'atome de fer de l'hème. Sur cette figure, la testostérone est alors métabolisée en 6-β-hydroxytestostérone par le CYP3A4.

En orange est représenté le P450 ; en vert est représentée la NADPH-cytochrome P450 réductase comprenant le NADPH, le FAD et le FMN.

1.2.6. Implications des P450s dans les événements biologiques

Les P450s sont impliqués dans le métabolisme oxydatif, peroxydatif et réducteur de substrats endogènes comme les stéroïdes, les prostaglandines et les acides gras, mais aussi exogènes tels les polluants de l'environnement, les médicaments, les carcinogènes [22, 50].

1.2.6.1. Métabolisme des xénobiotiques

Plus de 200000 molécules chimiques peuvent être métabolisées par les P450s humains, catalysant plusieurs types de réactions différentes dont les oxydations, réductions, déshalogénations [73], désaturations, clivages d'esters, déshydratations... [48]

Chez les mammifères et les autres espèces animales, les P450s des familles CYP1, CYP2 et CYP3 catalysent les réactions de phase I du métabolisme de la majorité des composés exogènes auxquels est exposé l'organisme. Le foie est le principal organe où se trouvent ces enzymes chez les mammifères, même si une activité métabolique a déjà été décrite dans d'autres organes et tissus (intestin, sein, poumon, prostate, cerveau...).

Les P450s catalysent un très grand nombre de biotransformations, qui se différencient principalement par l'activité biologique éventuelle du métabolite obtenu [48]. Dans la plupart des cas, ce dernier n'a pas d'activité. Le substrat subit en effet une étape de fonctionnalisation, ce qui permettra aux enzymes de conjugaison de phase II d'augmenter l'hydrophilie du composé et de faciliter ainsi son élimination urinaire ou fécale. Il peut

cependant arriver que le métabolite formé par action d'un P450 présente une activité biologique. Ainsi, le produit obtenu à la suite du métabolisme d'un composé par un P450 peut être toxique pour l'organisme, par activation de procarcinogènes ou formation de radicaux libres [45]. Les métabolites formés sont de nature électrophile et vont réagir avec des structures nucléophiles de l'organisme pour conduire à des réactions néfastes, réactions avec des protéines ou des lipides à l'origine de nécrose, ou avec des acides nucléiques à l'origine de mutations voire de cancers. Dans le tableau III sont présentés quelques exemples de réactions induites par les P450s pouvant générer la formation de métabolites toxiques.

Un autre aspect de la toxicité causée par les P450s est l'apparition d'effets indésirables lors d'interactions médicamenteuses. Par exemple, des torsades de pointes peuvent apparaître lorsque des inhibiteurs du CYP3A4 sont administrés avec le cisapride. De même, des rhabdomyolyses ont été associées à la coadministration de statines et d'inhibiteurs du CYP3A4 [29].

Les P450s sont donc impliqués dans des phénomènes de toxicité, mais la formation d'un métabolite présentant une activité biologique peut également être bénéfique dans le cas de l'activation d'une prodrogue en molécule active avec des propriétés thérapeutiques. C'est le cas par exemple de l'ifosfamide et du cyclophosphamide, des cytotoxiques alkylants faisant partie de la classe des moutardes à l'azote [115].

Les P450s ont également un rôle au niveau de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie des xénobiotiques et donc au niveau de leur impact clinique. La métabolisation par le P450 a en effet une influence sur la durée de vie du composé actif dans l'organisme et donc sur son activité thérapeutique. En effet, un composé métabolisé rapidement par le P450 en un métabolite inactif n'aura que peu de temps pour exercer son action au niveau de la cible thérapeutique puisque sa demi-vie sera considérablement diminuée. Par exemple, les dérivés de l'ergot de seigle ont un temps de demi-vie d'élimination très court. Ce sont les métabolites produits par action du CYP3A, possédant un temps de demi-vie plus long, qui sont actifs et responsables de l'activité sur plusieurs heures, notamment dans le traitement des migraines et des hypotensions orthostatiques.

De plus, des interactions médicamenteuses peuvent être bénéfiques voire recherchées. Certains inhibiteurs de protéases utilisés dans le traitement du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), comme le saquinavir ou l'indinavir, ont une faible

biodisponibilité par voie orale qui est améliorée par l'administration concomitante de ritonavir. En effet, le ritonavir forme un complexe avec le fer du CYP3A qui est ainsi bloqué. L'inhibiteur de protéases, qui est donc beaucoup moins métabolisé, peut alors exercer son action thérapeutique [37]. De même, l'administration d'un inhibiteur du CYP3A4 avec la ciclosporine permet de réduire les doses et par conséquent le coût de l'immunosuppresseur [29].

Un paramètre important à considérer concernant l'action des P450s, et plus généralement en toxicologie, est la dose. Prenons l'exemple de la ciclosporine, médicament utilisé contre le rejet de greffe et dans le traitement de certaines maladies auto-immunes. Elle est métabolisée par le CYP3A4 en plusieurs métabolites oxygénés dont certains possèdent une activité pharmacologique. L'administration de cette molécule à faibles doses permet d'obtenir un effet thérapeutique immunosuppresseur. A forte dose, la ciclosporine devient néphrotoxique de façon dose-dépendante. De fortes concentrations peuvent être obtenues par exemple après une consommation excessive de jus de pamplemousse, inhibiteur du CYP3A4 [30].

Les P450s métabolisent des substrats de structure et taille très variées. Les différentes isoformes des CYP3A peuvent par exemple métaboliser un nombre important de substrats (plus de 300), de masse moléculaire très variée : de 190 Daltons pour la N-hydroxy-Arginine à 1200 Daltons pour la ciclosporine.

1.2.6.2. Métabolisme des substances endogènes

Chez les espèces animales, et les mammifères en particulier, les fonctions endogènes principales des P450s incluent la biosynthèse des stéroïdes, le métabolisme des prostaglandines et des acides gras, l'oxydation lipidique et l'hydrolyse de la vitamine D3. D'autres rôles endogènes ont été suggérés, notamment pour les P450s impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. Ainsi, le CYP1A1 a un rôle dans le catabolisme de l'hème, le CYP1A2 dans le métabolisme de l'estradiol, les CYP2A, 2B, 2C et 3A dans le métabolisme de la testostérone, le CYP2D dans le métabolisme des catécholamines et le CYP2E dans la néoglucogenèse [73].

Les P450s responsables de la biosynthèse des stéroïdes par exemple présentent une spécificité d'expression tissulaire et subcellulaire. Les P450s présents dans les mitochondries des glandes surrénales (CYP11) conduiront à la formation de pregnénolone, progestérone, corticostérone et aldostérone à partir du cholestérol. Ceux présents dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes (CYP17, 21 et 19) aboutiront à l'androstènedione et la testostérone, et l'activité aromatasase du CYP19, également présent dans le placenta et les gonades, formera les œstrogènes [73].

Ces voies métaboliques sont très importantes puisqu'un déficit en certains des P450s impliqués dans ces activités peut engendrer des maladies très graves. Ainsi, un défaut d'expression du CYP21, causé par une mutation du gène codant pour la 21-hydroxylase, conduit à une hyperplasie congénitale des surrénales, maladie génétique rare pouvant entraîner des accidents graves de déshydratation et des anomalies de la croissance [135].

1.2.7. Modèles d'études des P450s

Les différents modèles d'études des fonctions hépatiques sont représentés dans le tableau VII. Il existe de nombreux systèmes d'études, chacun ayant une utilité spécifique dans un domaine particulier. Classiquement, la technique du foie isolé perfusé, les tranches de foie, les hépatocytes isolés et en culture sont employés en développement préclinique, les microsomes servent au screening avant les études chez l'animal.

L'Homme est le meilleur modèle d'étude. Cependant, les modèles humains *in vitro* pour évaluer l'hépatotoxicité sont peu utilisés en industrie pharmaceutique. En effet, les données littéraires sont peu fournies et leur utilisation entraîne des difficultés techniques, du fait de leur variabilité et de leur manque de disponibilité [34]. Les morceaux de foie humain sont en effet difficiles à obtenir, puisque les foies sont en priorité réservés pour les transplantations hépatiques. L'industrie pharmaceutique et la recherche peut toutefois obtenir des morceaux de foie sains prélevés lors d'une biopsie d'un foie malade lors de cancer par exemple, puisqu'une partie non touchée du foie est systématiquement enlevée pour éliminer au maximum les cellules tumorales. De plus, l'utilisation de foie humain pose des problèmes éthiques. Le Comité d'éthique doit donner son accord au préalable, valable uniquement pour un projet bien déterminé.

Les modèles obtenus à partir de rongeurs, en particulier les rats, sont beaucoup plus disponibles. Les rats peuvent être traités par des injections de dexaméthasone avant leur sacrifice. Ce corticoïde entraîne une surexpression des cytochromes de la famille 3A, famille la plus présente dans le foie humain. L'extrapolation des données obtenues à l'Homme est alors facilitée. Des injections de phénobarbital, de la famille des barbituriques, ou de 3-méthylcholanthrène, hydrocarbure aromatique polycyclique carcinogène, induisant les cytochromes de la famille 2 et 1 respectivement, peuvent également être réalisées [26].

Les modèles hépatiques que nous avons utilisés sont les microsomes de rat et humains, les coupes de foie de rat et humain, les hépatocytes de rat en culture primaire (hépatocytes commercialisés congelés) et les hépatocytes isolés à partir du foie de rat puis mis en culture primaire.

Les applications des modèles hépatiques *in vitro* dans les études de pharmacotoxicologie sont diverses et comprennent l'étude des paramètres cinétiques (K_m , V_{max} ...), du profil métabolique des xénobiotiques, des comparaisons inter-espèces, des inductions et inhibitions enzymatiques par action des P450s et des enzymes de phase II, des P450s impliqués dans la métabolisation de divers composés, des interactions médicamenteuses, de l'influence du polymorphisme génétique, de cytotoxicité et génotoxicité... [53]

D'un point de vue réglementaire, les recommandations proposées en vue de l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) se sont considérablement développées au cours de ces dix dernières années. Il y a une dizaine d'années, il suffisait pour le laboratoire pharmaceutique de démontrer que le composé était métabolisé ou non (grâce aux techniques du foie isolé perfusé et des coupes de foie). Au fur et à mesure des années, d'autres informations ont dû être apportées dans chaque dossier d'AMM, afin de garantir une meilleure efficacité et une meilleure sécurité au médicament mis sur le marché. Ainsi, le ou les métabolites sont identifiés et leurs éventuelles activités thérapeutiques, toxicités, réactivités vis-à-vis des macromolécules sont déterminées. Ensuite, le lieu où se passe le métabolisme, le ou les organes impliqués, sont mentionnés (grâce à l'utilisation de l'organisme entier). Les systèmes enzymatiques impliqués sont indiqués (avec l'utilisation d'hépatocytes ou de microsomes), en vue de prévoir les interactions possibles avec les voies métaboliques de produits endogènes, exogènes (interactions médicamenteuses) ou de nutriments. Dans ce même but et pour étudier le polymorphisme génétique, les isoformes impliquées sont également citées (à la suite d'études sur enzymes purifiées ou avec des inhibiteurs). Ainsi, un médicament substrat du CYP3A ou du CYP2D6 a toutes les chances

d'être rejeté dès le début du développement. En effet, environ 60% des médicaments sur le marché sont métabolisés par le CYP3A, ce qui augmente le risque d'interactions médicamenteuses. En ce qui concerne le CYP2D6, il est soumis à un important polymorphisme génétique, un médicament métabolisé par cette isoforme ne pourra donc pas être utilisé de la même façon dans toutes les populations.

Modèle	Avantages	Limites
Foie isolé perfusé	Fonctions proches de celles de l'organe <i>in vivo</i> Equipeement enzymatique préservé Structure lobulaire conservée Canalicules biliaires fonctionnels Collecte de la bile possible Etudes cinétiques court terme	Viabilité : 2-3 heures Etude d'un faible nombre de composés Diminution de l'excrétion biliaire après 1 à 3 heures Pas d'études sur le foie humain Approprié pour de petits animaux Pas de réduction du nombre d'animaux utilisés
Coupes de foie	Structure lobulaire conservée Equipeement enzymatique préservé Etudes possibles sur foie humain Etudes de plusieurs composés à différentes concentrations	Viabilité : 6 heures à 2 jours Collecte de bile impossible Toutes les cellules ne sont pas conservées de la même façon (variabilité inter-étude)
Hépatocytes isolés	Obtenus à partir de foies entiers ou de biopsies Fonctions proches de celles des hépatocytes <i>in vivo</i> Etudes de plusieurs composés à différentes concentrations Etudes inter-espèces Représentatifs de différentes sous-populations lobulaires Cryoconservation	Viabilité : 2-4 heures en suspension Pas de canalicules biliaires
Cultures primaires d'hépatocytes	Fonctions exprimées pendant plusieurs jours dans certaines conditions Induction/inhibition des enzymes de métabolisation Etudes inter-espèces	Changements phénotypiques précoces Canalicules biliaires altérés
Lignées d'hépatocytes	Nombre de cellules illimité Quelques fonctions conservées	Activités enzymatiques perdues ou diminuées Instabilité génotypique
Microsomes	Activités enzymatiques préservées Production de métabolites	Etudes court terme Pas de réactions d'enzyme de phase II cytosoliques Nécessité de cofacteurs pour les mesures d'activité Mélange d'isoformes
Enzymes purifiées P450 recombinants	Activités enzymatiques préservées Etudes inter-espèces Etudes des différentes isoformes séparément	Pas de vue d'ensemble de la métabolisation

Tableau VII : Avantages et limites des modèles hépatiques *in vitro*
(D'après A. Guillouzo, 1998 [53])

1.2.8. Régulation de l'expression des P450s

La variabilité d'expression intra- et inter-espèces des P450s est régulée par de nombreux facteurs : par des facteurs non génétiques incluant les facteurs environnementaux, les produits chimiques, les aliments, les médicaments (inducteurs ou inhibiteurs), le sexe, l'âge, la physiologie, les pathologies... et par des facteurs génétiques, c'est-à-dire le polymorphisme.

1.2.8.1. Origine non génétique

1.2.8.1.1. Induction

Une des caractéristiques des P450s est que certaines de ces enzymes, en particulier celles impliquées dans la métabolisation des xénobiotiques, sont inductibles. L'induction est souvent un procédé de régulation lent, car il fait intervenir un mécanisme transcriptionnel ou post-transcriptionnel [136].

L'expression du CYP3A peut être induite par des xénobiotiques. Une telle induction entraîne un métabolisme accéléré soit des xénobiotiques (auto-induction), soit de médicaments substrats du CYP3A administrés simultanément, en altérant leurs profils pharmacocinétique et pharmacodynamique [82]. Ce phénomène sera à l'origine d'une diminution des concentrations plasmatiques, avec un risque d'échec thérapeutique. Par exemple, le phénobarbital, inducteur du CYP2B, est rapidement métabolisé par le P450 qu'il induit. La conséquence sera une diminution des concentrations plasmatiques de phénobarbital et une réapparition des crises d'épilepsie chez les patients.

Les mécanismes d'induction des P450s sont complexes et différent selon la sous-famille de P450s concernée. Une augmentation de la transcription est le plus souvent mise en jeu, mais il existe des augmentations de stabilité ou des diminutions de dégradation des ARNm ou de la protéine elle-même. Le premier mécanisme d'induction démontré a été celui de l'augmentation du taux du CYP1A1 après traitement par des hydrocarbures aromatiques polycycliques comme les dioxines. Le processus est initié par liaison du ligand au récepteur Ah cytosolique. Le complexe est alors transloqué dans le noyau. Le récepteur Ah s'associe à

une seconde protéine, l'ARNT (Ah Receptor Nuclear Translocator). Ce complexe se lie à une séquence consensus XRE (Xenobiotic Responsive Element) présente dans le promoteur du gène de la protéine induite et active donc la transcription du CYP1A1 [60]. Le CYP3A est également inductible. Il existe en effet un récepteur à la pregnénolone PXR (Pregnan X Receptor) et une séquence de fixation de ce récepteur dans le promoteur des P450s humains. Le récepteur fixe des stéroïdes mais également une grande variété de médicaments dont la rifampicine et les glucocorticoïdes. Deux autres mécanismes impliquant des récepteurs sont connus. Il s'agit des PPAR (Peroxisome Proliferator Activator Receptor) et CAR (Constitutive Androstane Receptor), ce dernier, par liaison des barbituriques, permet l'induction du CYP2B6 [39]. D'autres cytochromes, comme le CYP2E1, sont induits par des mécanismes de stabilisation des ARNm mais également par des mécanismes de stabilisation de la protéine sous l'effet de l'éthanol. En effet, la dégradation de ce P450 par les protéases est retardée car l'éthanol diminue l'activité des protéasomes [107].

Sur le tableau VIII sont indiqués quelques exemples d'inducteurs des P450s en fonction de l'isoforme qu'ils induisent. Certains inducteurs induisent plusieurs isoformes de P450, comme la rifampicine qui induit les CYP2B6, 2C8, 2C19, 2C9, 2D6 et 3A. Des exemples d'inducteurs du CYP3A4 en particulier sont présentés dans le tableau VI.

1A2	Brocolis, choux de bruxelles, insuline, méthylcholantrène, modafinil, β -naphthoflavone, oméprazole, tabac, viande grillée
2B6	Phénobarbital, Rifampicine
2C8	Rifampicine
2C19	Carbamazépine, noréthistérone, pentobarbital, prednisone, rifampicine
2C9	Rifampicine, Sécobarbital
2D6	Dexaméthasone, Rifampicine
2E1	Ethanol, Isoniazide
3A4, 5, 7	Barbituriques, carbamazépine, dexaméthasone, efavirenz, millepertuis, modafinil, névirapine, oxcarbazépine, phénobarbital, phénytoïne, pioglitazone, rifabutine, rifampicine, troglitazone

Tableau VIII: Exemples d'inducteurs des P450s classés selon l'isoforme qu'ils induisent ([61])

1.2.8.1.2. Inhibition

Les inhibiteurs des P450s peuvent être classés en trois catégories selon le type d'inhibition qu'ils entraînent : inhibition réversible où l'agent se lie de façon réversible, inhibition quasi-irréversible où l'agent forme un complexe quasi-irréversible avec l'atome de fer de l'hème, et inhibition irréversible où l'agent se lie de façon irréversible à la protéine ou au groupement prosthétique, ou accélère la dégradation de ce dernier [74, 105]. Les inhibiteurs quasi-irréversibles et irréversibles nécessitent une étape catalytique pour inactiver l'enzyme.

Un inhibiteur réversible ou compétitif interfère directement avec le site actif sans nécessité d'une activité catalytique. L'inhibiteur interagit avec le site actif de la protéine, soit directement avec le fer de l'hème, soit par l'intermédiaire de liaisons de faible énergie : liaisons hydrogènes, interactions ioniques ou hydrophobes au niveau des acides aminés du site actif. Les antifongiques azolés font partie des inhibiteurs directs par fixation du ligand et formation d'un complexe stable P450 Fe-N imidazole.

Un inhibiteur qui nécessite une étape catalytique est un inhibiteur suicide. Plusieurs sites de fixation sur la protéine sont possibles. L'inhibiteur peut se fixer de manière covalente à l'apoprotéine (cas du métabolite du chloramphénicol), de façon quasi-irréversible au fer de l'hème (cas de la troléandomycine ou de l'érythromycine) ou de manière covalente à l'hème (cas de l'éthynilestradiol ou du gestodène).

Quelques exemples d'inhibiteurs des P450s sont inscrits dans le tableau IX et des exemples d'inducteurs du CYP3A4 en particulier sont présentés dans le tableau VI.

1A2	Amiodarone, cimétidine, fluoroquinolones, fluvoxamine
2B6	Ticlopidine
2C8	Glitazones, triméthoprim
2C19	Chloramphénicol, cimétidine, fluoxétine, fluvoxamine, indométhacine, kétoconazole, oméprazole, ticlopidine
2C9	Amiodarone, fluconazole, fluvastatine, fluvoxamine, isoniazide, lovastatine, phénylbutazone, sertraline, sulfaméthoxazole, triméthoprim
2D6	Amiodarone, célécoxib, chlorpromazine, chlorphénamine, cimétidine, citalopram, cocaïne, doxorubicine, fluoxétine, méthadone, métoclopramine, paroxétine, quinidine, ranitidine, ritonavir, sertraline, terbinafine, ticlopidine
2E1	Diéthylthiocarbamates, disulfiram
3A4, 5, 7	Amiodarone, chloramphénicol, cimétidine, ciprofloxacine, clarithromycine, diltiazem, érythromycine, fluconazole, fluvoxamine, gestodène, indinavir, itraconazole, jus de pamplemousse, kétoconazole, mifépristone, nelfinavir, norfloxacine, ritonavir, vérapamil

Tableau IX: Exemples d'inhibiteurs des P450s classés selon l'isoforme qu'ils inhibent ([61])

1.2.8.2. Origine génétique

L'une des principales causes de variation interindividuelle des effets des médicaments est le polymorphisme génétique des enzymes de métabolisation. Celui-ci permet de distinguer des sous-groupes dans la population, qui diffèrent dans leur capacité de métaboliser certaines molécules. Ce polymorphisme est dû à des mutations sur les gènes codant pour les enzymes de détoxification qui sont à l'origine de diminution, augmentation ou absence d'expression ou d'activité d'une protéine par divers mécanismes moléculaires [88].

Un certain nombre de P450s sont maintenant connus pour leur polymorphisme d'expression ou de fonction. Presque toutes les isoformes des familles 1 à 3 présentent un polymorphisme, cependant, la fréquence et le nombre des mutations décrites varient beaucoup d'une enzyme à l'autre.

Le CYP2D6 a été très étudié en terme de polymorphisme d'expression [8, 59]. Ce polymorphisme a d'abord été mis en évidence avec la débrisoquine, une molécule antihypertensive non commercialisée en France. Le CYP2D6 est impliqué dans le métabolisme de plusieurs grandes classes thérapeutiques de médicaments, comme les antiarythmiques, les antidépresseurs et les neuroleptiques, ce qui représente plus de 20% des médicaments métabolisés dans le foie humain. Le polymorphisme du CYP2D6 se manifeste selon trois phénotypes principaux appelés métaboliseurs lents (PM, Poor Metabolizer), métaboliseurs rapides (EM, Extensive Metabolizer) et métaboliseurs ultra-rapides (UM, Ultrarapid Metabolizer) (Figure 14). La répartition de ces différents phénotypes varie selon la population concernée, en effet, environ 7% des Caucasiens mais seulement 1% des Orientaux sont métaboliseurs lents.

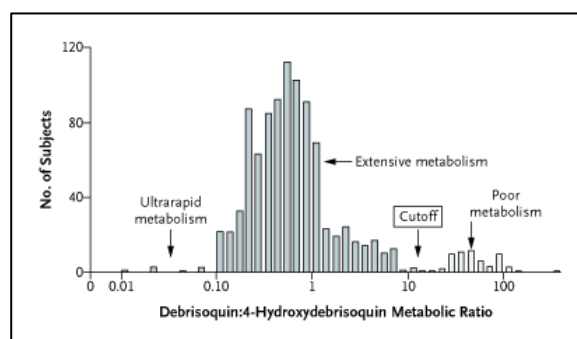


Figure 14 : Pharmacogénétique du CYP2D6 – Ratios métaboliques urinaires « débrisoquine/4-hydroxydébrisoquine » calculés chez 1011 patients suédois (D'après Weinshilboum, 2003 [133]).

Le polymorphisme du CYP2D6 affecte significativement la pharmacocinétique d'environ 50% des médicaments substrats de cette isoforme. Les conséquences d'un tel polymorphisme à dose thérapeutique peuvent se manifester soit par des effets indésirables par accumulation du médicament chez les métaboliseurs lents, soit par une absence de réponse au traitement chez les métaboliseurs rapides mais aussi chez les métaboliseurs lents dans le cas des prodrogues.

Prenons l'exemple de la codéine, pro-drogue métabolisée en morphine par le CYP2D6. L'absence de ce cytochrome chez 7% des Caucasiens entraîne un défaut de métabolisation de la codéine en son métabolite actif, conduisant à une inefficacité thérapeutique analgésique. De plus, cette population de métaboliseurs lents subira les effets indésirables de la codéine, à savoir principalement des nausées, en particulier si les doses sont augmentées dans le but d'atteindre un effet analgésique [13].

Un autre exemple de polymorphisme génétique est celui affectant le CYP2C9, celui-ci étant absent chez 1% des Caucasiens. La variabilité de la réponse interindividuelle à la warfarine, anticoagulant oral métabolisé par le CYP2C9, est attribuée en partie au polymorphisme génétique du CYP2C9 [65]. Les patients traités par cet anticoagulant risquent de présenter des effets indésirables de type hémorragique dus à l'accumulation de la molécule faiblement métabolisée. Un génotypage du CYP2C9 peut être effectué afin d'adapter les posologies pour chaque individu. En effet, à l'instauration du traitement par la warfarine, la posologie entraînant une réponse optimale est inconnue et le risque d'apparition d'effets indésirables est augmenté.

1.3. La P-glycoprotéine

1.3.1. Historique – Résistance aux chimiothérapies anticancéreuses

La résistance des cellules tumorales aux agents cytotoxiques représente un obstacle majeur à la chimiothérapie anticancéreuse. Les mécanismes en cause sont multiples, extrinsèques (liés aux relations hôte-tumeur ou hôte-médicament) ou intrinsèques (liés aux cellules cancéreuses elles-mêmes) [6]. Un ensemble de mécanismes de résistance cellulaire est lié à la diminution des concentrations intracellulaires en médicaments cytotoxiques, soit par diminution de l'absorption soit par augmentation de l'efflux hors de la cellule. Le mécanisme responsable de cet efflux, et donc du phénotype de résistance à certains médicaments, est lié à la présence de transporteurs membranaires, dont le premier décrit a été la P-glycoprotéine [64].

La résistance multidrogue (MDR pour « multidrug resistance ») est définie comme étant une résistance croisée des cellules tumorales vis-à-vis d'agents cytostatiques de famille et de modes d'action très divers. La surexpression de la P-gp peut conférer à la cellule le phénotype MDR [85].

1.3.2. Répartition – Localisation

1.3.2.1. Localisation tissulaire

La P-gp, codée par le gène *mdr-1*, est une enzyme exprimée dans la membrane plasmique de certaines cellules. Cette protéine a d'abord été décrite au niveau de cellules en lignée d'ovaires de hamster chinois [64]. La P-gp est exprimée dans les cellules tumorales, mais également dans les tissus humains sains de façon constitutive : la P-gp est localisée spécifiquement au niveau de certains types tissulaires dans le foie, le pancréas, les reins, le côlon, le jéjunum, la barrière hémato-encéphalique, les testicules, le placenta...[130]

1.3.2.2. Localisation dans la membrane plasmique

Dans le foie, la P-gp est retrouvée exclusivement au niveau des canalicules biliaires bordant les hépatocytes et au pôle apical des cellules épithéliales des canaux biliaires. Dans le pancréas, elle se trouve à la surface apicale des cellules épithéliales des canalicules mais n'est pas détectée au niveau des canaux pancréatiques. Dans les reins, la P-gp se concentre à la surface des cellules épithéliales des tubules proximaux. Le côlon et le jéjunum présentent de forts taux de P-gp à la surface apicale des cellules épithéliales superficielles. Dans les glandes surrénales, la P-gp est détectée de façon diffuse à la surface des cellules du cortex et de la médulla [130]. La P-gp est également présente dans les cellules endothéliales au niveau de la barrière hémato-encéphalique et des autres barrières faisant l'interface entre le sang et un tissu, au niveau des testicules ou du placenta par exemple [5, 7, 128].

1.3.2.3. Localisation intracellulaire

Bien que la P-gp soit majoritairement exprimée dans la membrane plasmique des cellules, des localisations intracellulaires ont également été décrites dans les cellules tumorales au niveau de l'enveloppe nucléaire et de la membrane d'organites cytoplasmiques [90].

En 1998, il est démontré, dans des cellules ovariennes de hamster chinois CHRC5 ayant acquis le phénomène de résistance multidrogue, que des médicaments sont séquestrés dans des vésicules cytoplasmiques, sur la membrane desquelles se trouve la P-gp [123]. La P-gp semble aussi être exprimée dans le noyau de lignées humaines de cellules d'ostéosarcome MDR [84]. En 1998, une équipe italienne [91] démontrait, dans des cellules en lignée de mélanome humain n'ayant jamais été en contact avec des cytotoxiques et n'exprimant pas la P-gp au niveau de la membrane plasmique, que la P-gp était présente au niveau intracytoplasmique dans l'appareil de Golgi. Les mêmes observations ont été décrites avec des cultures primaires obtenues à partir de métastases de mélanomes humains. En 2001, la même équipe prouvait cette même localisation de la P-gp dans des cellules tumorales MDR de sein [3]. Selon les auteurs, ces localisations intracellulaires prouveraient le rôle fonctionnel de la P-gp dans le transport et la séquestration de médicaments, et constitueraient une protection complémentaire des cellules tumorales contre les agents cytotoxiques.

Néanmoins, les localisations intracellulaires de la P-gp n'ont été démontrées que dans des cellules tumorales et jamais dans des cellules saines. De plus, dans notre étude, nous nous intéresserons principalement aux hépatocytes. Or, seule une localisation au niveau du pôle biliaire de ces cellules a été prouvée.

1.3.3. Structure

La P-gp est une protéine membranaire de 170 kDa, composée d'une chaîne polypeptidique monomérique de 140 kDa et d'un groupement N-glycosylé localisé du côté extracellulaire. Elle contient 1280 acides aminés qui s'organisent en deux séquences symétriques. L'existence de douze régions hydrophobes transmembranaires lui donne une configuration caractéristique de protéine assurant un transport transmembranaire. La partie intracytoplasmique contient deux sites de liaison à l'ATP. La P-gp est ainsi classée dans la famille des protéines ABC (ATP-Binding Cassette) et est également appelée ABCB1 (sous-famille B des transporteurs ABC) (Figure 15).

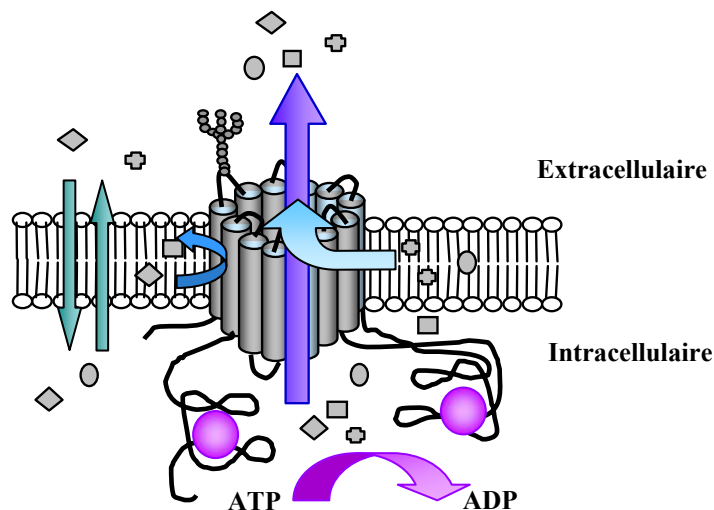


Figure 15 : Structure de la P-gp – Diffusion passive des molécules à travers la membrane (→) et leur transport actif par la P-gp, soit à partir du cytosol (→), soit après partition membranaire (→) (D'après Dr Stéphane Orlowski – CEA Saclay)

1.3.4. Fonctions

1.3.4.1. Fonction de transport

La P-gp confère une résistance multiple à la cellule en assurant le transport actif des composés amphiphiles hors de celle-ci, ce transport s'accompagnant d'une hydrolyse d'ATP [47]. Les composés amphiphiles ont la propriété de diffuser passivement à travers la membrane en fonction du gradient de concentration puis sont pris en charge par la P-gp, selon un processus actif, soit à partir du cytosol, soit après partition membranaire. La P-gp joue alors son rôle de pompe d'efflux en agissant contre le gradient de concentration et empêche l'accumulation de ces molécules dans la cellule [35].

Une des particularités de la P-gp est sa remarquable multi-spécificité de reconnaissance d'un grand nombre de molécules ne présentant entre elles aucune analogie structurale. Toutefois, les substrats de la P-gp ont comme propriétés communes d'être amphiphiles, neutres ou cationiques. Leur poids moléculaires peut varier de 250 à 1250 Daltons [119]. Parmi les substrats de la P-gp, on peut noter des poisons du fuseau mitotique (vinblastine, colchicine, taxol), des intercalants de l'ADN (doxorubicine, actinomycine D), des inhibiteurs de la topoisomérase II (étoposide), des inhibiteurs des canaux calciques (vérapamil) ou encore des immunosuppresseurs (ciclosporine A) [124]. Des exemples de substrats de la P-gp sont indiqués dans le tableau X.

La fonction principale de la P-gp semble donc être la protection de l'organisme entier contre certains xénobiotiques toxiques, et elle protège en particulier les organes sensibles, comme le cerveau, de l'exposition à des composés toxiques ayant pénétré dans le sang [118]. Cependant, un effet secondaire de ce rôle d'efflux est d'empêcher l'action cytotoxique des chimiothérapies anticancéreuses, rendant ainsi cette thérapie inefficace. En effet, par sa localisation, la P-gp située au niveau de la membrane plasmique :

- limite l'absorption intestinale des médicaments en favorisant leur passage dans la lumière intestinale,
- favorise leur élimination en les transportant dans la lumière des canaux biliaires,
- s'oppose à leur pénétration dans le système nerveux central, diminuant leur distribution [130]

De plus, la P-gp intracytoplasmique présente un rôle fonctionnel dans le transport et la séquestration des médicaments. Cet ensemble représente un mécanisme complémentaire de protection des cellules tumorales vis-à-vis des agents cytotoxiques [3].

SUBSTRATS		
Anthracènes Bisantrène Mitoxantrone	Fluorophores Calcéine acétoxyméthyl (AM) Fluo-3-AM Fura-2-AM	Inhibiteurs de la dépolymérisation de la tubuline Colchicine Paclitaxel Docétaxel
Anthracyclines Daunorubicine Doxorubicine Epirubicine	Rhodamine 123 Hoechst 33342/33258	Vinca-alkaloïdes Vinblastine Vincristine Vinorelbine Vindésine
Antirétroviraux Ritonavir Saquinavir Indinavir	Hormones Dexaméthasone Estradiol Hydrocortisone	Autres Actinomycine D Digitoxine Erythromycine Féxofénadine Quinidine Terfénadine
Dérivés de la camptothécine CPT-11 Topotécan	Immunosuppresseurs Ciclosporine A Tacrolimus Sirolimus	
Epidophyllotoxines Etoposide Téniposide	Inhibiteurs des canaux calciques Diltiazem Nicardipine Vérapamil	
INHIBITEURS		
Anti-arythmiques Amiodarone Lidocaïne Quinidine	Hormones Hydrocortisone Progestérone Testostérone	Inhibiteurs des canaux calciques Diltiazem Félodipine Nicardipine Nitrendipine Nifédipine Vérapamil
Antibiotiques Clarithromycine Erythromycine	Immunosuppresseurs Ciclosporine Tacrolimus	Autres Mifépristone Tamoxifène Terfénadine
Antifongiques Itraconazole Kétoconazole		
INDUCTEURS		
3-méthylcholanthrène Cycloheximide Daunomycine Dexaméthasone	Doxorubicine Efavirenz Millepertuis Mitoxantrone	Résérpine Rifampicine

Tableau X : Exemples de substrats, inhibiteurs et inducteurs de la P-glycoprotéine
(D'après Litman, 2001 [76] et Wacher, 1995 [131])

La P-gp transporte également des molécules amphiphiles non toxiques par elles-mêmes mais capables de modifier le niveau de résistance des cellules MDR en inhibant le transport des substances cytotoxiques par la P-gp. Ces molécules sont appelées des agents réversants ou chimio-sensibilisants [38]. Le plus connu de ces agents est le vérapamil. Celui-ci se lie spécifiquement à la P-gp et est transporté par celle-ci [141]. Il est ainsi considéré comme un substrat modèle de transport de la P-gp.

L'analyse des interactions mutuelles entre des couples de substrats de la P-gp, combinant des données enzymologiques et des approches de modélisation tridimensionnelle, a permis au laboratoire du CEA d'établir une représentation schématique des molécules liées

au niveau de deux sites spécifiques. La figure 16 fait apparaître l'organisation spatiale des groupements caractéristiques de chacun des sites et la zone de contact entre les deux pharmacophores [43].

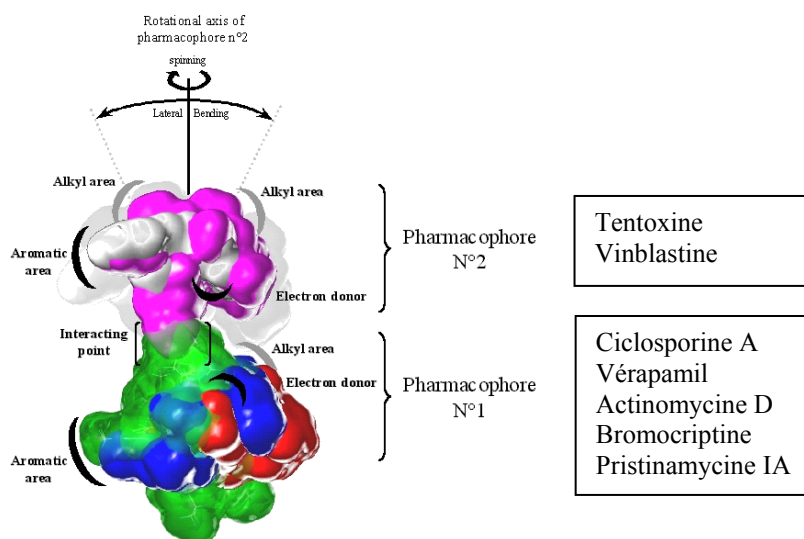


Figure 16 : Modèle pharmacophorique de reconnaissance multispécifique de la P-gp
(D'après Garrigues, 2002 [43])

1.3.4.2. Fonction d'hydrolyse d'ATP

La seconde caractéristique fonctionnelle de la P-gp est d'être une ATPase, capable de fixer et d'hydrolyser l'ATP [18].

Une des particularités de la P-gp est sa capacité à hydrolyser l'ATP en l'absence de tout substrat identifié. Cette activité ATPasique de la P-gp, mesurée en absence de toute molécule ajoutée, est définie comme l'activité ATPasique « basale » de l'enzyme. Cette activité basale semble être étroitement dépendante de la présence de cholestérol dans la membrane, et la P-gp pourrait ainsi participer activement à la translocation du cholestérol dans la membrane, du feuillet cytosolique vers le feuillet exoplasmique (Figure 17). Le cholestérol serait donc un substrat physiologique endogène de la P-gp [42].

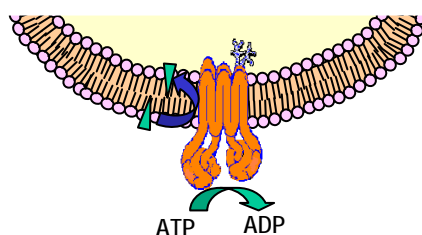


Figure 17 : Translocation active du cholestérol par la P-gp à partir du feuillet cytosolique vers le feuillet exoplasmique - Représentation d'une vésicule inside-out (D'après Dr Stéphane Orlowski – CEA Saclay)

Des études réalisées sur des vésicules membranaires natives issues de cellules MDR hautement résistantes [27, 57] ou sur des protéoliposomes reconstitués avec la protéine purifiée [125] montrent que l'hydrolyse d'ATP est indispensable au transport des molécules hors de la cellule, la simple fixation d'ATP n'étant pas suffisante. L'hydrolyse d'ATP fournit l'énergie nécessaire à l'expulsion hors de la cellule résistante des substrats de la P-gp. De plus, l'activité ATPasique de la P-gp est augmentée dans les cellules MDR lorsqu'elles sont en présence de substrats de transport de la P-gp [28].

1.3.5. Modulation de l'activité ATPasique de la P-glycoprotéine

Des interactions spécifiques entre un substrat donné et la P-gp sont connues pour induire des modifications de l'activité ATPasique de la P-gp. Une administration concomitante de médicaments substrats de la P-gp et de médicaments inhibiteurs ou inducteurs de la P-gp peut conduire à des interactions médicamenteuses, dont les conséquences pharmacocinétiques sont similaires à celles observées lorsque les P450s sont inhibés ou induits. La variabilité de fonction de la P-gp peut être due à un phénomène non génétique ou peut avoir une origine génétique.

1.3.5.1. Origine non génétique

1.3.5.1.1. Inhibition

Plusieurs définitions peuvent être proposées pour un inhibiteur de la P-gp. En effet, un inhibiteur peut être défini comme une substance inhibant l'efflux d'autres composés ou bien comme une substance diminuant l'activité ATPasique de la P-gp. Nous avons vu que l'hydrolyse de l'ATP est indispensable à la fonction de transport de la P-gp. Cependant, les inhibiteurs de l'activité ATPasique ne sont pas toujours des inhibiteurs de la fonction de transport. Ainsi, le vérapamil inhibe la fonction de transport de la P-gp alors qu'il a tendance à augmenter l'activité basale de celle-ci [43]. Des exemples d'inhibiteurs de la fonction de transport de la P-gp sont présentés dans le tableau X.

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de l'inhibition de la P-gp. En effet, la P-gp possède plusieurs sites de liaison des substrats. L'inhibition du transport des molécules par la P-gp peut donc résulter d'une compétition entre les substrats au niveau des sites de liaison, mais également du blocage du processus d'hydrolyse d'ATP, deux domaines d'hydrolyse d'ATP étant impliqués dans la fonction de transport [75]. Les interactions entre substrats de la P-gp peuvent être classées en plusieurs catégories. Des études d'interactions entre le vérapamil, agent réversant bien connu, et d'autres modulateurs de la P-gp ont été effectuées, permettant de distinguer quatre types d'interactions : des inhibitions non compétitives, avec le vanadate ; des inhibitions compétitives, avec la ciclosporine A ; des inhibitions allostériques, avec la daunorubicine, l'épirubicine, la vinblastine, l'amiodarone, la colchicine ; et des stimulations coopératives avec la progestérone, le diltiazem, le propranolol [77]. Une inhibition compétitive suggère que les deux substrats agissent au niveau du même site de liaison de la P-gp, un seul substrat pouvant s'y lier à la fois. Une inhibition non compétitive signifie que les deux substrats peuvent se lier simultanément à la P-gp au niveau de sites distincts. Des effets allostériques peuvent également être impliqués dans les interactions entre un substrat et un inhibiteur.

L'inhibition de la P-gp a pour conséquences de faciliter l'absorption et la distribution des médicaments et de réduire leur élimination. Leurs concentrations plasmatiques sont ainsi augmentées, pouvant conduire à des interactions médicamenteuses de nature pharmacocinétique. Cependant, l'inhibition de la P-gp pourrait également être une solution pour améliorer la biodisponibilité *per os* de médicaments, pour diminuer l'excrétion des produits, ce qui permettrait ainsi de réduire les doses thérapeutiques, mais aussi pour ralentir le rejet de médicaments à partir de sites privilégiés de l'organisme, comme le cerveau. De même, la disponibilité des cytotoxiques dans les cellules tumorales pourrait être améliorée en inhibant la P-gp [1]. Le meilleur modulateur serait celui qui pourrait cibler les cellules tumorales où est surexprimée la P-gp sans pénétrer dans les tissus sains et qui permettrait d'obtenir des taux sériques suffisant pour inhiber complètement la P-gp. L'idéal serait que la P-gp surexprimée sur les cellules tumorales possède des propriétés catalytiques différentes de la P-gp normalement exprimée. Le modulateur devrait également être dénué de toxicité. La toxicité de ces différents agents modulateurs est effectivement le facteur limitant pour leur utilisation en clinique. Les premiers modulateurs utilisés, le vérapamil et la ciclosporine, provoquent *in vivo*, aux taux plasmatiques requis pour obtenir une activité maximale *in vitro*, un bon nombre d'effets secondaires.

1.3.5.1.2. Induction

Comme de nombreuses enzymes de la famille des cytochromes P450s, l'expression de la P-gp est inductible. Ce phénomène permet de renforcer le rôle de protection de ces deux protéines de détoxification contre l'accumulation des xénobiotiques dans l'organisme.

La régulation de l'expression de la P-gp en réponse à des inducteurs a été très étudiée *in vitro* en utilisant des lignées cellulaires d'origine animale ou humaine [75]. Ainsi, diverses études ont démontré que, par exemple, le 3-méthylcholanthrène, la doxorubicine, la daunomycine, la mitoxantrone, la dexaméthasone, le cycloheximide sont des inducteurs de la P-gp (Tableau X). Ces molécules augmentent le taux d'ARNm de la P-gp et augmentent l'expression de celle-ci. Selon ces différentes études, le processus d'induction de la P-gp est espèce-, dose- et tissu-dépendant.

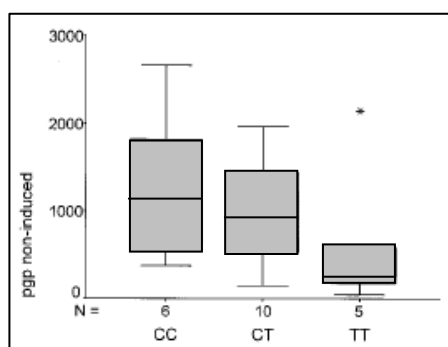
Les mécanismes conduisant à l'induction de la P-gp sous l'effet d'une molécule sont à ce jour peu connus et pourraient être multiples, dépendant de l'inducteur mis en jeu. Le mécanisme le plus probable responsable de l'induction de la P-gp serait l'activation du récepteur nucléaire PXR (Pregnane X Receptor), également nommé SXR (Steroid and Xenobiotics Receptor) [129]. Synold *et al.* ont en effet démontré que le PXR est activé par le paclitaxel et la rifampicine, cette activation conduisant à une augmentation de l'ARNm et de l'expression de la P-gp dans des hépatocytes humains en culture primaire et des cellules en lignée de cancer du colon exprimant PXR (LS180).

1.3.5.2. Origine génétique

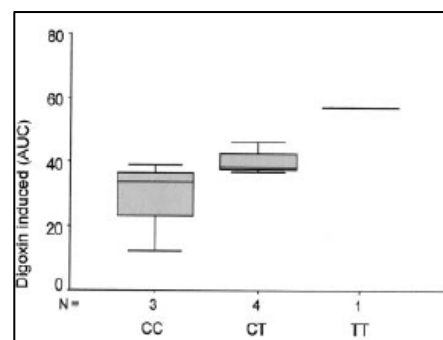
La P-gp est soumise à un polymorphisme génétique, source de variabilité interindividuelle d'expression et de fonction. A l'heure actuelle, une cinquantaine de SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) ont été identifiés sur le gène MDR1 codant pour la P-gp.

Le polymorphisme de la P-gp a été exploré à partir de 2000 par Hoffmeyer *et al.* [56] qui ont effectué un criblage systématique du gène MDR1 chez 188 individus Caucasiens. Les 28 exons et la région promotrice du gène MDR1 ont été amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction). Quinze SNP différents ont ainsi été identifiés. Parmi ceux-ci, Hoffmeyer *et*

al. ont démontré une corrélation entre le polymorphisme localisé au niveau de l'exon 26 (C3435T) d'une part et le taux d'expression intestinale et la fonction de MDR1 d'autre part. En effet, il apparaît que chez les homozygotes TT, l'expression duodénale de MDR1 est plus faible, l'activité de la P-gp est moindre et les taux plasmatiques de digoxine, administrée *per os* à la dose de 0,25 mg, sont plus élevés, en comparaison aux observations effectuées chez les homozygotes « sauvages » CC. Les hétérozygotes CT présentent un phénotype intermédiaire. (Figure 18).



A : Expression intestinale de la P-gp en fonction du génotype MDR. La corrélation génotype-phénotype a une signicativité de $p=0.056$



B : Distribution plasmatique de la digoxine (aire sous la courbe) en fonction du génotype MDR.

Figure 18 : Corrélation entre le SNP C3435T au niveau de l'exon 26 et l'expression de MDR1 d'une part (A) et la fonction de la P-gp d'autre part (B) (D'après Hoffmeyer, 2000 [56])

Ce polymorphisme C3435T pourrait affecter l'absorption et les concentrations tissulaires de nombreux substrats de la P-gp. Cependant, quelques études ont démontré l'absence d'influence de ce polymorphisme sur la pharmacocinétique de substrats de la P-gp et sur l'expression de la P-gp.

D'autre part, cette mutation C3435T du gène MDR1 humain présente une variabilité interethnique [117]. Ainsi, la fréquence des individus homozygotes pour l'allèle C est plus élevée dans les populations africaines et afro-américaines (83% et 61% respectivement) que dans les populations caucasiennes (26%) et asiatiques (34%) (Figure 19).

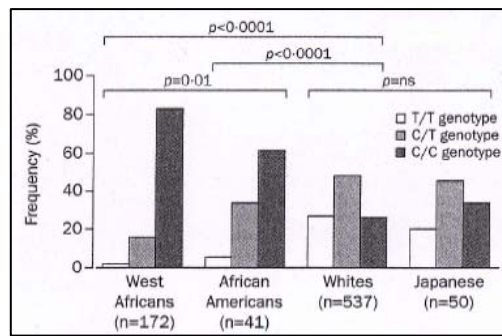


Figure 19 : Fréquence des génotypes pour le polymorphisme C3435T situé au niveau de l'exon 26 chez les Africains (Ghanéens), les Afro-américains, les Caucasiens et les Japonais (ns : non significatif) (D'après Schaeffeler, 2001 [117])

1.4. Couplage fonctionnel entre le cytochrome P450 3A et la P-glycoprotéine

Wacher *et al.* [131] ont suggéré qu'il pourrait exister une interaction fonctionnelle entre le CYP3A et la P-gp et que ces deux protéines de détoxification seraient co-régulées. Ces deux hypothèses sont basées sur leur localisation au niveau des entérocytes et des hépatocytes, sur leurs substrats, inducteurs et inhibiteurs communs ainsi que sur la localisation proche de leurs gènes.

Les éléments qui vont être détaillés dans ce paragraphe sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau XI).

	CYP3A	P-gp
Substrats / Inhibiteurs	en grande majorité communs	
Régulation	récepteur nucléaire PXR (=SXR)	
Localisation des gènes	chromosome 7q22.1	chromosome 7q21.1
Localisation intestinale	membrane du réticulum endoplasmique lisse des cellules épithéliales des villosités bordant la lumière intestinale	membrane du pôle apical des cellules épithéliales des villosités bordant la lumière intestinale
Localisation hépatique	membrane du réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes	membrane du pôle biliaire des hépatocytes (canalicules biliaires) et membrane du pôle apical des cellules épithéliales des canaux biliaires

Tableau XI : *Eléments en faveur d'un couplage fonctionnel entre le CYP3A et la P-gp*

1.4.1. Substrats communs au CYP3A et à la P-gp

Il a été démontré que plusieurs molécules sont à la fois substrats et/ou inhibiteurs du CYP3A et de la P-gp [131]. Ces composés couvrent un grand éventail de classes thérapeutiques différentes, depuis les agents anti-arythmiques comme l'amiodarone jusqu'aux agents anticancéreux comme la vinblastine ou le paclitaxel. Des exemples de substrats et/ou inhibiteurs à la fois du CYP3A et de la P-gp sont présentés dans le tableau XII.

	CYP3A ⁽¹⁾	P-gp ⁽¹⁾		CYP3A ⁽¹⁾	P-gp ⁽¹⁾
Agents anticancéreux			Immunosuppresseurs		
Etoposide	S	S	Ciclosporine	S, I	S, I
Doxorubicine	S	S	Tacrolimus	S	S, I
Paclitaxel	S	S	Sirolimus	S	S
Vinblastine	S	S	Inhibiteurs des canaux calciques		
Vincristine	S	S	Diltiazem	S, I	S, I
Vindesine	S	S	Felodipine	S	I
Anti-arythmiques			Nicardipine	S, I	S, I
Amiodarone	S, I	I	Nitrendipine	S	I
Lidocaïne	S	I	Nifédipine	S, I	I
Quinidine	S, I	I	Vérapamil	S, I	S, I
Antifongiques			Autres		
Itraconazole	I	I	Digitoxine	S	S
Ketoconazole	I	I	Erythromycine	S, I	S, I
Hormones			Mifépristone	I	I
Dexaméthasone	S	S	Tamoxifène	S, I	I
Estradiol ⁽²⁾	S	S	Terfénadine ⁽³⁾	S	S, I
Hydrocortisone	S	S, I			
Progestérone	S	I			
Testostérone	S	I			

Tableau XII : Exemples de médicaments substrats et/ou inhibiteurs communs au CYP3A et à la P-gp
(D'après Wachter, 1995 [131])

(1) S = Substrat, I = Inhibiteur / (2) le 17- β estradiol glucuronide, métabolite de l'estradiol par action des enzymes de phase II, est substrat de la P-gp / (3) la terfénadine a été retiré du marché français en 1997 suite à son implication dans l'apparition de torsades de pointe.

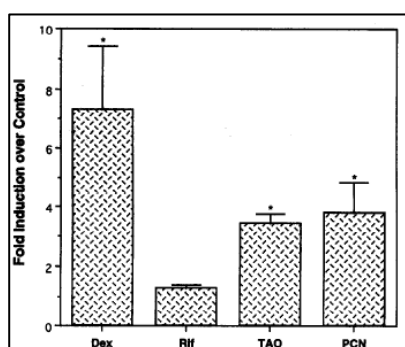
1.4.2. Co-régulation du CYP3A et de la P-gp

Le CYP3A et la P-gp sont co-régulés par le récepteur nucléaire humain PXR (Pregnane X Receptor), également nommé SXR (Steroid and Xenobiotics Receptor), exprimé au niveau intestinal et hépatique [129]. Ainsi, Synold *et al.* [129] ont démontré que le paclitaxel réduit sa propre biodisponibilité en activant le récepteur PXR et induit son propre métabolisme et son élimination par voie biliaire. De plus, les métabolites hydroxylés du paclitaxel, ainsi que le docetaxel, molécule structuellement proche du paclitaxel, n'interagissent pas avec le PXR, suggérant que les interactions avec le paclitaxel ne sont pas nécessairement associées à une classe thérapeutique.

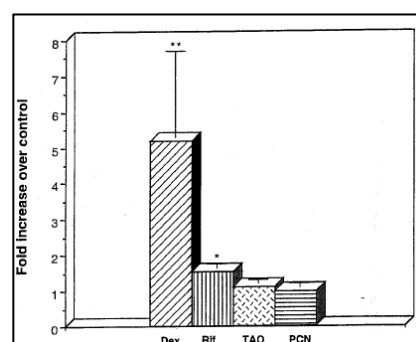
De plus [131], le gène MDR1 de la résistance multi-drogue humaine est localisé sur la première sous-bande de la première bande de la deuxième région du bras long du chromosome 7 (7q21.1). Le gène du CYP3A4 est situé sur le même bras du même

chromosome au niveau de la même région mais au niveau de la deuxième bande (première sous-bande) (7q22.1). Cette proche localisation des gènes respectifs du CYP3A4 et de la P-gp pourrait être à l'origine d'une co-régulation de ces deux protéines.

De même, l'induction du CYP3A et de la P-gp par un substrat identique pourrait faire penser à une co-régulation de ces deux protéines de détoxication. En effet, Salphati et Benet [116] ont démontré que la dexaméthasone, administrée chez le rat mâle par voie intrapéritonéale à la dose de 100 mg/kg/jour pendant 3 à 4 jours, est capable d'induire une augmentation du taux hépatique du CYP3A par un facteur de 7 et une augmentation de l'expression de la P-gp hépatique par un facteur de 5 (Figure 20). Cependant, lors de cette étude, la TAO (triacétyloléandomycine) et le PCN (pregnénolone 16 α -carbonitrile) ont entraînés une induction du CYP3A (taux d'expression multiplié par 3 et par 4 respectivement au niveau hépatique) mais n'ont pas eu d'effets sur l'expression de la P-gp. Les deux auteurs ont ainsi conclu, d'après leurs résultats et dans leurs conditions expérimentales, à une absence de co-régulation entre le CYP3A et la P-gp.



A : Induction du CYP3A dans le foie de rats



B : Induction de la P-gp dans le foie de rats

Figure 20 : Induction du CYP3A (A) ou de la P-gp (B) dans le foie de rats mâles (n=4) après administration de dexaméthasone 100 mg/kg/jour (Dex), rifampicine 100 mg/kg/jour (Rif), triacétyloléandomycine 500 mg/kg/jour (TAO) et pregnénolone 16 α -carbonitrile 50 mg/kg/jour (PCN). Le taux d'induction est calculé en fonction de l'expression des protéines de détoxication chez les rats contrôles. (A) * $p < 0.05$ / (B) * $p = 0.024$ et ** $p = 0.005$. (D'après Salphati, 1998 [116])

1.4.3. Interaction fonctionnelle entre le CYP3A et la P-gp au niveau intestinal

Au niveau intestinal, le CYP3A est localisé au niveau de l'intestin grêle dans les cellules épithéliales des villosités bordant la lumière intestinale [68], et la P-gp se trouve au pôle apical de ces mêmes cellules [130]. Ces deux enzymes pourraient agir de façon synergique pour limiter la biodisponibilité orale des médicaments grâce à leur proche

localisation au niveau du site d'absorption. Le CYP3A et la P-gp pourraient interagir selon trois voies au niveau intestinal [14] :

1/ La P-gp entraîne l'efflux des produits hors de l'entérocyte de façon répétée, puis ceux-ci sont réabsorbés. L'exposition répétée des produits au CYP3A augmente la probabilité qu'ils soient métabolisés.

2/ La P-gp permet de maintenir une concentration intracellulaire de produits compatible avec une métabolisation par le CYP3A, permettant ainsi d'éviter une saturation enzymatique par accumulation de substrat.

3/ La P-gp est capable de transporter les métabolites formés par action du CYP3A hors de la cellule intestinale, dans la lumière intestinale. En effet, en général, la métabolisation par le CYP3A produit des métabolites s'avérant être de bons substrats de la P-gp [54, 55, 89].

Une des conséquences de cette interaction est la faible biodisponibilité par voie orale des médicaments substrats des deux protéines [66]. En effet, plusieurs articles publiés sont en faveur d'une action synergique entre le CYP3A4 et la P-gp, ayant pour conséquence une diminution de la biodisponibilité orale de certains médicaments. Une expérience réalisée sur des cellules Caco-2 exprimant le CYP3A4 et la P-gp montre que, lorsque la P-gp seule est inhibée, le métabolisme par le CYP3A4 d'un substrat commun au CYP3A4 et à la P-gp est diminué, alors que le métabolisme d'un substrat spécifique du CYP3A4 reste inchangé. La P-gp pourrait donc interagir avec le CYP3A4 en facilitant l'accession d'un médicament à l'enzyme de métabolisation intracellulaire, ce qui aurait pour conséquence une augmentation de la métabolisation du composé [19]. Cette même équipe a confirmé ces résultats *in vivo*, grâce à un modèle de perfusion intestinale chez le rat [20]. La P-gp modulerait donc le métabolisme intestinal en augmentant l'accès des médicaments au CYP3A4 intracellulaire grâce à des cycles répétés d'absorption et d'efflux de ces substrats.

1.4.4. Interaction fonctionnelle entre le CYP3A et la P-gp au niveau hépatique

Au niveau hépatique, le CYP3A est localisé dans les membranes du réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes (59). La P-gp est retrouvée au niveau des canalicules biliaires bordant les hépatocytes et au pôle apical des cellules épithéliales des canaux biliaires (103). Ainsi, ces deux protéines de détoxification pourraient coopérer de façon fonctionnelle dans le foie.

Dans le foie, la P-gp entraîne l'efflux des molécules hors de l'hépatocyte vers les canalicules biliaires. Celles-ci sont donc moins exposées au CYP3A et donc moins métabolisées.

En effet, grâce à un modèle de foie de rat isolé perfusé, il a pu être démontré une augmentation significative du métabolisme hépatique de la digoxine par le CYP3A chez les animaux traités par la quinidine, puissant inhibiteur de la P-gp. La quinidine pourrait bloquer la sécrétion biliaire de digoxine par la P-gp et ainsi prolonger l'exposition de la digoxine au CYP3A hépatique [69]. De même, grâce au même modèle, l'aire sous la courbe du tacrolimus, substrat du CYP3A et de la P-gp, est significativement diminuée en présence d'un inhibiteur de la P-gp, alors que l'aire sous la courbe de la félodipine, substrat du CYP3A exclusivement, reste inchangée [138].

1.4.5. Différences entre les interactions fonctionnelles au niveau intestinal et hépatique

Dans le foie, la P-gp entraîne des effets opposés à ceux observés au niveau de l'intestin. Dans l'intestin, l'inhibition de la P-gp diminue le métabolisme, alors que dans le foie, l'inhibition de la P-gp augmente le métabolisme [19, 138].

Dans l'intestin (Figure 21), le substrat entre dans la cellule par diffusion passive puis est soit métabolisé par le CYP3A, soit éjecté hors de la cellule par la P-gp (mais pourra par la suite être recapturé dans la cellule) ou bien encore il traverse directement la membrane baso-latérale vers les capillaires sanguins ou la membrane apicale de la cellule par diffusion passive ou active sans avoir subi de métabolisation. Le métabolite formé sort de la cellule vers les capillaires sanguins ou dans la lumière intestinale par diffusion passive ou active, ou bien est pris en charge par la P-gp au niveau apical et est ainsi exporté hors de la cellule. Dans les entérocytes, le médicament rencontre la P-gp avant le CYP3A. Une inhibition de la P-gp conduit à une diminution du temps de séjour du médicament au niveau de la paroi intestinale, par inhibition du phénomène d'élimination et recapture, et une augmentation de son exposition à une faible quantité de CYP3A. Ainsi, le métabolisme est diminué par saturation enzymatique. En effet, le taux de CYP3A intestinal ne représente qu'environ 5% du taux hépatique. Le passage rapide dans le sang par diffusion passive est augmenté.

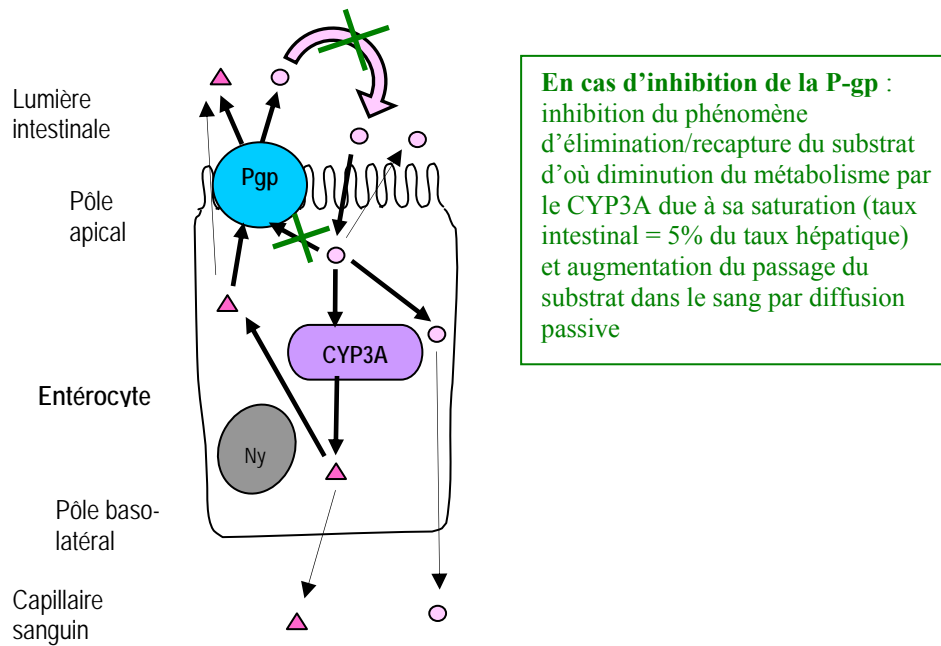


Figure 21 : Représentation schématique du cheminement d'un couple substrat (○) / métabolite (△) dans un entérocyte

Dans le foie (Figure 22), le composé absorbé entre dans les hépatocytes à partir du sang contenu dans les sinusoides hépatiques par diffusion passive ou active (transporteurs), puis est soit métabolisé par le CYP3A, soit excrété dans les canalicules biliaires grâce à la P-gp, ou bien encore il traverse directement les membranes biliaires (vers les cellules voisines), vasculaires (vers les sinusoides) ou les membranes des canalicules biliaires (vers les canalicules) par diffusion passive ou active sans avoir subi de métabolisation. Le métabolite formé traverse ces trois mêmes membranes de la même façon par diffusion passive ou active ou est pris en charge par la P-gp et est ainsi excrété dans les canalicules biliaires, conduisant à son élimination ou au cycle entéro-hépatique. Puisque la P-gp est localisée au niveau des canalicules biliaires, les molécules rencontrent le CYP3A, localisé au niveau du réticulum endoplasmique présent en grande quantité dans les cellules hépatiques, avant la P-gp. Une inhibition de la P-gp dans le foie entraîne donc une augmentation de la clairance métabolique hépatique des médicaments par augmentation de l'exposition au CYP3A.

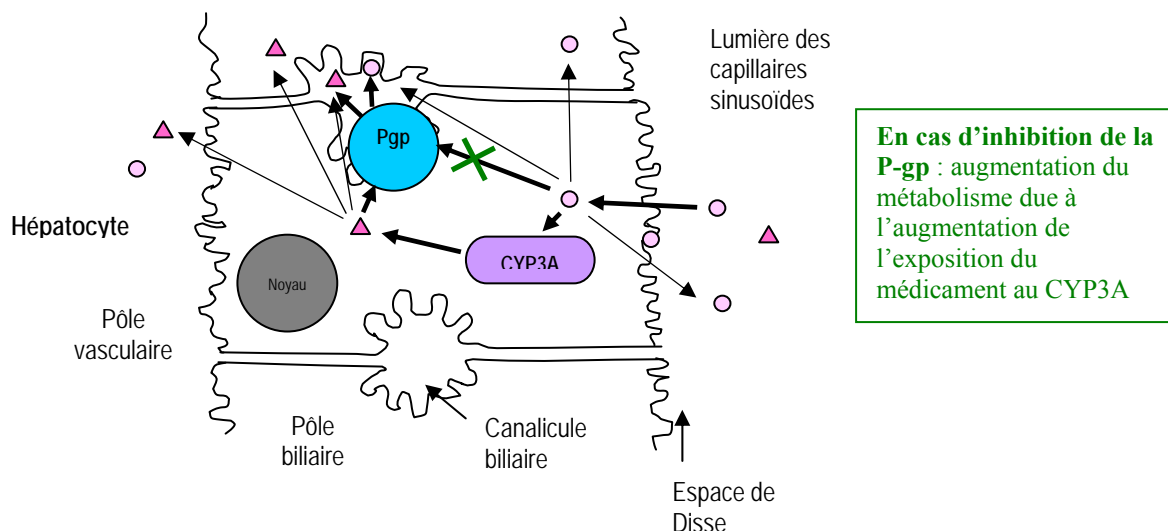




Figure 22 : Représentation schématique du cheminement d'un couple substrat  / métabolite  dans un hépatocyte.

En résumé, deux différences majeures entre les cellules de la muqueuse intestinale et les hépatocytes peuvent expliquer ces différences d'interaction entre les deux protéines de détoxification au niveau intestinal et hépatique.

En premier lieu [14], le CYP3A est retrouvé en quantité beaucoup plus importante dans l'hépatocyte que dans l'entérocyte. Ainsi, une augmentation de la concentration de substrat dans l'hépatocyte conduira à un métabolisme plus important par le CYP3A ; à l'inverse, une augmentation de la concentration de substrat dans l'entérocyte est susceptible d'entraîner une saturation rapide du CYP3A, due à la faible capacité de métabolisation dans la cellule intestinale.

L'autre différence est l'ordre dans lequel les substrats entrent en contact avec les protéines de détoxification [139]. En effet, dans l'intestin, le substrat entre dans l'entérocyte à travers la membrane apicale où se trouve la P-gp et est donc susceptible d'entrer d'abord en contact avec la P-gp. C'est donc la P-gp qui régule l'accès au CYP3A. A l'inverse, au niveau hépatique, le substrat traverse la membrane basolatérale de l'hépatocyte et est susceptible d'entrer en contact avec le CYP3A avant d'atteindre la P-gp localisée au niveau de la membrane apicale (pôle biliaire).

Ces deux points peuvent conduire à des différences dans les interactions médicamenteuses avec les substrats du CYP3A et de la P-gp au niveau de l'intestin grêle et du

foie. Un résumé de la coopération fonctionnelle entre le CYP3A et la P-gp, au niveau intestinal et hépatique, est proposé dans le tableau XIII.

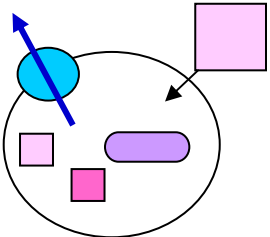
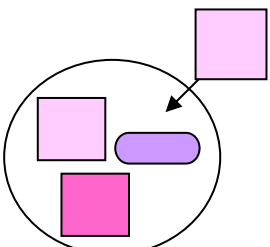




Cellule isolée	Cellule dans son environnement tissulaire	
	Entérocyte (P450 limitant)	Hépatocyte (P450 non limitant)
Avec P-gp		
	<ul style="list-style-type: none"> - Elimination du médicament et du métabolite vers la lumière intestinale - Phénomène de recapture permettant une métabolisation par le CYP3A 	<ul style="list-style-type: none"> - Ejection du médicament et du métabolite dans les canalicules biliaires - Le médicament et le métabolite se retrouvent dans la bile et sont éliminés de l'organisme ou bien subissent un cycle entéro-hépatique
Sans P-gp		
	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de phénomène d'élimination et de recapture - Diminution du métabolisme par saturation enzymatique - Passage accéléré dans le sang - Augmentation de la biodisponibilité 	<ul style="list-style-type: none"> - Accumulation du médicament et du métabolite dans la cellule - Augmentation du métabolisme - Diminution de la biodisponibilité

Tableau XIII : Résumé de la coopération fonctionnelle entre le CYP3A et la P-gp dans les entérocytes et les hépatocytes

Légende :

-  Substrat X (la taille de l'image est proportionnelle à la concentration)
-  Métabolite X-OH (la taille de l'image est proportionnelle à la concentration)
-  CYP3A
-  P-gp

2. MATERIELS ET METHODES

Les matériels utilisés et les protocoles mis en œuvre dans le cadre de la thèse sont détaillés ci-dessous sous forme de fiches.

Détermination de l'activité métabolique du cytochrome P450 3A par fluorimétrie

But : tester des molécules pour démontrer qu'elles sont métabolisées par le CYP3A.

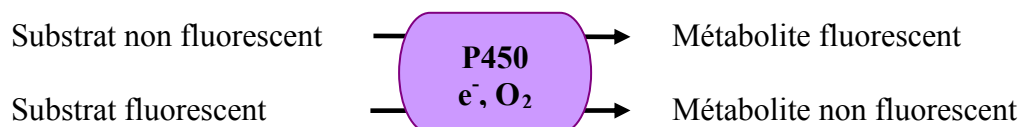
Matériel :

- Microsomes de rat, CEA Saclay
- Microsomes humains, Gentest®
- Tampon phosphate, préparé à base de sels de K^+
- NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, Sigma®
- Substrat à tester
- Plaque 96 puits, Nunc®
- Fluorimètre Tecan GENios® relié au logiciel X-Fluor4®

Principe : observer une modification de fluorescence.

Pour cela, le substrat et le métabolite ne doivent pas avoir la même fluorescence. Une augmentation de l'intensité de fluorescence sera observée lorsque le métabolite sera fluorescent, et inversement, une diminution de cette intensité sera en faveur d'un substrat plus fluorescent que le métabolite.

Deux cas sont donc possibles :



Cette modification de fluorescence qualitative est ensuite exprimée de façon quantitative grâce à la courbe d'étalonnage qui permet de calculer un turn-over exprimant une quantité de métabolite formée, ou une quantité de substrat disparue, par unité de temps et pour une quantité de P450 donnée.

Préparation des microsomes utilisés :

Les microsomes sont des fractions sub-cellulaires contenant le réticulum endoplasmique des cellules et peuvent être isolés à partir de différents organes et espèces. Nous utiliserons des microsomes humains ainsi que des microsomes préparés à partir de foie de rats traités à la dexaméthasone, puisque le foie est l'organe majeur de métabolisation des xénobiotiques. La préparation des microsomes hépatiques nécessite plusieurs ultracentrifugations successives.

Un homogenat tissulaire est centrifugé pendant 20 à 30 minutes à 9000g. Le culot contenant des débris tissulaires, noyaux... est éliminé, alors que le surnageant (fraction S9) est à nouveau centrifugé pendant 60 minutes à 100000g. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans un tampon pyrophosphate puis centrifugé après homogénéisation pendant 60 minutes à 100000g. Le culot obtenu représente les microsomes hépatiques. Les microsomes sont ensuite conservés à -80°C.

Matériels et méthodes :

Les tests sont effectués sur des microsomes de rats traités par la dexaméthasone (composé injecté en intra-péritonéal chez le rat, permettant ainsi d'induire le CYP3A, cytochrome le plus intéressant car il s'agit de celui qui est en plus grande quantité dans le foie humain) et sur des microsomes humains.

Dans le laboratoire, les mesures se font à l'aide du fluorimètre Tecan GENios® connecté au logiciel X-Fluor4®.

La température au sein de l'appareil et au niveau de l'échantillon est de 37°C, ce qui permet de se rapprocher le plus des conditions physiologiques de l'Homme, mais qui est également très importante à contrôler puisque la stabilité de la fluorescence dépend de la température.

Les mesures sont effectuées dans des plaques 96 puits en triplicate, de façon à obtenir des moyennes de fluorescence.

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont choisies en fonction du couple substrat/métabolite utilisé.

Courbe d'étalonnage du métabolite :

Différentes concentrations du métabolite, de l'ordre du μM ou du nM en fonction du métabolite, dilué dans le tampon phosphate, avec ou sans microsomes, et avec ou sans microsomes et NADPH, sont analysées en fluorimétrie. Le NADPH permet d'initier les réactions par le P450.

Lors de nos études réalisées au laboratoire, nous avons utilisé des couples substrat/métabolite dont le substrat n'est pas fluorescent alors que le métabolite l'est. Ainsi, une courbe d'étalonnage représentant la fluorescence du métabolite en fonction de sa concentration peut être tracée.

Incubation du substrat en présence de microsomes avec ou sans NADPH :

Dans un premier temps, différentes concentrations de P450, de l'ordre du μM , diluées dans le tampon phosphate, sont testées en fluorimétrie.

Une concentration fixe de substrat est alors ajoutée dans chaque puits (environ $10\mu\text{M}$).

Le NADPH est ensuite ajouté à une concentration de $0,6\text{ mM}$.

Les mesures se font en mode cinétique sur un maximum de 60 minutes.

Différentes analyses sont ainsi effectuées :

- microsomes seuls (contrôle)
- microsomes + substrat (blanc)
- microsomes + substrat + NADPH

Les courbes représentant la fluorescence en fonction de la concentration de P450 à différents temps, et la fluorescence en fonction du temps à différentes concentrations de P450 peuvent ainsi être tracées. Une zone de linéarité de ces courbes en fonction du temps et en fonction de la concentration est alors déterminée.

Calculs des turn-over :

A partir des équations des droites représentant la fluorescence du substrat en fonction du temps, la $\Delta\text{Fluorescence}$ est mesurée entre deux temps. La concentration en métabolite formé est déterminée à partir de cette valeur en unité de fluorescence et de la pente de la droite d'étalonnage du métabolite dans le tampon phosphate avec P450 et NADPH. La valeur obtenue est exprimée en pmoles de métabolite par minute par pmoles de P450.

Exemple de calcul de turn-over pour une $[P450]=0,10\mu M$, le substrat étant la benzyloxyrésorufine et le métabolite la résorufine :

Equation de la droite représentant la fluorescence en présence de benzyloxyrésorufine, microsomes et NADPH en fonction du temps : $y=6,5549x$

Donc entre 10 et 20 minutes, $\Delta\text{Fluorescence}=65,6$ (unités arbitraires dépendant de l'appareil)

→ 65,6 unités de fluorescence / 10 minutes / 0,10 μM de P450

soit 65,6 unités de fluorescence / 10 minutes / 0,10 pmoles de P450 / 100 μL

Pour passer des unités de fluorescence à la concentration de résorufine formée, on utilise la droite d'étalonnage de la résorufine (représentant la fluorescence en fonction de la [Résorufine] en nM), dont l'équation est $y=2,6706x$

D'où [Résorufine] = $x = 65,6 / 2,6706 = 24,6$ nM

→ 24,6 nM de Résorufine formée / 10 minutes / 0,10 pmoles de P450 / 100 μL

→ 2,46 pmoles de Résorufine formée / 100 μL / 10 minutes / 0,10 pmoles de P450 / 100 μL

→ 2,46 pmoles de Résorufine formée / minutes / pmoles de P450

Optimisations pour le calcul des turn-over :

Les mêmes mesures sont effectuées en choisissant une concentration en P450 fixe se trouvant dans la zone de linéarité (déterminée dans l'étude précédente). La concentration en P450 est donc la même dans tous les puits. La cinétique se fait sur un temps qui correspondait à la zone de linéarité.

Les différentes analyses effectuées se font donc sur :

- microsomes seuls (contrôle)
- microsomes + substrat (blanc)
- microsomes + substrat + NADPH

Le turn-over se calcule avec l'équation de la droite représentant la fluorescence du substrat en fonction du temps (en ayant pris soin de soustraire le blanc sans NADPH) et la pente de la droite d'étalonnage du métabolite.

Contrôles effectués :

- Il faut vérifier qu'il n'y ait pas de quenching de fluorescence, en testant plusieurs concentrations de microsomes sur le substrat et le métabolite.
- La courbe représentant la fluorescence à différentes concentrations de P450 doit être linéaire en fonction du temps.

Détermination de l'activité ATPasique de la P-glycoprotéine par spectrophotométrie

But : mesurer l'activité ATPasique de la P-gp en présence de substrats divers.

Matériel :

- Tampon enzymatique (voir composition ci-dessous)
- MgATP : adénosine 5' triphosphate magnésium, Sigma®
- PK : Pyruvate kinase, Sigma®
- LDH : Lactate déshydrogénase, Sigma®
- PEP : Phosphoénolpyruvate, Sigma®
- NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, Sigma®
- Azoture de sodium, Sigma®
- Ouabaine, Sigma®
- EGTA : acide éthylène glycol-bis (β-aminoéthylether)-N, N, N', N' - tétraacétique, Sigma®
- Vésicules membranaires, préparées au CEA Saclay
- Substrat à tester
- Cuvette optique en quartz
- Agitateur magnétique
- Spectrophotomètre Philips® PU8740

Principe :

De manière générale, l'activité ATPasique d'une protéine ATPase est définie comme étant la quantité d'ADP produite par unité de temps et de masse de protéine selon la réaction suivante :



Une méthode spectrophotométrique associée à un système régénérateur d'ATP utilisant des enzymes couplées est utilisée pour déterminer l'activité ATPasique de la P-gp. Lorsque l'ADP est produit dans le milieu, l'action de la pyruvate kinase (PK) permet la production de pyruvate à partir du phosphoénolpyruvate (PEP) en régénérant de façon stoechiométrique l'ATP consommé. Le pyruvate oxyde ensuite le NADH en NAD^+ grâce à la lactate déshydrogénase (LDH) et est transformé en lactate.

Ces réactions s'effectuent dans des conditions stoechiométriques, la disparition du NADH dans le milieu reflète donc exactement la vitesse d'hydrolyse d'ATP par les ATPases en activité. La cinétique de disparition du NADH dans le milieu est suivie de façon continue par spectrophotométrie à 340 nm (ce qui correspond au pic d'absorption du NADH, le NAD^+ n'absorbant quasiment pas à cette longueur d'onde). La cinétique globale observée correspond à l'activité des ATPases à l'état stationnaire si les vitesses des réactions catalysées par la PK et la LDH ne sont pas limitantes par rapport à la vitesse d'hydrolyse d'ATP catalysée par les ATPases. En particulier, à l'état stationnaire, la concentration en ADP dans le milieu reste faible, très inférieure aux valeurs saturant l'activité enzymatique de la PK. Pour mesurer la variation d'absorbance correspondant principalement à l'activité de la P-gp, on utilise des inhibiteurs spécifiques des ATPases ioniques contaminantes. L'azoture de sodium inhibe les H^+ ATPases d'origine mitochondriale, la ouabaïne inhibe la Na^+/K^+ ATPase et l'EGTA inhibe les Ca^{2+} ATPases en chélatant les ions calcium.

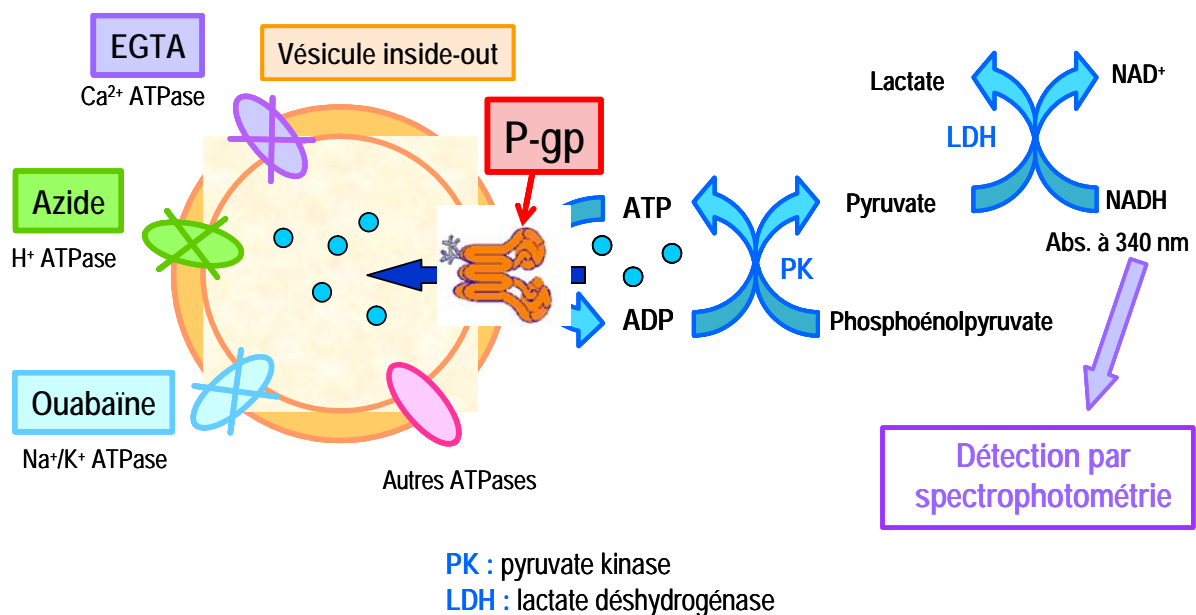


Figure 23 : Principe de la mesure de l'activité d'hydrolyse d'ATP de la P-gp par spectrophotométrie en présence des enzymes couplées PK et LDH

Les avantages de cette méthode sont nombreux :

- La concentration en ATP est stationnaire grâce au système régénérateur d'ATP.
- Les résultats sont suivis en temps réel, ce qui permet une cohérence des résultats pour une gamme de concentration donnée de la molécule étudiée.
- La mesure est rapide et précise (à 5-10 nmol/min/mg de protéines totales près).

Préparation des vésicules membranaires utilisées :

➤ Culture cellulaire :

Les cellules utilisées sont des cellules DC-3F, fibroblastes pulmonaires de hamster chinois transformés spontanément. La lignée résistante DC-3F/ADX, décrite comme surexprimant le gène codant pour la P-gp, est obtenue par des repiquages successifs en présence de concentrations croissantes en actinomycine D jusqu'à une dose de 10 µg/mL.

➤ Préparation des vésicules membranaires :

Une fois les cellules récoltées, les suspensions cellulaires sont collectées par deux centrifugations successives, puis le culot cellulaire est resuspendu dans un milieu contenant du PBS (tampon phosphate isotonique), du DTT 1 mM (dithiothréitol) et du PMSF 1 mM (fluorure de phényl-méthyl sulfonate), afin d'éliminer le milieu de culture. Ensuite, le travail s'effectue dans la glace, pour éviter l'action éventuelle de protéases résiduelles.

Pour obtenir des vésicules membranaires, les cellules resuspendues vont être cassées par ultra-sons, les membranes cellulaires se refermant alors spontanément en vésicules. Le mélange obtenu contient les vésicules membranaires, mais également des protéines solubles et des fragments cellulaires, ces derniers étant éliminés par centrifugation à basse vitesse. Les vésicules membranaires contenues dans le surnageant vont ensuite être isolées grâce à une centrifugation sur un coussin de saccharose à 46% centrifugé. La densité du coussin étant supérieure à celle des vésicules, ces dernières vont se localiser à l'interface entre le saccharose et le tampon, alors que les protéines solubles n'ont pas le temps d'atteindre le coussin. L'anneau enrichi en vésicules est récupéré, refroidi, lavé avec du PBS contenant du DTT 1 mM et du MgCl₂ 2 mM, puis centrifugé pour éliminer les protéines solubles résiduelles et le saccharose.

La préparation de membranes ainsi obtenue est homogénéisée puis conservée à -80°C.

Toutes ces opérations de préparation des vésicules membranaires sont réalisées par Solenne MARTIN, en 3^{ème} année de thèse au laboratoire au moment de mon stage.

Procédure expérimentale :

Les mesures sont réalisées à 37°C sous agitation constante dans une cuvette optique de 1 cm de trajet dont les faces sont en quartz.

Le spectrophotomètre Philips® PU8740 est utilisé au laboratoire, il est équipé d'un agitateur magnétique et d'un support de cuve thermostaté à 37°C par circulation d'eau, permettant de reproduire des températures proches de la situation physiologique.

Le mélange réactionnel contient du tampon enzymatique (30 mM Tris-HCL pH7,8 à 20°C, 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT) supplémenté de 1 mM MgATP, 0,1 mg/mL PK, 0,1 mg/mL LDH, 1 mM PEP et 0,5 mM NADH. La concentration en protéines totales varie entre 15 et 20 µg/mL suivant le lot de vésicules membranaires utilisé.

Dans ces conditions, l'activité ATPasique mesurée est la résultante des activités de toutes les ATPases membranaires présentes dans les vésicules.

Pour mesurer la variation d'absorbance correspondant principalement à l'activité de la P-gp, on utilise des inhibiteurs spécifiques des ATPases ioniques contaminantes. L'azoture de sodium (10 mM) inhibe les H⁺ ATPases d'origine mitochondriale, la ouabaine (0,5 mM) inhibe la Na⁺/K⁺ ATPase et l'EGTA (1 mM) inhibe les Ca²⁺ ATPases en chélatant les ions calcium.

Dans ces conditions et d'après les expériences précédentes réalisées au sein du laboratoire, le signal enzymatique mesuré est attribuable à environ 80% à l'activité ATPasique basale de la P-gp.

L'activité ATPasique de la P-gp ne peut être déterminée que sur des vésicules en configuration « inside-out », où les sites spécifiques de liaison de l'ATP sont dans le milieu réactionnel. Dans cette orientation, la P-gp n'expulse plus ses substrats vers l'extérieur, mais vers l'intérieur de la vésicule. La suspension vésiculaire est constituée d'environ 2/3 de vésicules inside-out.

Recherche de modulateurs de l'activité ATPasique basale de la P-gp :

La P-gp possède deux types d'activités ATPasiques distinctes :

- l'activité « basale », correspondant à l'hydrolyse d'ATP en absence de substrat exogène
- l'activité « stimulée », où l'hydrolyse d'ATP est induite par la présence d'un substrat exogène dans le milieu

Si l'activité ATPasique en présence d'une molécule est modifiée par rapport à l'activité ATPasique basale, cette molécule est substrat de la P-gp.

La courbe représentant l'activité ATPasique de la P-gp en nmol/mg/min en fonction de la concentration de molécule exogène en μM est tracée.

Une constante d'affinité de la molécule pour la P-gp est alors définie. Le K_m (constante de Michaelis) correspond à la concentration en substrat pour laquelle on se trouve à la demi-activité maximale ($V_{\max}/2$), l'amplitude étant mesurée entre la valeur de l'activité basale et le sommet de la courbe.

Le facteur d'activation est le rapport de l'activité maximale sur l'activité basale.

Recherche de modulateurs de l'activité ATPasique de la P-gp stimulée par un substrat de transport :

L'activité ATPasique de la P-gp est stimulée en présence de vérapamil, agent connu pour réverser le phénotype MDR, puis inhibée progressivement aux fortes concentrations de vérapamil. Le même phénomène se produit avec la progestérone. Les courbes représentant l'activité ATPasique en fonction de la concentration en substrat de transport sont donc en forme de « cloche ». L'allure de cette courbe est compatible avec la présence d'un site de transport qui alterne entre un état de haute affinité et un état de basse affinité. Aux fortes concentrations de modulateurs, le site de basse affinité est saturé, le substrat n'est plus relargué et l'ATP n'est pas hydrolysé.

Si une molécule donnée module l'activité ATPasique de la P-gp stimulée par le vérapamil ou la progestérone, cette molécule interagit spécifiquement avec la P-gp.

La courbe représentant l'activité ATPasique de la P-gp en nmol/mg/min, en présence de la molécule testée, en fonction de la concentration en vérapamil ou en progestérone (en μM) est tracée et comparée à la « cloche » obtenue avec le vérapamil ou la progestérone seuls.

Plusieurs types d'interactions sont possibles : inhibition compétitive, inhibition non compétitive, inhibition de type mixte, suractivation de l'activité catalytique et absence totale d'interactions.

Spécificité :

Pour affirmer la spécificité d'interaction d'une molécule avec la P-gp, les mêmes manipulations sont réalisées sur des vésicules sans P-gp. Ceci permet de déterminer si les ATPases contaminantes interviennent dans les modulations observées de l'activité ATPasique.

Les mêmes opérations sont effectuées sans inhibiteurs, de façon à voir le rôle des pompes ioniques. Si celles-ci sont perturbées, cela signifie que la réponse de la P-gp pour la molécule testée est non spécifique, et probablement due à une perturbation membranaire affectant l'ensemble des ATPases membranaires.

Obtention, conservation et préparation de coupes de foie humain et de foie de rat

But : obtenir des tranches de foie à partir de foie entier, puis des coupes de foie à partir des tranches obtenues.

Matériel :

- PBS : phosphate buffer saline ou tampon phosphate isotonique, Sigma®
- PFA : paraformaldéhyde, Sigma®
- Sucrose (ou saccharose), Sigma®
- NaCl, Sigma®
- Dexaméthasone, Sigma®
- Résine Tissue-Tek, Sakura®
- Microtome : cryostat Leica® CM3050
- Lames SuperFrost Plus®, Menzel-Glaser®

Foie humain :

Les morceaux de foie humain conservés à -80°C proviennent de l'Hôpital de Besançon, après accord du Comité d'éthique local.

Après décongélation, les échantillons de foie humain sont coupés en tranches d'environ 1 cm sur 0,5 cm puis sont fixés dans le PFA 3% à +4°C pendant 24 heures. Ils sont ensuite rincés dans du PBS, puis plongés dans une solution de sucrose à 30%. Une fois le sucrose bien incorporé dans l'échantillon (au bout de 2 heures en général), celui-ci est inclus dans une résine qui durcit dans l'azote liquide. L'échantillon est alors coupé au microtome refroidi à -30°C en coupes de 3 à 5 µm d'épaisseur, en fonction de la dureté de l'échantillon. Les coupes sont disposées sur des lames conservées à -20°C.

Foie de rat :

Deux rats mâles Sprague-Dawley, fournis par la société Iffa Credo®, d'environ 200 grammes, sont traités par la dexaméthasone 100 mg/kg en injection intrapéritonéale pendant 3 jours consécutifs afin d'induire les P450s de la famille 3A, les plus abondants dans le foie humain. Deux rats, ne recevant aucun traitement, sont utilisés comme contrôles.

Tous les rats sont sacrifiés le 4^{ème} jour par une méthode physique : dislocation cervicale (séparation de la moelle du cerveau) suivie d'une exsanguination [15]. Les foies sont prélevés, les gros lobes sont perfusés par du NaCl 9‰ puis les foies sont maintenus dans cette même solution dans la glace. Chaque foie est découpé en tranches d'environ 1 mm d'épaisseur. Des tranches sont congelées à l'azote liquide (en vue d'une préparation ultérieure de microsomes), d'autres sont immédiatement fixés dans le PFA 3% et les tranches restantes sont immédiatement incubés avec différents substrats (*cf* Page 81).

Les tranches laissées dans le PFA 3% à +4°C pendant 24 heures sont, après rinçage dans du PBS, immergées dans une solution de sucrose à 30% pendant environ 2 heures. Après inclusion de l'échantillon dans une résine durcissant au contact de l'azote liquide, celui-ci est coupé au microtome en coupes d'environ 3 à 5 µm d'épaisseur. Les coupes sont ensuite disposées sur des lames conservées à -20°C.

Obtention et culture cellulaire d'hépatocytes de rat congelés et isolés

But : obtenir des hépatocytes de foie de rat

Matériel :

Hépatocytes de rat congelés :

- Hépatocytes de rats Sprague-Dawley congelés, Xenotech®
- Milieu de resuspension K2200, Xenotech®
- Milieu de culture K2300, Xenotech®
- Plaque 24 puits, Nunc®
- Plaque 6 puits, Nunc®

Hépatocytes de rat isolés :

- Solutions de perfusion :

- NaCl, Sigma®
- KCl, Sigma®
- Hépès : N-(2-Hydroxyethyl)Piperazine-N'-(2-Ethane acide Sulphonique), Sigma®
- NaOH, Sigma®
- MgSO₄, 7H₂O, Sigma®
- CaCl₂, Sigma®
- Collagénase de type I (Clostridiopeptidase A), Sigma®
- pH-mètre
- Filtres 0,22 µm

- Réalisation du montage :

- Thermostat à eau à 37°C à agitation par mouvement orbital
- Pompe à circulation d'eau thermostatée à 37°C
- Tubulures
- Matériel pour microchirurgie : canule en polyéthylène, fils, ciseaux...
- Compresses
- Trompe à vide
- Enceinte thermostatée à 37°C
- Piège à bulles
- Pompe à galet
- Pince de Mohr
- Centrifugeuse
- Bassine à glace

- Détermination de la viabilité cellulaire et de l'activité métabolique :

- Cellule de Malassez
- Bleu trypan, Sigma®
- Fluorimètre Tecan X-Fluor4®
- Plaques 96 puits, Nunc®
- BZR : 7-benzyloxyrésorufine, Sigma®
- ETR : 7-éthoxyrésorufine, Sigma®

- Culture des hépatocytes :

- Milieu Williams E Glutamax I, Invitrogen®
- Solution de Streptomycine-Pénicilline, Invitrogen®

- Insuline bovine, Sigma®
- Sérum de veau foetal, Dominique Dutscher®
- Hémisuccinate d'hydrocortisone, Sigma®
- Plaques 12 puits Biocoat®, Becton Dickinson®

Hépatocytes de rat congelés :

Il est important de travailler sous hotte en conditions stériles pour décongeler et mettre en culture les hépatocytes de rat congelés. Un tube d'hépatocytes de rats Sprague-Dawley, contenant environ 7 millions de cellules, est resuspendu dans 10 mL de milieu de resuspension préalablement mis au bain-marie à 37°C. Après centrifugation lente à 600 tours/min pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé par aspiration et le culot de cellules est dissous dans 15 mL de milieu de culture réchauffé à 37°C. Le tube, retourné doucement pour mélanger, contient environ 500000 cellules/mL. Les 15 mL sont alors distribués à raison de 500000 cellules dans les puits d'une plaque 24 puits et 1 million de cellules dans les puits d'une plaque 6 puits. Les plaques sont placées à l'étuve réglée à 37°C, 6% de CO₂ et 100% d'humidité résiduelle. Le milieu de culture est changé au bout de 3 ou 4 heures et peut être conservé 48 heures.

Après obtention des premiers résultats, un nouvel essai de mise en culture des hépatocytes de rats congelés est effectué dans des conditions différentes. Le milieu de resuspension est changé pour du milieu E de Williams avec Glutamine I. Le milieu d'ensemencement, le milieu de culture et les plaques 12 puits sont les mêmes que ceux utilisés pour la culture des hépatocytes de rat isolés. Les cellules sont réparties à raison de 1,2 millions de cellules par puits dans 6 puits de la plaque 12 puits.

Hépatocytes de rat isolés :

Principe :

L'isolement des cellules hépatiques de rat consiste en une procédure de digestion enzymatique en deux étapes décrite par Seglen [121, 122]. Une première perfusion d'un tampon sans calcium est réalisée afin d'attaquer les ponts intercellulaires contenant du calcium, suivie d'une deuxième perfusion avec calcium et collagénase. Le calcium est nécessaire à l'activation de la collagénase, qui digère la matrice extracellulaire.

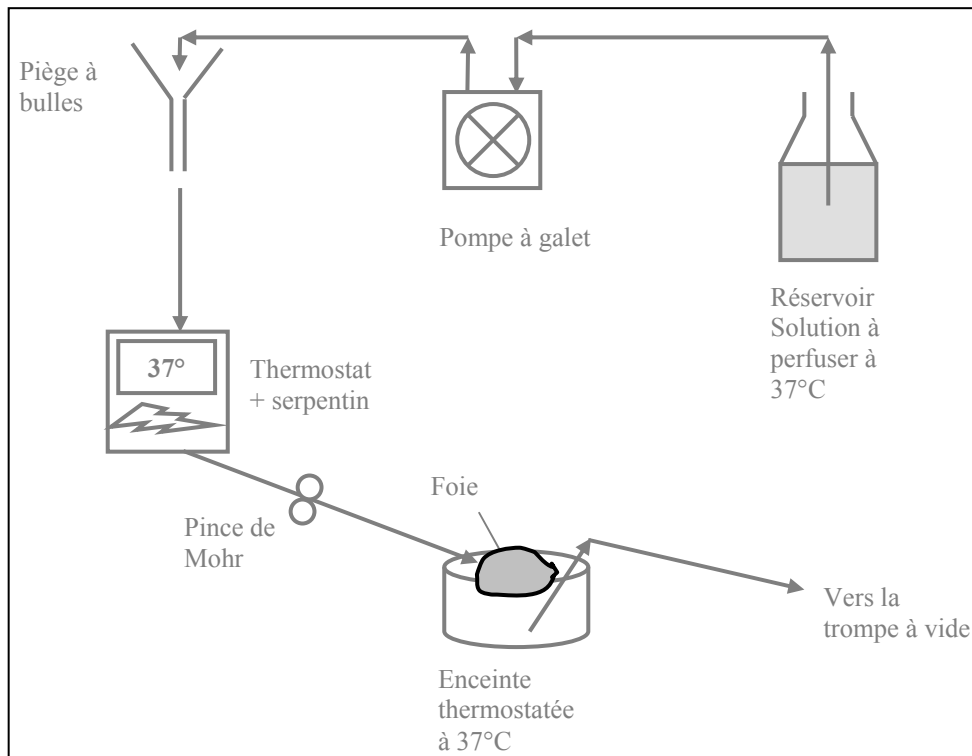


Figure 24 : Schéma du montage permettant l'isolement des hépatocytes à partir d'un foie de rat entier

Préparation des perfusions :

Le montage est schématisé sur la ci-dessus. Toutes les tubulures doivent être nettoyées. Les solutions à perfuser sont préparées à l'avance et stérilisées par filtration sous vide. Un litre de solution est préparé à partir de NaCl, KCl et Hépès dissous dans l'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 grâce à une solution de NaOH concentrée. La perfusion 1 sans calcium est constituée de 900 mL de cette solution, les 100 mL restants sont mélangés avec de la collagénase de type IA (115 unités de digestion/mL) et du chlorure de calcium et constituent la perfusion 2 avec calcium et collagénase. Les solutions de perfusion sont réchauffées à 37°C avant utilisation afin de rester dans des conditions physiologiques. Une solution 3 (700 mL) utilisée pour le lavage et l'incubation des cellules est préparée avec du NaCl, du KCl, du $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, de l'Hépès et du CaCl_2 , et ajustée à pH 7,4. Toutes les solutions sont stérilisées sur des filtres 0,22 μm .

Les manipulations doivent être effectuées sans interruption du fait de la fragilité des cellules hépatiques.

Le réservoir, le piège à bulles, le serpentin et la tubulure de sortie sont remplis avec la perfusion 1, les bulles d'air étant éliminées. La pompe est arrêtée et l'écoulement du liquide

doit être stoppé à l'aide d'une pince de Mohr. La canule destinée à faire pénétrer la perfusion par la veine porte est emplie de solution de perfusion 1 et est fermée par une pince légère. Le débit de la pompe doit être de 30 à 40 mL/min.

Mise en place de la première perfusion :

Le rat anesthésié par du Pentobarbital 6g/100 mL en intrapéritonéal (environ 300 µL pour un rat de 200 g) est attaché sur la table d'opération. Une fois l'abdomen largement ouvert (Figure 25), les viscères sont dégagés. Les ligaments retenant le foie sont coupés. La veine porte dégagée et nettoyée, la canule emplie de solution 1 y est placée en ayant soin de ne pas l'introduire trop profondément à l'intérieur de l'organe afin d'éviter d'obstruer une partie des veinules et de provoquer une irrigation irrégulière des lobes. La canule, fixée solidement par deux fils, est alors branchée sur l'appareil à perfusion en évitant les bulles d'air. La pince de Mohr est ouverte et la veine cave inférieure est rapidement coupée. Le foie doit blanchir en totalité en quelques secondes. La pompe est alors mise en marche et les vaisseaux efférents du foie sont coupés sans attendre pour favoriser l'écoulement du liquide.

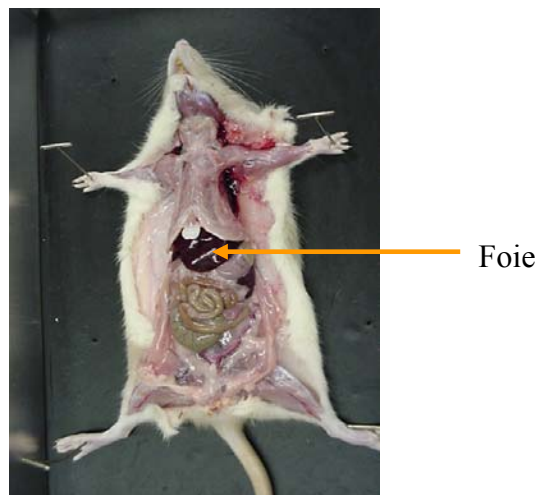


Figure 25 : Dissection d'un rat

Image provenant du site internet <http://www.vc.cc.tx.us/departments/bio/RatDissection/opened.htm> (Site internet du « Victoria College », Texas, Etats-Unis)

Excision du foie :

Le foie est alors dégagé doucement de la carcasse, en évitant de le léser, de couper la capsule ou d'arracher la canule. Il est placé dans une enceinte thermostatée à 37°C sur une

grille. Le trop plein de liquide est éliminé par aspiration douce à l'aide de la trompe à vide. Le débit de la pompe doit être juste suffisant pour assurer un niveau constant dans le piège à bulles.

Perfusion de la deuxième solution de perfusion, avec calcium et collagénase :

Lorsque la solution de perfusion 1 est passée en totalité, elle est remplacée par la solution de perfusion 2. Le réservoir contenant la solution 1 doit être vidé aussi complètement que possible avant d'introduire la solution 2 pour réduire la dilution de la solution de collagénase par la solution 1, cependant, la perfusion ne doit pas être interrompue. Une fois la totalité de la solution de collagénase introduite dans le circuit, elle doit circuler en circuit fermé, et le trop plein de liquide doit être aspiré par le tube d'aspiration de la pompe à galet. La perfusion est arrêtée lorsque le foie est bien dissocié, au bout de 8 à 10 minutes.

Dissociation et purification :

L'étape de dissociation et purification se fait à +4°C. Le foie est découpé en petits morceaux à l'aide de ciseaux. Les morceaux sont placés dans une compresse stérile servant de tamis, et récupérés dans la solution de lavage 3. Après centrifugation pendant 1 minute à 63g, le surnageant est enlevé et le culot est lavé avec 40 mL de solution 3. Cette opération de centrifugation est ensuite répétée deux fois, les cellules étant remises en suspension dans 50 mL de solution 3 après la dernière centrifugation (volume pouvant varier en fonction de l'importance du culot de cellules).

Détermination de la viabilité cellulaire :

La viabilité cellulaire est maintenant déterminée sur 2 dilutions de la suspension cellulaire : 100 µl de suspension cellulaire auxquelles 500 µl de solution de Bleu trypan dilué au 1/5 dans du sérum physiologique sont ajoutés (dilution = 6), ou bien 50 µl de suspension cellulaire dans 550 µl de la même solution de Bleu trypan (dilution = 12). Après homogénéisation douce, 250 à 300 cellules sont comptées à l'hémocytomètre de Malassez, en distinguant les cellules blanches vivantes des cellules bleues mortes. La viabilité, exprimée en pourcentage, est le rapport (nombre de cellules vivantes*100) sur (nombre de cellules vivantes + nombre de cellules mortes). La concentration cellulaire, exprimée en nombre de

cellules vivantes par mL, est calculée en comptant le nombre moyen de cellules vivantes dans un grand carreau de la cellule de Malassez, multiplié par 100 (100 grands carreaux au total dans cette cellule) puis par 1000 (le volume total de la cellule de Malassez est 1 μ l et on calcule le nombre de cellules pour 1 mL) puis par la dilution.

Détermination de l'activité métabolique des hépatocytes obtenus :

Un essai en fluorimétrie est réalisé sur la suspension cellulaire obtenue. Les mesures se font à l'aide du fluorimètre Tecan X-Fluor4®. La température au sein de l'appareil et au niveau de l'échantillon est de 37°C, ce qui permet de se rapprocher le plus des conditions physiologiques, mais qui est également très importante à contrôler puisque la stabilité de la fluorescence dépend de la température. Les mesures sont effectuées dans des plaques 96 puits en triplicate, de façon à obtenir des moyennes de fluorescence. Les cellules sont testées à différentes concentrations (en général de 500000 à 1 million de cellules par puits) en présence de BZR 10 μ M ou ETR 10 μ M pour un volume total de 100 μ l. Certains échantillons, servant de contrôles, contiennent uniquement les suspensions cellulaires. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont de 530 nm et 590 nm respectivement. Les mesures se font en cinétique sur 30 minutes. Des courbes représentant la fluorescence de l'échantillon en fonction du temps sont tracées pour chaque substrat et pour les différentes concentrations cellulaires.

Mise en culture des hépatocytes :

Les cellules en suspension ainsi obtenues sont centrifugées pendant 5 minutes, à 600 tours/min. Le culot est resuspendu dans environ 20 mL de milieu d'ensemencement réchauffé au bain-marie à 37°C. Le milieu d'ensemencement est un milieu E de Williams complémenté avec de la L-glutamine 2mM et additionné de pénicilline 100 UI/mL, streptomycine 100 μ g/mL, insuline bovine 4 μ g/mL et sérum de veau fœtal 10% v/v. La suspension est répartie à raison de 4 à 5 millions de cellules par puits dans des plaques 12 puits dont les puits sont imprégnés de collagène I. Le collagène de type I, présent dans de nombreux tissus et organes, est utilisé en « coating » fin sur une surface de culture pour permettre le développement, la prolifération et la différenciation d'un grand nombre de type cellulaire, dont les hépatocytes. Les plaques sont laissées à l'étuve réglée à 37°C, 6% de CO₂ et 100% d'humidité résiduelle pendant 3 à 4 heures. Le milieu d'ensemencement est ensuite aspiré et remplacé par du milieu

de culture préalablement plongé au bain-marie à +37°C. Le milieu de culture est du milieu E de Williams complémenté avec de la L-glutamine 2mM et additionné de pénicilline 100 UI/mL, streptomycine 100 µg/mL, insuline bovine 4 µg/mL et hémisuccinate d'hydrocortisone 50 µM. Le milieu doit être renouvelé toutes les 24 heures. Les milieux d'ensemencement et de culture sont stérilisés sur des filtres 0,22 µm.

Culture cellulaire de fibroblastes de poumon de Hamster chinois : lignée résistante D/ADX

But : ensemercer et entretenir des cellules résistantes D/ADX surexprimant la P-gp afin de les mettre au contact d'Ac et de substrats et de les observer au microscope.

Matériel :

- Milieu MEM (Milieu Minimum Essentiel) avec sels de Earle, Glutamax I, Life Technologies®
- Sérum de veau fœtal, origine Amérique du Nord, Life Technologies®
- Tampon PBS (phosphate buffer saline ou tampon phosphate isotonique) de Dubelco sans calcium ni magnésium, Eurobio®
- Trypsine-EDTA, Life Technologies®
- Antibiotiques : mélange Pénicilline et Streptomycine (10000 U/mL de pénicilline et 10 mg/mL de dihydrostreptomycine en sérum physiologique), Eurobio®
- Etuve à 37°C sous 6% de CO₂ et une humidité saturante
- Flacons de culture Nunc® 80 cm², Poly Labo®
- Boîtes de Pétri 10 cm², Nunc®
- Lamelles de microscopie, Menzel-Glaser®

Préparation du milieu de culture enrichi en sérum : le milieu complet contient 500 mL de milieu MEM conservé à +4°C, 44 mL (8%) de sérum de veau fœtal conservé à -20°C et 5,5 mL (1%) d'un mélange d'antibiotiques (10000 U/mL de pénicilline et 10 mg/mL de streptomycine).

Toutes les manipulations suivantes se font dans des conditions stériles.

Décongélation et ensemencement des cellules :

Les cellules, conservées dans des cryotubes de 1,8 mL, sont placées au bain-marie à 37°C environ 3 à 4 minutes. Ces cellules sont ensuite transvasées dans un tube Falcon® de 15 mL et diluer progressivement dans du milieu de culture, par tranches de 2mL, jusqu'à environ 13 à 14 mL. Cette opération de dilution progressive permet de limiter les chocs osmotiques et est nécessaire pour diluer le DMSO, cryoprotecteur utilisé lors de la congélation et qui sera ensuite éliminé avec un lavage.

Après centrifugation des cellules 10 minutes à 1500 rpm à température ambiante et élimination du surnageant par aspiration, le culot de cellules est resuspendu dans environ 2 mL de milieu. Les cellules sont ensuite réparties dans 2 flacons de culture de 80 cm² préalablement remplis avec 15 mL de milieu, à raison de 0,7 mL dans le premier flacon et 1,4 mL dans le second.

Les flacons de culture sont placés dans l'étuve à 37°C et sous 6% de CO₂.

Le milieu de culture est changé 24 heures après l'ensemencement afin d'éliminer les cellules mortes (environ 70% des cellules meurent après décongélation) qui libèrent des inducteurs d'apoptose susceptibles de conduire à la mort cellulaire.

Entretien des flacons de culture et/ou ensemencement des boîtes de Pétri :

Lorsque les cellules sont confluentes ou sub-confluentes, il est nécessaire de les trypsiner, c'est-à-dire de les détacher de la face inférieure du flacon de culture, et de les ensemer dans de nouveaux flacons et dans des boîtes de Pétri, avec ou sans lamelles, afin de réaliser ultérieurement des incubations avec des anticorps ou des substrats.

Après aspiration du milieu de culture à l'aide de la trompe à vide, le tapis cellulaire est aspergé par 5 mL de PBS afin d'éliminer le maximum de milieu de culture contenant un inhibiteur de la trypsine. Le PBS est aspiré, puis 3 mL de Trypsine-EDTA sont ajoutés dans le flacon qui est placé à l'étuve pendant 5 minutes. L'action de la Trypsine-EDTA est d'hydrolyser les protéines d'adhésion et de chélater le calcium, conduisant ainsi au décollement du tapis cellulaire. Lorsque le tapis de cellules se décolle facilement du flacon de culture, la réaction de trypsination est arrêtée par l'ajout de 7 mL de milieu enrichi. Le flacon de culture contient alors 10 mL de cellules en suspension.

En règle générale, deux flacons de culture sont ensemencés pour l'entretien des cellules, à deux concentrations différentes. Les deux flacons de culture de 80 cm² sont

préalablement remplis avec 15 mL de milieu enrichi. Les cellules sont ensuite ajoutées. Deux dilutions sont en général effectuées : une dilution au 100^{ème} (100 µL de suspension cellulaire) et une dilution au 30^{ème} (300 µL de suspension cellulaire), afin d'obtenir des cellules confluentes à des moments différents et ainsi d'optimiser leur utilisation.

Pour étudier la localisation du CYP3A et de la P-gp dans ces cellules et pour observer l'action de différentes molécules sur ces mêmes cellules, celles-ci doivent êtreensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre contenant ou non des lamelles de microscopie (4 lamelles sont placées au fond de chaque boîte de Pétri à l'aide d'une pince fine). Puisque les boîtes et les lamelles utilisées ne sont pas stériles, celles-ci sont mises au contact d'éthanol qui est ensuite aspiré par la trompe à vide. Les boîtes de Pétri sont remplies avec 2.5 mL de milieu de culture enrichi. Les boîtes de Pétri sont ensuiteensemencées avec la suspension cellulaire à des concentrations différentes dans chaque boîte, en général 50, 20 et 10 µL, afin d'obtenir des confluentes et donc de travailler sur ces cultures plusieurs jours de suite.

Les flacons de culture et les boîtes de Pétri sont placés dans l'étuve à 37°C et sous 6% de CO₂.

Fixation des cellules D/ADX :

Afin d'incuber les cellules D/ADX avec des anticorps anti-CYP3A et anti-P-gp, les cellules sont fixées. Lorsque les cellules en culture sont sub-confluentes, le milieu de culture est aspiré puis le milieu de culture restant dans la boîte de Pétri est éliminé grâce à un lavage au PBS. Environ 2,5 mL de fixateur PFA 3% sont mis au contact des cellules pendant 1 à 2 heures. Plusieurs rinçages au PBS à température ambiante et pendant des temps croissants (par exemple 2 minutes, 10 minutes, 30 minutes puis 1 heure) sont ensuite nécessaires afin d'éliminer le maximum de fixateur. Le PBS est ensuite laissé dans la boîte de Pétri placée à +4°C pendant au moins une nuit.

Immunolocalisation du CYP3A et de la P-gp dans des coupes de foie et des fibroblastes

But : définir les localisations au niveau cellulaire du CYP3A et de la P-gp dans des coupes de foie humain, des tranches de foie de rat et des fibroblastes D/ADX.

Matériel :

- Ac anti-3A : anticorps monoclonal dirigé contre le CYP3A (Ac anti-humain produit chez la souris), Gentest BD Biosciences Pharmingen®
- Ac anti-P-gp/FITC : anticorps dirigé contre la P-gp et conjugué au FITC (Ac anti-humain produit chez la souris), Gentest BD Biosciences Pharmingen®
- Ac anti-3A4 : anticorps dirigé contre le CYP3A4 (Ac anti-humain produit chez le lapin), Calbiochem®
- Ac anti-P-gp C219 : anticorps dirigé contre la P-gp (Ac anti-humain et hamster produit chez la souris), Calbiochem®
- Ac anti-3A2 : anticorps dirigé contre le CYP3A2 (Ac anti-rat produit chez le lapin), Daiichi Pure Chemicals Co®, par l'intermédiaire de Gentest BD Biosciences®
- MAR-FITC : Immunoglobuline G Mouse-Anti-Rabbit conjugué au FITC, FluoProbes®. Cette IgG est produite chez la souris et réagit avec les IgG de lapin.
- RAM-FITC : Immunoglobuline G Rabbit-Anti-Mouse conjugué au FITC, Interchim®. Cette IgG est produite chez le lapin et réagit avec les IgG de souris.
- PBS : phosphate buffer saline ou tampon phosphate isotonique, Sigma®
- SDS : sodium dodécyl sulfate, Sigma®
- BSA : sérum albumine bovine, Sigma®
- Tris, BioRad®
- Glycérol, Sigma®
- n-propylgallate, Sigma®

Coupes de foie :

Le protocole d'incubation des Ac sur les coupes de foie placées sur une lame et fixées par le paraformaldéhyde 3% est le suivant :

	Action	Produit	Temps	Technique
1	Rincer	PBS	5 minutes	bain
2	Dénaturer les protéines	SDS 1% / PBS	30 secondes	goutte
3	Rincer	PBS	quelques secondes	bain
4	Saturer – Bloquer les sites de liaisons non spécifiques	BSA 1% / PBS	5 minutes	goutte
5	1 ^{er} anticorps	Dilué dans BSA 1% / PBS	1 heure	goutte
6	Rincer	PBS	2 x 5 minutes	bain
7	2 ^{ème} anticorps	Dilué dans BSA 1% / PBS	40 minutes	goutte
8	Rincer	PBS	3 x 5 minutes	bain
9	Monter (1)	Bleu Evans / PBS	30 secondes à 1 minute	goutte
	Monter (2)	PBS	quelques secondes	bain
	Monter (3)	Milieu de montage		goutte
	Monter (4)	Lamelle + vernis		

Toutes les étapes se réalisent à température ambiante.

La technique du « bain » consiste à immerger la lame dans le PBS pendant le temps indiqué. La technique de la « goutte » consiste à placer environ 40 µl de la solution indiquée sur la coupe de foie disposée sur la lame, puis laisser reposer la lame pendant le temps recommandé dans une enceinte humide, de façon à ce que la goutte ne s'évapore pas.

La coloration se fait avec le Bleu Evans qui colore les mitochondries en rouge. Le milieu de montage contient du Tris 0,4M, du glycérol afin d'obtenir un indice de réfraction proche de celui du verre et du n-propylgallate 2% pour retarder le photoblanchiment.

A la fin du montage, l'échantillon est entre lame et lamelle, celle-ci étant fixée grâce à du vernis.

Les anticorps et deuxièmes anticorps correspondants utilisés lors de ces expériences sont indiqués ci-dessous. Les dilutions se font dans PBS + 1% BSA.

Coupes de foie humain :

1 ^{er} anticorps		2 ^{ème} anticorps	
Dénomination	Dilution	Dénomination	Dilution
Ac anti-3A	100	RAM-FITC	50
Ac anti-3A4	50	MAR-FITC	50
Ac anti-P-gp C219	50	RAM-FITC	50
Ac anti-P-gp/FITC	/	/	/

Coupes de foie de rat :

1 ^{er} anticorps		2 ^{ème} anticorps	
Dénomination	Dilution	Dénomination	Dilution
Ac anti-3A	100	RAM-FITC	50
Ac anti-3A4	50	MAR-FITC	50
Ac anti-P-gp C219	50	RAM-FITC	50
Ac anti-3A2	50	MAR-FITC	50

Fibroblastes D/ADX de hamster chinois :

Les fibroblastes utilisés sont préalablement fixés par du PFA 3%. Quelques modifications sont apportées par rapport au protocole d'immunomarquage sur coupes de foie, puisque dans le cas des fibroblastes, les cellules ont adhéré directement sur la lamelle, alors que les coupes de foie se trouvaient sur la lame.

Les lamelles sont laissées dans la boîte de Pétri pour toutes les étapes utilisant la technique du « bain ». Pour les incubations avec une goutte, chaque lamelle est retirée de la boîte de Pétri et posée à l'aide d'une pince sur du parafilm dans une enceinte humide afin d'éviter l'évaporation de la goutte. Une goutte de produit est déposée sur chaque lamelle en prenant soin d'éviter qu'elle ne s'étale.

Concernant l'étape de montage de l'échantillon entre lame et lamelle, une goutte de milieu de montage est déposée sur une lame de verre, puis la lamelle est retournée sur cette goutte et fixée à l'aide de vernis.

Les anticorps et deuxièmes anticorps correspondants utilisés lors de cette expérience sont les suivants, les dilutions se faisant dans PBS + 1% BSA.

1 ^{er} anticorps		2 ^{ème} anticorps	
Dénomination	Dilution	Dénomination	Dilution
Ac anti-3A	100	RAM-FITC	50
Ac anti-P-gp C219	50	RAM-FITC	50

Observation de la localisation du CYP3A et de la P-gp :

Les fluorescences obtenues au niveau des coupes de foie ou des fibroblastes incubés avec les différents anticorps sont observées au microscope à épifluorescence en immersion à l'objectif 40. Le choix du filtre à utiliser lors de l'observation dépend des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de l'anticorps marqué. Dans toutes les conditions expérimentales, les anticorps sont marqués par le FITC (soit l'anticorps est directement conjugué au FITC, soit l'anticorps est couplé à un second anticorps lui-même marqué par le FITC). Le FITC est un fluorochrome à fluorescence verte qui absorbe les radiations bleues et restitue une fluorescence verte. Une source d'excitation bleue est donc utilisée (longueur d'onde d'excitation de 380 à 490 nm environ) et va émettre dans le vert (observation à environ 520 nm), permettant de révéler les anticorps. Des photographies sont prises grâce au logiciel CoolSNAP®.

Les images peuvent être retouchées afin d'améliorer le contraste du marquage. Ainsi, la couleur rouge n'apparaît pas sur les photographies concernant l'immunolocalisation effectuée sur les coupes de foie de rat et sur les cellules D/ADX. En revanche, cette couleur est présente sur les images obtenues à partir des coupes de foie humain, afin de représenter avec plus de précisions le tissu hépatique. De même, afin d'amplifier la fluorescence des photographies lorsque celle-ci est peu intense, l'intensité d'une couleur peut être augmentée. Ainsi, l'intensité de fluorescence (couleur verte) observée sur les images représentant la localisation du CYP3A dans les cellules D/ADX ainsi que sur les images contrôles (cellules non traitées par les anticorps) a été augmentée d'un facteur 5 par rapport aux photographies représentant la localisation de la P-gp sur ces mêmes cellules.

Incubation de tranches de foie et de cellules avec différents substrats

But : déterminer, sur coupes de foie de rat et cellules en culture non fixées, la localisation au niveau intracellulaire de différents substrats, et de comparer cette localisation à celles du CYP3A et de la P-gp.

Matériel :

Tranches de foie de rats :

- Solution tamponnée saline de Hank's, Sigma®
- Plaques 6 puits, Nunc®
- PFA : paraformaldéhyde, Sigma®
- PBS : phosphate buffer saline ou tampon phosphate isotonique, Sigma®
- RESO : résorufine, Sigma®
- BZR : 7-benzyloxyrésorufine, Sigma®
- ETR : 7-éthoxyrésorufine, Sigma®
- NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, Sigma®

Hépatocytes de rat isolés :

- BZR : 7-benzyloxyrésorufine, Sigma®
- BFC : 7-benzyloxy-4-trifluorométhylcoumarine, Becton Dickinson®
- Milieu de culture (*cf* Page 68)
- Bleu Trypan, Sigma®

Fibroblastes de Hamster Chinois D/ADX :

- VRP-BP : Vérapamil-bodipy, Dr Stéphane Orlowski
- Glucose, Sigma®
- Azoture de sodium, Sigma®
- VRP : Vérapamil, Sigma®
- CsA : Ciclosporine A, Aventis®
- VBL : Vinblastine, Sigma®

Tranches de foie de rat :

Les foies de rats mâles Sprague-Dawley traités ou non par la dexaméthasone en injection intra-péritonéale pendant 3 jours sont prélevés puis découpés en tranches d'environ 1 mm d'épaisseur (*cf* Page 67). Ces tranches non fixées sont incubées dans des plaques 6 puits en présence de solution tamponnée saline de Hank's uniquement, ou bien additionnée de RESO et NADPH ou BZR et NADPH ou ETR et NADPH. Les plaques sont incubées à 37°C sous agitation constante pendant quelques secondes (T0), 30 minutes (T30) ou 60 minutes (T60). Les concentrations finales sont : [RESO] = 0,5 μ M, [x-Rés] = 5 μ M et [NADPH] = 0,3 mM. Après les incubations, les morceaux de foie sont fixés dans du PFA 3% puis conservés à +4°C. Après rinçages dans le PBS, des coupes de foie de 4 μ m d'épaisseur sont placés sur une lame (*cf* Page 67).

Hépatocytes de rat isolés :

Lorsque les cellules en culture sont adhérentes, environ 24 heures après leur ensemencement (*cf* Page 73), le surnageant est aspiré puis les substrats BZR 10 μ M ou BFC 10 μ M dilués dans le milieu de culture sont ajoutés. Les concentrations finales ont été déterminées à partir d'études de fluorimétrie permettant de détecter l'activité métabolique du CYP3A.

Les hépatocytes sont alors observés au microscope à température ambiante sur une cinétique de 30 minutes aux longueurs d'ondes adéquates.

Substrat	Métabolite fluorescent	Concentration finale	λ excitation (nm)	λ émission (nm)
BZR	RESO	10 μ M	530	590
BFC	HFC	10 μ M	410	510

La viabilité cellulaire peut être déterminée en ajoutant du Bleu Trypan 0,4%, dilué au demi dans le milieu de culture, dans un puits. Les cellules sont alors observées au microscope, celles colorées en bleu sont des cellules mortes.

Fibroblastes de hamster chinois D/ADX :

La molécule testée sur les cellules D/ADX est le VRP-BP, à température ambiante.

Deux techniques d'incubations entre lame et lamelle sont utilisées, afin de déterminer d'une part l'accumulation du substrat fluorescent, et d'autre part son efflux. La première, la méthode dite « d'accumulation », consiste à observer au microscope les cellules placées entre lame et lamelle en remplaçant le milieu de montage par une goutte contenant la molécule à étudier. La deuxième méthode, méthode « d'efflux », consiste à mettre les cellules, disposées sur une lamelle, au contact d'une goutte de substrat pendant un temps donné, puis après rinçage, de monter l'échantillon entre lame et lamelle avec une goutte contenant ou non le substrat.

Une autre technique, consistant à incuber le substrat directement dans la boîte de Pétri dans laquelle ont été cultivées les cellules, a été utilisée.

Méthode d'accumulation entre lame et lamelle :

La lamelle sur laquelle ont poussé les cellules est retournée sur une goutte de substrat (environ 90 μ L) déposée sur une lame de verre. Le substrat est dilué dans du PBS et est additionné de glucose 1 mM afin d'éviter d'éventuelles carences énergétiques des cellules. En effet, les cellules vont dépenser de l'ATP et risquent de ne plus avoir assez de nutriments pour permettre le bon fonctionnement de la P-gp en particulier. L'accumulation de VRP-BP sera alors appréciée au microscope.

Méthode d'efflux entre lame et lamelle :

Une goutte de substrat (environ 90 μ L) est déposée sur la lamelle où se trouvent les cellules pendant un temps donné (10 minutes). Après lavage, la lamelle est retournée sur une goutte déposée sur une lame de verre. L'efflux de VRP-BP hors de la cellule sera évalué après observation au microscope.

Un modulateur de l'activité ATPasique de la P-gp, le vérapamil, ainsi qu'un inhibiteur des H⁺ATPases d'origine mitochondriale, l'azoture de sodium, sont également incubés en présence de VRP-BP.

Un tableau résumé des expériences réalisées entre lame et lamelle est présenté ci-dessous.

		Incubation (10 minutes)	Lavage	Montage
Méthode d'accumulation	1	/	/	VRP-BP 1 μ M glucose 1 mM PBS
	2	/	/	VRP-BP 100 nM glucose 1 mM PBS
	3	/	/	glucose 1 mM PBS
Méthode d'efflux	4	VRP-BP 1 μ M glucose 1 mM PBS	PBS	glucose 1 mM PBS
	5	VRP-BP 1 μ M azoture 10 mM PBS	PBS	glucose 1 mM PBS
	6	VRP-BP 1 μ M VRP 30 μ M PBS	VRP 30 μ M glucose 1 mM PBS	VRP 30 μ M glucose 1 mM PBS
	7	VRP-BP 1 μ M VRP 30 μ M PBS	PBS	glucose 1 mM PBS
	8	VRP-BP 100 nM VRP 30 μ M PBS	VRP 30 μ M glucose 1 mM PBS	VRP 30 μ M glucose 1 mM PBS

Dans les deux conditions expérimentales, la lamelle est fixée sur la lame avec du vernis. Après séchage de celui-ci, l'observation se fait au microscope à épifluorescence en immersion à l'objectif 40 avec le filtre bleu, le VRP-BP se comportant comme la fluorescéine.

Incubations dans les boîtes de Pétri :

Le milieu de culture contenu dans la boîte de Pétri dans laquelle ont été cultivées les cellules D/ADX est aspiré. Un volume de 2,5 mL d'une solution de VRP-BP est ajouté dans la boîte de Pétri et est laissé au contact des cellules pendant environ 10 minutes. L'observation de la fluorescence en cinétique au microscope permet d'apprécier l'accumulation du produit dans les cellules. La solution est ensuite remplacée par une autre, selon le tableau ci-dessous, permettant de déterminer l'efflux au microscope.

Des modulateurs de l'activité ATPasique de la P-gp (vérapamil, ciclosporine A, vinblastine) et un inhibiteur des H⁺ATPases d'origine mitochondriale, l'azoture de sodium, sont également incubés en présence de VRP-BP.

Un tableau résumé des expériences réalisées dans les boîtes de Pétri est présenté ci-dessous.

	Incubation (10 minutes)	Lavage
	Accumulation	Efflux
9	VRP-BP 1 μ M glucose 1 mM PBS	glucose 1 mM PBS
10	VRP-BP 1 μ M VRP 30 μ M PBS	VRP 30 μ M glucose 1 mM PBS
11	VRP-BP 1 μ M VRP 30 μ M PBS	glucose 1 mM PBS
12	VRP-BP 1 μ M azoture 10 mM PBS	glucose 1 mM PBS
13	VRP-BP 1 μ M azoture 5 mM PBS	azoture 5 mM glucose 1 mM PBS
14	VRP-BP 1 μ M CsA 1 μ M PBS	CsA 1 μ M glucose 1 mM PBS
15	VRP-BP 1 μ M VBL 10 μ M glucose 1 mM PBS	VBL 10 μ M glucose 1 mM PBS

L'observation se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence en phase inverse avec le filtre bleu.

Observation de la localisation des substrats :

Les fluorescences obtenues après incubation des différents substrats sont observées au microscope à épifluorescence. Les lames sont étudiées en immersion à l'objectif 40 alors que les boîtes de Pétri sont observées à l'aide d'un microscope en phase inverse à l'objectif 40. Dans le cas des alkyloxyrésorufines, la source d'excitation utilisée est une source verte (longueur d'onde d'excitation de 465 à 550 nm) et l'observation se fait dans le rouge (560 nm environ). L'observation du VRP-BP se fait quant à elle grâce à une source d'excitation bleue qui va émettre dans le vert, le VRP-BP ayant des propriétés spectrales semblables à celles de la fluorescéine. Des photographies sont effectuées grâce au logiciel CoolSNAP® en cinétique à différents temps d'incubation.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Mesures *in vitro* pour le choix des substrats

Les substrats à étudier en microscopie sont choisis en fonction de leur interaction avec le CYP3A et la P-gp. En présence d'une molécule donnée, l'activité métabolique du CYP3A est déterminée en fluorimétrie sur microsomes de rat et microsomes humains, et l'activité ATPasique de la P-gp est déterminée par spectrophotométrie d'absorption sur vésicules membranaires (*cf* Pages 57 et 61).

Ces mesures sont un travail préliminaire aux essais sur les différents types cellulaires. Ainsi, nous n'exposerons pas dans cette thèse tous les résultats obtenus lors de ces tests avec diverses molécules. Nous présenterons uniquement les molécules dont nous avons choisi d'étudier les localisations intracellulaires en microscopie. Leur comportement en fluorescence est le suivant (les longueurs d'onde indiquées sont optimisées en fonction des filtres présents dans le fluorimètre du laboratoire) :

Substrats non fluorescents	Métabolites fluorescents	λ Excitation	λ Emission
Benzyloxyrésorufine (BZR)	Résorufine (RESO)	530 nm	590 nm
Méthoxyrésorufine (MTR)	Résorufine (RESO)	530 nm	590 nm
Ethoxyrésorufine (ETR)	Résorufine (RESO)	530 nm	590 nm
Pentoxyrésorufine (PTR)	Résorufine (RESO)	530 nm	590 nm
7-benzyloxy-4-(trifluorométhyl)-coumarine (BFC)	7-hydroxy-4-(trifluorométhyl)-coumarine (HFC)	410 nm	510 nm
Vérapamil conjugué au fluorophore bodipy (VRP-BP)		485 nm	530 nm

3.1.1. Les précurseurs de la résorufine

La BZR, l'ETR, la MTR et la PTR sont testées en fluorimétrie (*cf* Page 57) afin de déterminer si ces molécules sont substrats du CYP3A. Ainsi, les fluorescences de ces composés, à la concentration de 10 μ M, sont mesurées dans les microsomes de rat et dans les microsomes humains ([P450] = 0,1 μ M) après ajout de NADPH 0,6 mM sur une cinétique de 20 minutes. Les résultats sont représentés sur la figure 26 pour les microsomes de rat traité

par la dexaméthasone, les résultats pour les microsomes humains étant sensiblement identiques, avec toutefois des valeurs de fluorescence plus faibles (résultats non représentés).

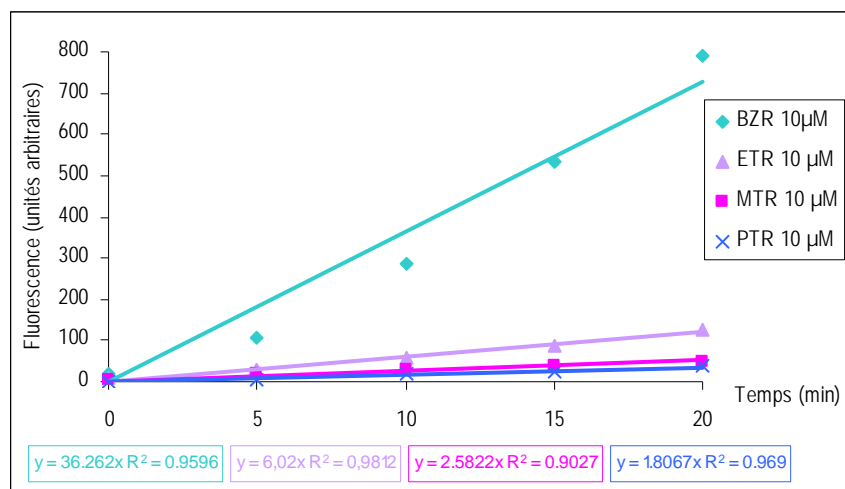
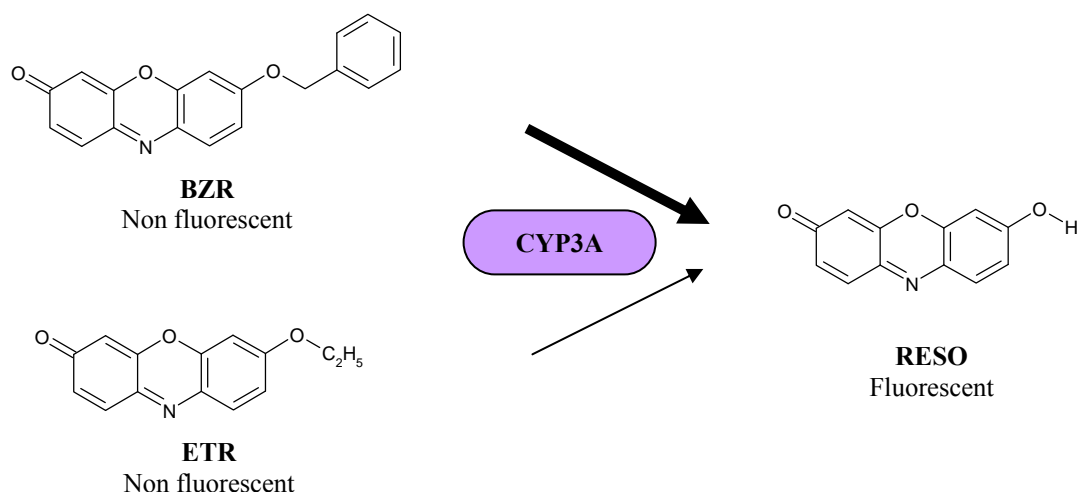


Figure 26 : Fluorescence en présence de BZR, MTR, ETR et PTR en fonction du temps avec NADPH 0.6 mM dans les microsomes de rat [P450] = 0.1 μM

Il apparaît alors qu'en présence de BZR, la fluorescence du milieu augmente au cours du temps. Une plus faible augmentation de fluorescence est observée en présence d'ETR. La BZR et l'ETR sont donc substrats du CYP3A et leur métabolisation entraîne la formation de RESO, molécule fluorescente. Au contraire, la MTR et la PTR ne semblent pas être métabolisées en RESO par le CYP3A.



Les turn-over (pmoles de RESO/min/pmoles de P450), calculés selon la méthode indiquée en page 57, sont les suivants :

	Microsomes de rat	Microsomes humains
BZR	31,5	25
ETR	4	11
MTR	0	0
PTR	0	0

Pour la MTR et la PTR, les turn-over sont très faibles voire non calculables du fait des pentes très faibles voire nulles des droites représentant l'augmentation de la fluorescence en fonction du temps.

Dans les microsomes de rats traités à la dexaméthasone, le CYP3A, responsable de la métabolisation de ces dérivés en RESO, représente environ 50% des P450s totaux [108]. Les résultats des turn-over sont donc à multiplier environ par 2 pour obtenir l'activité réelle des CYP3A. De même, dans les microsomes humains, le CYP3A représente environ 30% des P450s totaux [105].

L'activité ATPasique de la P-gp en présence de ces molécules est ensuite déterminée en spectrophotométrie à 340 nm grâce au suivi de la disparition du NADH dans le milieu (*cf* Page 61). La RESO, la BZR, l'ETR, la MTR et la PTR ont tous quasiment le même comportement vis-à-vis de la P-gp. Une augmentation de l'activité ATPasique basale est observée à partir de quelques μM . Trois composés se distinguent légèrement par une augmentation de l'activité ATPasique basale précoce à partir de 5 μM environ pour la MTR et la BZR, et 10 μM pour la PTR, alors que l'augmentation est observée pour la RESO et la MTR à partir de 20 μM (Figure 27).

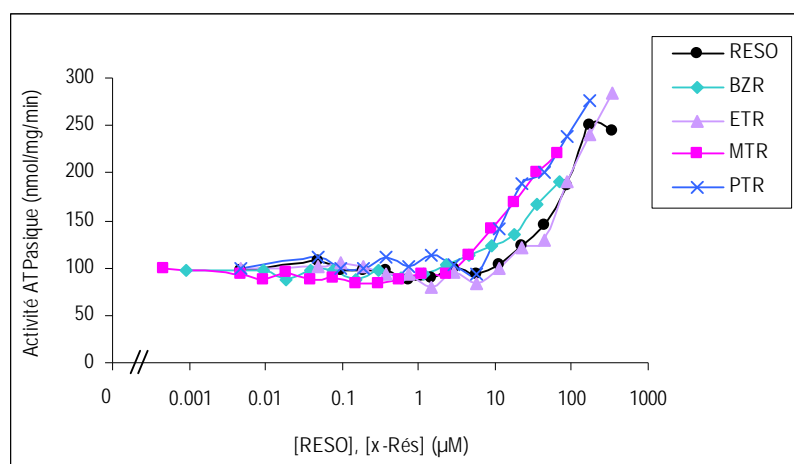


Figure 27 : *Activité ATPasique de la P-gp sur vésicules résistantes en présence de RESO ou x-Rés à différentes concentrations*

De plus, une légère sur-activation non compétitive des activités en présence de vérapamil (Figure 28) ou progestérone (courbes non représentées) est également visible. Les molécules qui semblent se démarquer légèrement des autres sont la MTR et la PTR. L'augmentation de l'activité sur la basale commence un peu avant les autres molécules et la sur-activation des activités en présence de VRP est plus importante.

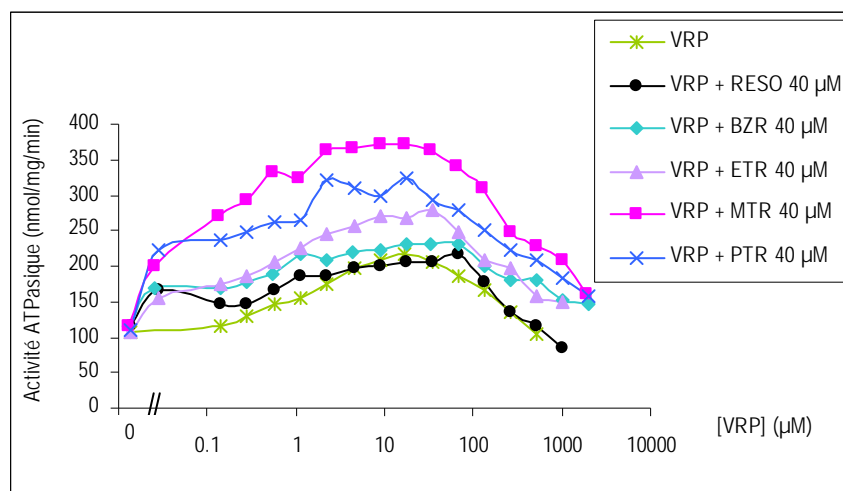


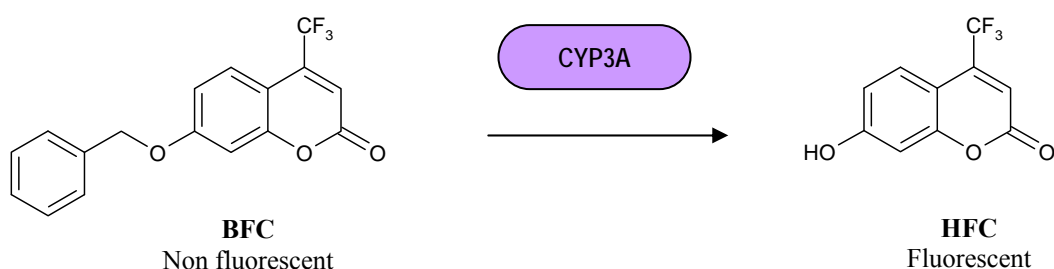
Figure 28 : *Activité ATPasique de la P-gp sur vésicules résistantes en présence de RESO ou x-Rés à 40 µM en fonction de la concentration en VRP*

La MTR et la PTR semblent être des meilleurs substrats de la P-gp, cependant celles-ci sont très peu métabolisées par le CYP3A dans nos études et ne pourront donc pas être utilisées pour des études en microscopie.

Les molécules que nous utiliserons pour être testées en microscopie sont la BZR et l'ETR, qui sont les mieux métabolisées par le CYP3A, et également leur métabolite, la RESO, même si ces deux couples de substrat/métabolite ne semblent pas avoir un comportement très différent vis-à-vis de la P-gp.

3.1.2. La 7-benzyloxy-4-trifluorométhylcoumarine

La BFC 30 µM testée en fluorimétrie selon la même méthode que précédemment est métabolisée par le CYP3A en HFC, molécule plus fluorescente. L'augmentation de fluorescence se produit dans les microsomes de rats et dans les microsomes humains (résultats non représentés).



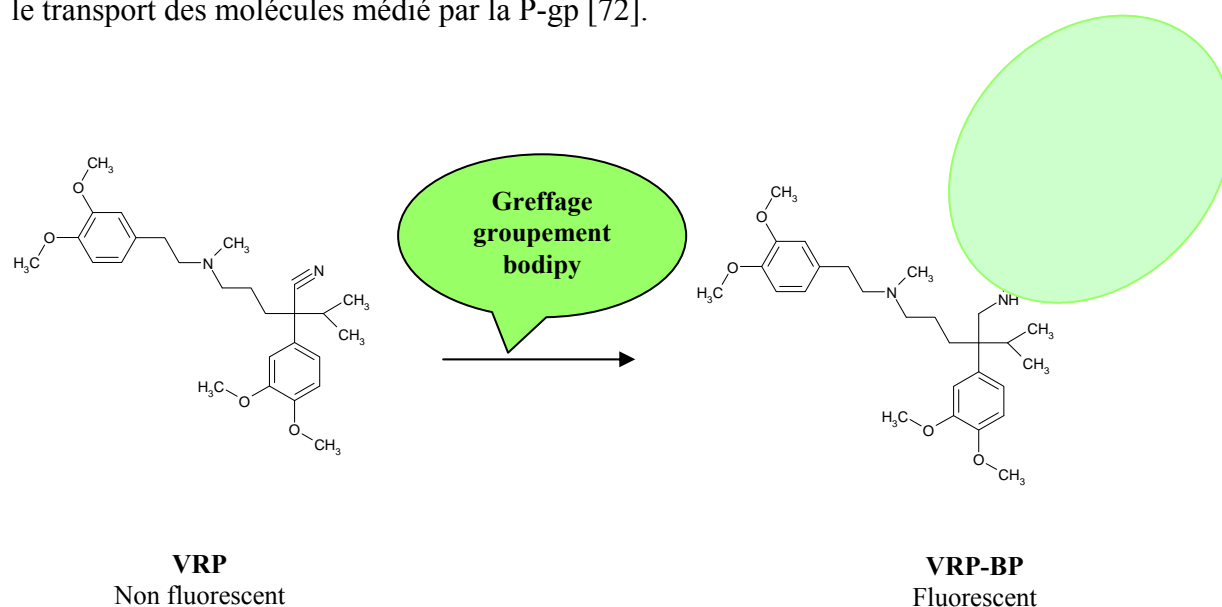
Les turn-over calculés sont de 57,5 pmoles d'HFC/min/pmoles de P450 dans les microsomes de rats traités à la dexaméthasone et de 8,8 pmoles d'HFC/min/pmoles de P450 dans les microsomes humains.

En suivant la disparition de NADH à 340 nm en spectrophotométrie (résultats non représentés), l'activité ATPasique basale de la P-gp en présence d'HFC reste stable, de plus l'HFC ne module que très peu les activités obtenues en présence de VRP ou de PRG (légère inhibition non compétitive). A l'inverse, la BFC a une action sur l'activité basale : elle est augmentée à partir d'environ 1 μ M de BFC. Les activités en présence de VRP ou PRG sont également modulées par l'ajout de BFC : une sur-activation est en effet observée dans les deux cas. Ces observations pourraient suggérer une prise en charge de la BFC par la P-gp, alors que l'HFC n'interagirait pas avec cette protéine. Cependant, ces résultats pourraient être faussés du fait d'une potentielle auto-oxydation du NADH par la BFC aux fortes concentrations. Un tel couple de molécules n'ayant pas le même comportement en fluorescence, ni vis-à-vis de la P-gp et également du P450 est intéressant à étudier. La BFC est métabolisée par le CYP3A en HFC fluorescente probablement non prise en charge par la P-gp et s'accumulant donc en partie dans la cellule (seul un transport passif pourrait exclure l'HFC de la cellule). Quant au substrat, il serait pris en charge par la P-gp et sortirait donc de la cellule. Une augmentation de l'intensité de fluorescence pourrait donc être observée à l'intérieur d'une cellule observée au microscope à épifluorescence.

3.1.3. Le vérapamil-bodipy

Le vérapamil est couplé à un fluorophore, le bodipy, groupement dont les propriétés spectrales sont identiques à celles de la fluorescéine. Le vérapamil-bodipy, dérivé fluorescent

du vérapamil, est un substrat de la P-gp dans les cellules MDR. Ce dérivé se concentre essentiellement dans les lysosomes des cellules sensibles mais subit rapidement un efflux au contact des cellules résistantes de la même lignée (fibroblastes de souris NIH3T3 ou carcinomes humains KB). Le vérapamil-bodipy semble être un excellent substrat pour étudier le transport des molécules médié par la P-gp [72].



Nous allons maintenant tenter d'extrapoler ces résultats obtenus sur des fractions subcellulaires au tissu hépatique. Pour cela, nous utiliserons dans un premier temps des coupes de foie humain conservé à -80°C.

3.2. Microscopie à épifluorescence

3.2.1. Foie humain

Le but de cette étude est d'identifier les localisations au niveau cellulaire du CYP3A et de la P-gp, et ainsi de définir les Ac qui fonctionnent le mieux sur les coupes de foie.

La mise au point de la technique a été réalisée progressivement, en testant plusieurs paramètres.

Pour des conditions d'observations optimales au microscope, nous avons décidé de fixer les échantillons avec du PFA 3% avant de les couper, pour éviter que le tissu cellulaire ne soit désorganisé. En effet, des expériences ont été menées sur des coupes de foie humain non fixé au préalable, les coupes étant placées au contact d'une goutte de PFA 3% pendant 10 minutes juste avant l'étape de saturation par la BSA (post-fixation). Les résultats ont montré des coupes désorganisées et déstructurées (Figure 29 b, d). La technique de fixation du morceau de foie par le PFA 3%, donnant des coupes de meilleure qualité par la suite, semble être la meilleure option et sera ainsi retenue pour les prochaines expériences (Figure 29 a, c).

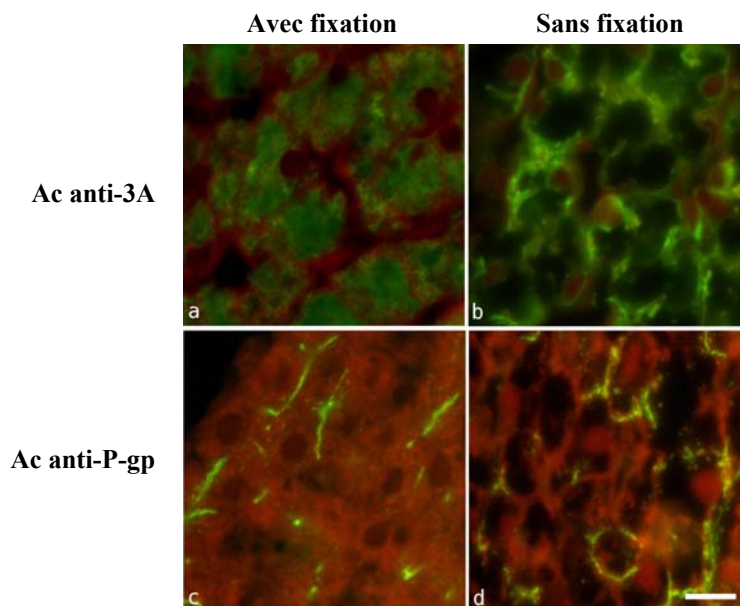


Figure 29 : Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-3A (a, b) et anti-Pgp (c, d) sur coupes de foie humain, dans deux conditions expérimentales : avec fixation par le PFA 3% (a, c) et avec post-fixation par le PFA 3% (b, d). [barre = 10 μ m]

De même, les premières expériences ont été réalisées sans traitement des lames par le SDS 1%. Les résultats étaient médiocres, aucune fluorescence significative n'était observée (Figure 30 b, d). L'idée a alors été de traiter les lames afin de dénaturer les protéines et ainsi de rendre les antigènes accessibles. Les lames ont d'abord été incubées 30 minutes dans une solution de citrate de sodium à pH 6 avant la saturation par la BSA. Une fluorescence était observée mais celle-ci n'était pas très intense. Une deuxième tentative a été de mettre la lame au contact d'une goutte de solution de SDS 1% pendant 30 secondes puis de rincer doucement dans du PBS, toujours avant l'étape de saturation par la BSA. La fluorescence obtenue sur ces coupes était nette et intense (Figure 30 a, c). En effet, le sodium dodécyl sulfate est un détergent anionique qui dénature les protéines en entraînant la suppression des structures secondaires des protéines et permet ainsi de rendre les épitopes accessibles. Les incubations ultérieures seront donc précédées d'un traitement de 30 secondes par le SDS 1%.

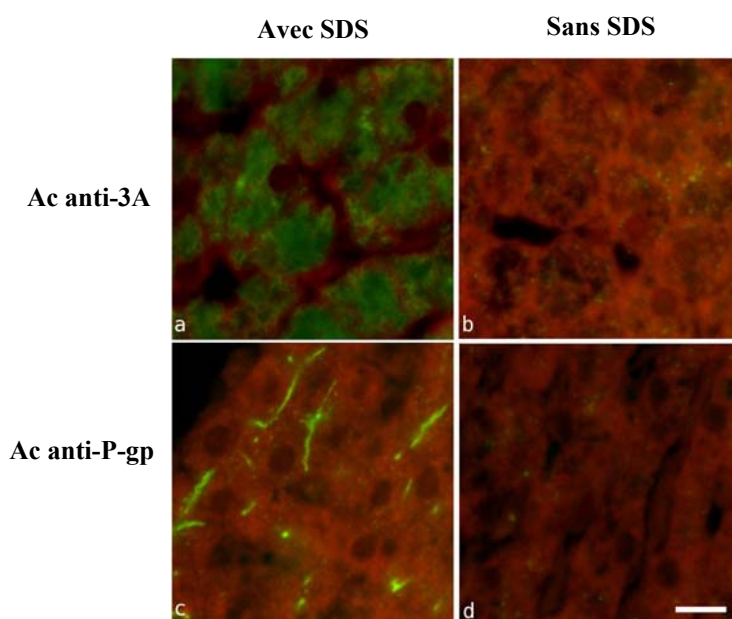


Figure 30 : Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-3A (a, b) et anti-Pgp (c, d) sur coupes de foie humain, dans deux conditions expérimentales : avec SDS (a, c) et sans SDS (b, d). [barre = 10 μ m]

La BSA mis au contact de l'échantillon permet de bloquer les sites de liaisons non spécifiques présents sur la coupe.

La coloration se fait avec le Bleu Evans qui colore les mitochondries en rouge. Le milieu de montage contient du Tris 0,4 M, du glycérol afin d'obtenir un indice de réfraction proche de celui du verre et du n-propylgallate 2% pour retarder le photoblanchiment.

Les Ac utilisés ont été choisis en fonction de leur disponibilité. En effet, ces Ac ayant un coût très élevé, nous avons décidé de tester ceux présents dans le laboratoire. Cependant, les utilisations recommandées par les fabricants pour ces Ac sont dans la plupart des cas des réactions d'immuno-inhibition ou de Western-Blot. Leur utilisation en histologie n'étant pas mentionnée, il n'était pas certain que les résultats seraient positifs, c'est pourquoi plusieurs Ac différents ont été testés. Seul l'Ac anti-P-gp C219 est recommandé pour l'immunocytochimie et les sections congelées. Cependant, un deuxième Ac dirigé contre la P-gp a été utilisé car ce dernier, l'Ac anti-P-gp/FITC, ne nécessite pas de marquage indirect par addition d'un Ac couplé à un fluorochrome et permettrait donc une utilisation simplifiée. De plus, ces Ac reconnaissent des épitopes différents. En effet, l'Ac anti-P-gp C219 reconnaît une séquence interne d'acides aminés hautement conservée (*cf.* Fiche produit Calbiochem®), alors que l'Ac anti-P-gp/FITC se lie à la surface des cellules exprimant la P-gp (*cf.* Fiche produit BD Pharmingen®).

Les dilutions des premiers Ac ont été évaluées à partir des dilutions recommandées par les fabricants pour les réactions de Western-Blot et les dilutions des deuxièmes Ac sont celles habituellement utilisées au laboratoire.

Le témoin (Figure 31 c) est une coupe de foie humain n'ayant jamais été en contact avec un anticorps. Aucune fluorescence n'est donc observée.

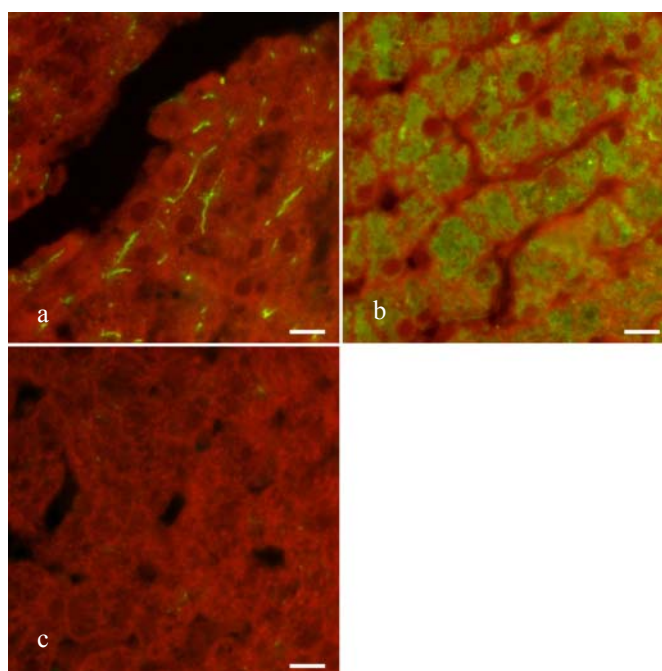


Figure 31 : Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-P-gp C219 (a) et anti-3A (b) sur des coupes de foie humain. Les images sont comparées à un témoin sans Ac (c) [barre = 10 μ m]

Avec l'Ac anti-3A (Figure 31 b), une fluorescence verte est observée au niveau intracellulaire et correspond au réticulum endoplasmique. Aucune fluorescence n'est retrouvée au niveau membranaire ou au niveau nucléaire. Des résultats identiques sont retrouvés avec l'Ac anti-3A4. La localisation du CYP3A déterminée dans notre étude est donc conforme à la littérature. En effet, le CYP3A, et les P450s en général, sont retrouvés essentiellement dans la membrane du réticulum endoplasmique [73]. Cependant, des taux significatifs de P450s sont également retrouvés à la surface de la membrane plasmique des hépatocytes. En effet, il a été démontré que plusieurs isoformes de P450s (1A2, 2C, 2D6, 2E1 et 3A4) sont présentes au niveau de la membrane plasmique d'hépatocytes de rat et que celles-ci sont fonctionnelles et inductibles [79, 80]. Les auto-anticorps anti-P450 LKM (Liver Kidney Microsome) présents chez les patients atteints d'hépatite auto-immune reconnaissent les épitopes exprimés à la surface externe de la membrane plasmique, pouvant conduire à la destruction des hépatocytes [79, 80]. Il a également été observé la présence de P450s modifiés sur la face externe de la membrane plasmique des hépatocytes. Ainsi, l'acide tiénilique, responsable d'hépatites auto-immunes, alkyle le CYP2C9. Ce complexe, en suivant la voie vésiculaire, se retrouve sur la membrane plasmique de l'hépatocyte. Les auto-anticorps retrouvés chez les patients atteints d'une hépatite auto-immune à l'acide tiénilique seront alors dirigés contre le CYP2C9 à l'état normal mais également contre les adduits acide tiénilique/CYP2C9 alkylé [113]. De même, dans le cas des hépatites auto-immunes induites par l'halothane, les adduits halothane/CYP2E1 trifluoroacétylé sont retrouvés essentiellement dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes, mais également au niveau de la membrane plasmique [31]. La localisation à la surface des hépatocytes a aussi été démontrée pour le CYP2D6 sur la face externe, où il reste fonctionnel grâce à la NADPH cytochrome P450 réductase située du côté cytosolique [81]. Il existe des Ac LKM1 qui reconnaissent ce CYP2D6 exposé sur la membrane plasmique des hépatocytes dans le cas d'hépatites auto-immunes de type 2 [94]. Cependant, le mécanisme responsable de la présence de P450s à la surface de la membrane plasmique reste inconnu.

Les échantillons incubés avec l'Ac anti-P-gp C219 présentent de minces filets de fluorescence verte (Figure 31 a). Cette localisation représente le pôle apical des hépatocytes, où se trouvent les canalicules biliaires. La P-gp n'est pas présente au niveau intracellulaire. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature. D'après Thiebaut *et al.*, dans un foie sain, la P-gp est exclusivement exprimée sur la membrane apicale des hépatocytes, au niveau des canalicules biliaires. Néanmoins, plusieurs localisations cellulaires de la P-gp ont

été démontrées [3, 84, 90, 91, 123], mais il semble que ces localisations intracellulaires n'aient jamais été observées dans des cellules saines ni dans des hépatocytes. On peut tout de même se poser des questions quant à l'absence de localisation intracellulaire au niveau d'hépatocytes sains dans notre étude d'immunolocalisation.

D'abord, les tranches de foie humain ne proviennent pas d'un tissu cancéreux mais d'un tissu sain. Il se peut que la P-gp ne soit pas en quantité assez importante dans ce tissu et soit ainsi indétectable en immunohistochimie au niveau intracellulaire. En effet, ce sont les cellules tumorales qui surexpriment la P-gp [83] et c'est à ce niveau que les localisations intracellulaires de la P-gp ont été démontrées.

Se pose également la question de l'efficacité de l'Ac utilisé. Il a en effet été démontré des variations dans la réactivité des Ac. Dans une étude de cytométrie en flux, avec le C219, le pourcentage de cellules humaines résistantes d'hépatocarcinome positives pour la P-gp était de 51% seulement alors que les autres Ac testés donnaient des taux jusqu'à 99% pour le MRK16 [71]. La différence principale entre ces deux Ac est l'épitope reconnu. Le C219 reconnaît un épitope cytoplasmique alors que le MRK16 reconnaît un épitope de surface de la P-gp et semble être plus intéressant pour la détection de faibles taux de P-gp.

Une autre question à se poser est de savoir si une localisation intracellulaire de la P-gp a déjà été démontrée en immunocytochimie avec cet Ac anti-P-gp C219. Grâce à cette technique, une équipe a établie la présence de la P-gp dans la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire de cellules de la microglie de rats [70], et dans la membrane plasmique, les cavéoles et l'enveloppe nucléaire d'astrocytes de rats [114]. Cependant, plusieurs techniques sont en général employées simultanément pour localiser la P-gp au niveau intracellulaire. En voici quelques exemples : expression d'ARNm par RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction), Western-Blot, cytométrie en flux, microscopie en immunofluorescence et électronique... Les Ac utilisés sont divers et réagissent avec un épitope externe de surface (MRK16, UIC2, 4E3...) ou interne cytoplasmique (C219, C494, JSB-1...). Les expériences se font le plus souvent sur des cultures cellulaires *in vitro* et plus rarement sur des coupes d'organes.

Des études testant l'Ac anti-Pgp C219 au niveau des cellules hépatiques ont été réalisées et indiquent toutes que la P-gp se trouvent au pôle biliaire des hépatocytes. Ces résultats ont été démontrés au niveau de carcinomes hépato-cellulaires [100] mais également au niveau de coupes de foie sain [17].

L'Ac anti-P-gp conjugué directement au FITC ne fonctionne pas (photographie non représentée), aucune fluorescence n'est retrouvée sur les coupes de foie humain. Cet Ac, habituellement utilisé pour du Western-Blot, n'est probablement pas à une concentration suffisante pour être détecté au microscope à épifluorescence.

3.2.2. Foie de rat

Le choix de passer du foie humain au foie de rat repose sur des problèmes pratiques et éthiques. En effet, il est beaucoup plus simple d'obtenir des foies de rat, mais également plus éthique. De plus, le foie de rat dans notre expérience est un tissu frais, alors que le foie humain que nous possédions était congelé, ce qui peut donc poser des problèmes d'activité métabolique.

Le but de cette étude est de déterminer, sur coupes de foie de rat, la localisation au niveau des cellules hépatiques du CYP3A et de la P-gp, et également de la RESO, et d'observer s'il existe une co-localisation entre ces enzymes et cette molécule. La BZR et l'ETR, molécules peu fluorescentes, sont transformées par le P450 en RESO fluorescente. Il serait donc intéressant d'observer une métabolisation de ces substrats au cours du temps, se manifestant par une augmentation de la fluorescence à l'intérieur des cellules.

Les rats sont traités par la dexaméthasone pendant 3 jours consécutifs afin d'induire les P450s de la famille 3A, les plus abondants dans le foie humain. En effet, ce glucocorticoïde est connu depuis longtemps pour être un fort inducteur des P450s de la famille 3 [120].

3.2.2.1. Localisation du CYP3A et de la P-gp par immunolocalisation sur les échantillons non traités ou traités par différents substrats

La première manipulation effectuée est de tester les Ac utilisés précédemment sur des coupes de foie humain pour vérifier qu'ils donnent les mêmes résultats sur les coupes de foie de rat. En effet, les Ac utilisés sont des Ac anti-humain. Il est donc nécessaire de vérifier qu'il

y ait une réaction croisée entre les deux espèces. Un Ac anti-3A2, Ac anti-rat, est également testé.

La première expérience se fait sur des coupes de foie obtenues à partir du foie des rats ayant reçu ou non des injections de dexaméthasone, qui dans tous les cas n'ont pas subi de traitement par la RESO, la BZR ou l'ETR mais qui ont été fixées immédiatement dans le PFA 3%.

Le témoin, n'ayant pas reçu d'Ac, ne présente aucune fluorescence.

Une fluorescence verte intracellulaire au niveau du réticulum endoplasmique est observée avec les Ac anti-3A, anti-3A2 et anti-3A4, avec une intensité plus faible pour ce dernier. Sur les coupes de foie provenant de rats traités au préalable à la dexaméthasone, les fluorescences sont nettement plus intenses que celles obtenues avec les foies de rats contrôles (Figure 32 a, b). La dexaméthasone induit donc le CYP3A, ce qui est en accord avec la bibliographie [26, 120]. L'Ac utilisé ultérieurement sur des coupes de foie de rat sera l'Ac anti-3A2, car cet Ac donne une bonne intensité en fluorescence.

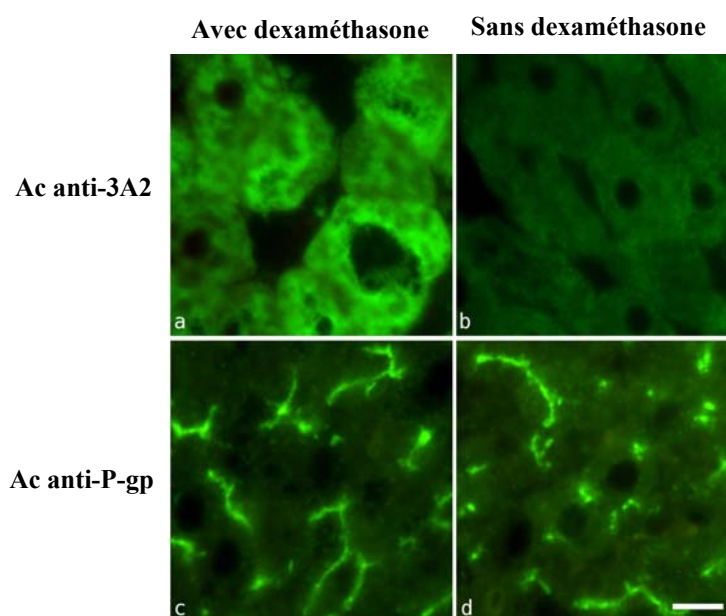


Figure 32 : Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-3A2 (a, b) et anti-Pgp (c, d) sur coupes de foie de rat, dans deux conditions expérimentales : rats traités à la dexaméthasone (a, c) et rats témoins non traités à la dexaméthasone (b, d). [barre = 10 μ m]

La fluorescence due à l'Ac anti-P-gp C219 est retrouvée au niveau apical des hépatocytes c'est-à-dire au niveau des canalicules biliaires, chez les rats traités ou non par la

dexaméthasone (Figure 32 c, d). La dexaméthasone ne semble donc pas induire la P-gp dans notre expérience, puisque les intensités de fluorescence sont identiques sur les coupes de rats traités ou non par ce glucocorticoïde. Dans la littérature, des résultats contradictoires sont observés à ce sujet, grâce à la technique du Western-Blot. Selon une équipe, la dexaméthasone augmente rapidement l'expression de la P-gp dans le foie de rat traité pendant 4 jours consécutifs [23]. Dans une autre étude, des différences sont observées entre les sexes. En effet, la dexaméthasone augmente l'expression de la P-gp d'un facteur 5 chez le rat mâle, alors que chez le rat femelle, l'expression est réduite de 60% [116]. Enfin, certaines études montrent une absence de surexpression de la P-gp dans le foie après traitement par la dexaméthasone [86, 140].

Dans le but d'observer simultanément la fluorescence verte des Ac et la fluorescence rouge des composés, une seconde expérience est réalisée en incubant l'Ac anti-P-gp C219 ou l'Ac anti-3A2 avec des coupes de foies de rats traités à la dexaméthasone, n'ayant reçu aucun substrat ou bien incubés pendant 60 minutes avec RESO, BZR ou ETR.

Les fluorescences vertes des Ac sur les coupes traitées par les différents composés sont bien les mêmes que sur les échantillons non traités. Le CYP3A est localisé au niveau du réticulum endoplasmique alors que la P-gp n'est retrouvée qu'au pôle apical des hépatocytes (Figure 33).

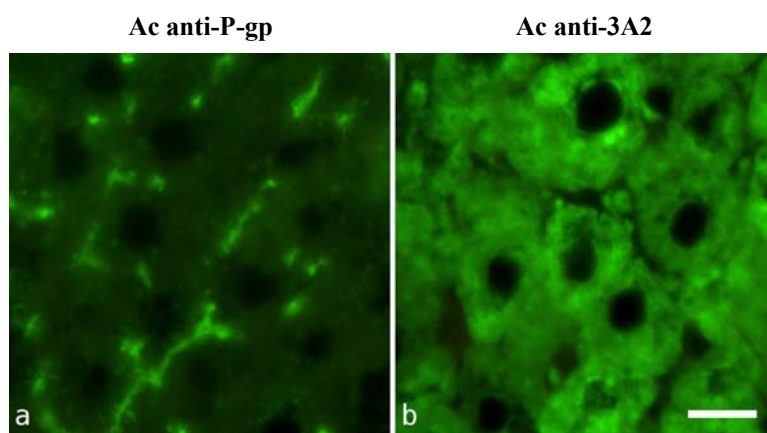


Figure 33: Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-Pgp (a) et anti-3A2 (b) sur coupes de foie de rat (traité à la dexaméthasone) incubé pendant 60 minutes avec la BZR. [barre = 10 µm]

3.2.2.2. Localisation des substrats et métabolites par observation de la fluorescence sur les échantillons traités pendant 30 ou 60 minutes

La seconde étape consiste à observer les fluorescences, avec ou sans incubations avec des anticorps, ni colorations, sur les coupes de foies de rats (traités à la dexaméthasone) n'ayant reçu aucun substrat ou bien incubés pendant 30 ou 60 minutes avec RESO, BZR ou ETR (Figure 34).

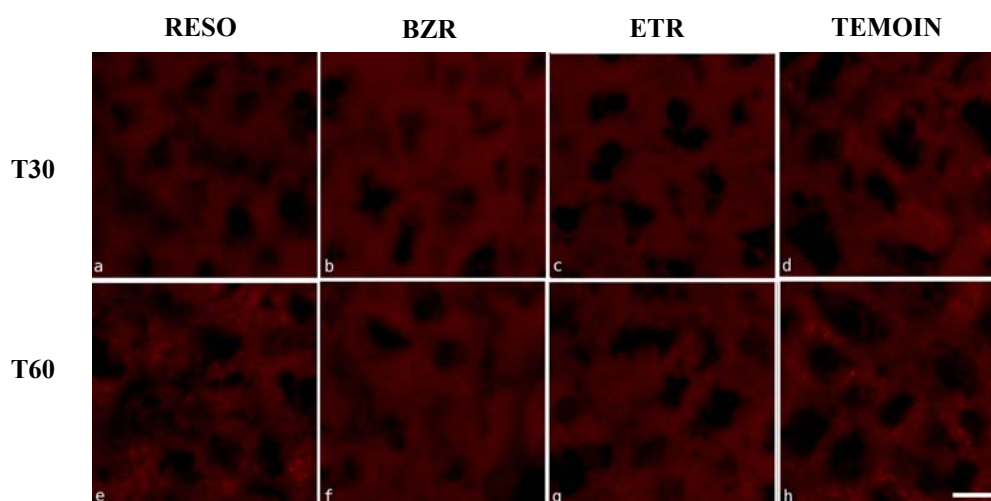


Figure 34 : Fluorescence des coupes de foie de rat (traité à la dexaméthasone) incubé pendant 30 (a, b, c, d) ou 60 minutes (e,f,g,h) avec RESO (a, e), BZR (b, f), ETR (c, g) ou non incubé (d, h). [barre = 10 μ m]

Une mesure de la fluorescence du surnageant au fluorimètre nous montre que la BZR et l'ETR sont métabolisés en RESO (résultats non représentés).

Cependant, les fluorescences observées sur ces coupes sont très diffuses, ne permettant pas de localiser précisément les composés au niveau cellulaire. De plus, les intensités de fluorescence sont très variables selon l'échantillon observé et au sein d'une même coupe. La fluorescence de la RESO semble trop faible pour être décelable.

La fluorescence du métabolite, la RESO, n'est donc pas spécifiquement déterminée. De plus, il est impossible de conclure à une distribution de la RESO ou x-Rés semblable à celle de la P-gp ou du CYP3A et l'évolution de la fluorescence au cours du temps n'a pu être appréciée.

Il se pourrait que la RESO ne soit pas immobilisée sur la lame et se déplace pendant l'incubation. En effet, on ne connaît pas les effets éventuels du fixateur, le PFA, sur un tel composé.

Cette série d'expériences réalisée sur des morceaux de foies prélevés chez des rats traités ou non à la dexaméthasone puis incubés avec des substrats du CYP3A pendant 30 ou 60 minutes, et éventuellement avec les Ac anti-P-gp ou anti-CYP3A, ne permet donc pas de déterminer s'il existe une co-localisation entre le CYP3A, la P-gp et ces molécules dans les hépatocytes de rat, ni d'observer une métabolisation de ces substrats.

A ce stade, la décision de travailler sur des hépatocytes de rat est alors prise.

3.2.3. Hépatocytes de rat

Le but de travailler sur des cellules hépatiques de rat est de détecter une augmentation de fluorescence au niveau des cellules en culture après ajout d'un substrat non fluorescent, connu pour être transformé en métabolite fluorescent par le P450, sur une cinétique de 30 minutes. Cette détection de modification de fluorescence au microscope serait la preuve d'une métabolisation du substrat par le P450, et permettrait de localiser le substrat et/ou le métabolite à l'intérieur de la cellule.

Pour cela, nous avons décidé de travailler dans un premier temps sur des hépatocytes de rat commercialisés congelés, puis, à la suite de plusieurs échecs inexplicables, nous avons choisi d'isoler des hépatocytes directement à partir du foie de rat par une technique de perfusion en deux étapes (*cf* Page 67). Nous avons malheureusement rencontré également de nombreux problèmes dans l'isolement puis la mise en culture d'hépatocytes.

Néanmoins, nous avons tout de même pu isoler des hépatocytes lors de quelques expériences. La viabilité et la concentration cellulaire sont déterminées et varient respectivement de 65 à 75% et de 5 à 8 millions de cellules vivantes par millilitre soit 100 à 160 millions de cellules vivantes selon l'échantillon. Après 24 heures à +4°C, le nombre de cellules vivantes diminuent d'environ 50%. La durée de viabilité des hépatocytes en suspension est en effet courte [52].

Un essai en fluorimétrie est pratiqué sur ces cellules afin de déterminer l'activité métabolique du CYP3A. Le principe de cette méthode est d'observer une modification de fluorescence. Pour cela, le substrat et le métabolite ne doivent pas avoir la même fluorescence. Une augmentation de l'intensité de fluorescence sera observée lorsque le

métabolite sera fluorescent. Dans le cas présent, on cherche à démontrer que la BZR et l'ETR sont métabolisés dans notre échantillon cellulaire en RESO, molécule fluorescente.

Les résultats de cette expérience (non représentés) indiquent que, dans les hépatocytes de rat isolés, la BZR est métabolisée en RESO, alors que la métabolisation de l'ETR est beaucoup plus faible. La BZR est mieux métabolisée aux faibles concentrations cellulaires. Il semble qu'il y ait un « quenching » de fluorescence aux fortes concentrations cellulaires. Les hépatocytes isolés en suspension possèdent donc une activité métabolique leur permettant de métaboliser des composés tels que la BZR. Ceci est donc la preuve de la présence de CYP3A actif dans les cellules obtenues.

Cependant, la mise en culture des cellules en suspension a échoué. Les hépatocytes n'ont pas adhéré et nous n'en connaissons pas les raisons.

Nous décidons alors de travailler sur un autre type cellulaire.

3.2.4. Fibroblastes de Hamster Chinois D/ADX

Après les divers échecs obtenus lors de la culture d'hépatocytes, nous décidons de mettre en culture des fibroblastes de poumons de Hamster Chinois résistants surexprimant la P-glycoprotéine (*cf* Page 74).

Des fibroblastes pulmonaires de Hamster chinois transformés spontanément, c'est-à-dire dont les cultures primaires donnent des cellules filles immortelles par mutations spontanées, sont utilisés. Deux lignées sont disponibles : une lignée sensible DC-3F et une lignée résistante DC-3F/ADX (ou D/ADX). La lignée résistante est obtenue à partir des cellules parentales DC-3F par sélection progressive en présence d'actinomycine D : les clones cellulaires survivant à des concentrations croissantes de cette molécule cytotoxique (jusqu'à 10 µg/mL) établissent la lignée résistante stable DC-3F/ADX. Cette lignée est connue pour surexprimer le gène codant pour la P-gp, conférant ainsi aux cellules le phénotype MDR [9, 10, 24]. La haute résistance de ces cellules correspond à un haut niveau de surexpression de la P-gp dans la membrane plasmique [41]. Des études de détection immunologique en Western-Blot montrent que la P-gp représente environ 15% des protéines membranaires totales dans les cellules résistantes. Elle constitue la seule protéine aussi nettement surexprimée mais est en revanche indétectable dans les cellules sensibles.

S'il pouvait être déterminé que la P-gp est fonctionnelle au niveau de la membrane plasmique et/ou des membranes internes grâce à cette technique, le VRP-BP serait un témoin

positif de substrat de transport. Nous pourrions alors effectuer la même technique avec la résorufine et ses dérivés, qui, s'ils se comportaient de façon identique au VRP-BP, seraient alors eux aussi des substrats de transport de la P-gp.

3.2.4.1. Immunolocalisation du CYP3A et de la P-gp au sein des fibroblastes D/ADX

La localisation de la P-gp et du CYP3A au niveau des fibroblastes de hamster chinois D/ADX a été observée en microscopie à épifluorescence et en microscopie confocale (cette dernière méthode ne sera pas expliquée dans cette thèse). Le témoin de cette expérience, c'est-à-dire des cellules n'ayant pas subi de traitement par les anticorps, ne présente aucune fluorescence (Figure 35 c).

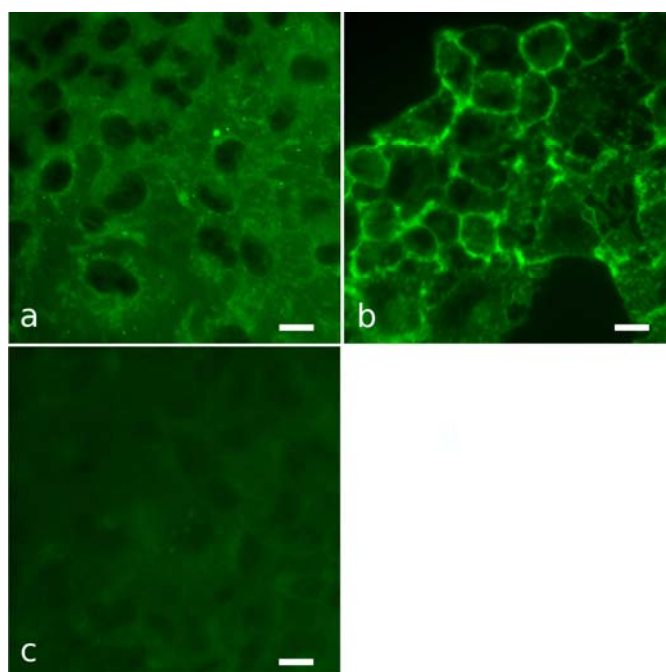


Figure 35 : Fluorescences obtenues après incubation des Ac anti-3A (a) et anti-P-gp C219 (b) avec des fibroblastes pulmonaires de Hamster Chinois D/ADX observées par microscopie en épifluorescence. Les images sont comparées à un témoin sans Ac (c). [barre = 10 μ m]

La microscopie à épifluorescence et la microscopie confocale permettent d'observer un marquage continu intense des membranes plasmiques lors de l'utilisation de l'Ac anti-P-gp et aucun marquage n'est noté au niveau intracellulaire. La P-gp se localise donc exclusivement et en quantité importante au niveau de la membrane plasmique des fibroblastes

pulmonaires de Hamster Chinois D/ADX (Figure 35 b), conformément aux données retrouvées dans la littérature.

Le CYP3A semble être présent en très faible quantité dans les fibroblastes au niveau du réticulum endoplasmique, puisqu'une très faible fluorescence verte intracellulaire est observée après incubation des cellules avec l'Ac anti-3A (Figure 35 a). Aucune publication ne semble être en faveur d'une présence de CYP3A dans les fibroblastes de Hamster Chinois D/ADX. Cependant, le nombre de publications portant sur ces cellules spécifiques reste limité et la présence du CYP3A dans ces cellules n'a peut-être jamais fait l'objet d'investigations. De plus, les lignées cellulaires de fibroblastes pulmonaires de Hamster Chinois V79, proches des lignées D/ADX, ne semblent pas exprimer les P450s. Elles peuvent en revanche être utilisées pour exprimer les P450s après transfection des ADN complémentaires de différents P450s, permettant ainsi l'étude *in vitro* du métabolisme des composés cytotoxiques [109].

3.2.4.2. Incubation des cellules D/ADX avec le vérapamil-bodipy (VRP-BP)

Les différentes expériences réalisées avec les fibroblastes de Hamster chinois D/ADX surexprimant la P-gp sont détaillées dans les pages 83 à 85 et résumées dans le tableau XIV.

Les protocoles effectués entre lame et lamelle sont des méthodes dans lesquelles aucune cinétique ne peut être évaluée. En effet, les premières observations effectuées à l'aide du microscope à épifluorescence se font au minimum 6 minutes après le début de la manipulation, temps nécessaire à la préparation de l'échantillon en vue de son observation au microscope. Or, nous pourrions constater plus loin que les modifications de fluorescence se font très rapidement. Les protocoles d'accumulation entre lame et lamelle devraient permettre de déterminer la pénétration du substrat dans la cellule ainsi que la localisation de celui-ci lors d'un contact permanent des cellules avec le substrat. Les protocoles d'efflux entre lame et lamelle, dans lesquelles les cellules, après incubation avec le substrat pendant 10 minutes, ne sont plus au contact de celui-ci, devraient permettre de déterminer si le substrat sort de la cellule et à quel endroit se localise le substrat restant dans la cellule.

Les protocoles d'accumulation et d'efflux dans les boîtes de Pétri sont des méthodes permettant d'apprécier la pénétration, la localisation et l'efflux du substrat en fonction du temps. La cinétique d'accumulation et d'efflux peut ainsi être quantifiée.

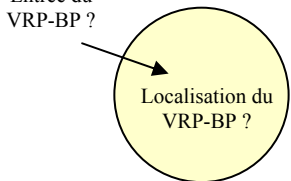
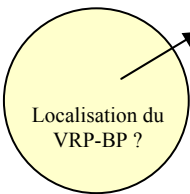
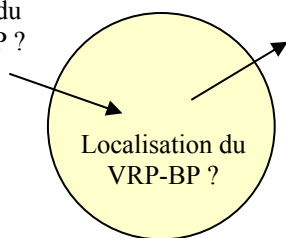
Schéma d'un fibroblaste D/ADX	N°	Protocole
Protocoles d'accumulation entre lame et lamelle		
 <p>Entrée du VRP-BP ?</p> <p>Localisation du VRP-BP ?</p>	1	VRP-BP 1 μ M
	2	VRP-BP 100 nM
	3	PBS
Protocoles d'efflux entre lame et lamelle		
 <p>Sortie du VRP-BP ?</p> <p>Localisation du VRP-BP ?</p> <p>Avec ou sans compétiteurs des systèmes de transport</p>	4	1/ VRP-BP 1 μ M 2/ PBS
	5	1/ VRP-BP 1 μ M + azoture 10 mM 2/ PBS
	6	1/ VRP-BP 1 μ M + VRP 30 μ M 2/ VRP 30 μ M
	7	1/ VRP-BP 1 μ M + VRP 30 μ M 2/ PBS
	8	1/ VRP-BP 100 nM + VRP 30 μ M 2/ VRP 30 μ M
Protocoles d'accumulation et d'efflux dans les boîtes de Pétri		
 <p>Entrée du VRP-BP ?</p> <p>Sortie du VRP-BP ?</p> <p>Localisation du VRP-BP ?</p> <p>Avec ou sans compétiteurs des systèmes de transport + Quantification de la fluorescence</p>	9	1/ VRP-BP 1 μ M 2/ PBS
	10	1/ VRP-BP 1 μ M + VRP 30 μ M 2/ VRP 30 μ M
	11	1/ VRP-BP 1 μ M + VRP 30 μ M 2/ PBS
	12	1/ VRP-BP 1 μ M + azoture 10 mM 2/ PBS
	13	1/ VRP-BP 1 μ M + azoture 5 mM 2/ azoture 5 mM
	14	1/ VRP-BP 1 μ M + CsA 1 μ M 2/ CsA 1 μ M
	15	1/ VRP-BP 1 μ M + VBL 10 μ M 2/ VBL 10 μ M

Tableau XIV : Protocoles d'accumulation et/ou d'efflux réalisés par incubation du VRP-BP avec des fibroblastes de Hamster chinois D/ADX surexprimant la P-gp

Abréviations : CsA : ciclosporine A ; PBS : phosphate buffer saline ; VBL : vinblastine ; VRP : vérapamil ; VRP-BP : vérapamil bodipy ; 1/ : composition du milieu pendant la première phase de l'expérience ; 2/ : composition du milieu après aspiration du premier milieu

La phase dite d'accumulation devrait entraîner l'observation d'une fluorescence intracellulaire due à l'accumulation de VRP-BP mis au contact permanent des cellules. Ensuite, après un lavage et disparition du VRP-BP dans le milieu, on peut s'attendre à observer une diminution de l'intensité de fluorescence dans les cellules MDR D/ADX par rapport à celle observée à la fin de la phase d'accumulation. Ce phénomène pourrait être la conséquence du fonctionnement de la P-gp qui prendrait en charge le VRP-BP fluorescent pour l'expulser hors de la cellule.

De plus, l'ajout de modulateurs de la P-gp dans le milieu (vérapamil, vinblastine, ciclosporine A ou azoture de sodium) devrait entraîner une diminution de l'efflux par inhibition de la P-gp, d'où une plus faible diminution de l'intensité de fluorescence que la même expérience sans modulateur de la P-gp.

3.2.4.2.1. Protocoles d'« accumulation » entre lame et lamelle

œ Pénétration et accumulation intracellulaire du VRP-BP (protocole 1)

L'incubation de 1 μ M de VRP-BP en présence de glucose entraîne une fluorescence verte intense intracellulaire, semblant marquer le réticulum endoplasmique. Le VRP-BP a donc pénétré dans la cellule. Aucune fluorescence n'est retrouvée au niveau de la membrane plasmique (Figure 36 b). Il se peut que le VRP-BP, n'étant pas suffisamment hydrophobe, ne partitionne pas sur la membrane plasmique, ni sur les membranes internes. Nous pouvons donc suggérer que le VRP-BP se trouve dans la lumière du réticulum endoplasmique et non dans la membrane de celui-ci. Mais il peut également se produire un « quenching » de fluorescence au niveau membranaire, dû à la présence simultanée d'une concentration locale importante de protéines et de VRP-BP. Il serait intéressant de connaître les différents mécanismes à l'origine de l'entrée du VRP-BP dans la cellule puis de son accumulation dans le réticulum endoplasmique.

œ Pénétration et accumulation intracellulaire du VRP-BP à faible concentration (protocole 2)

L'incubation de VRP-BP à une concentration plus faible (100 nM) et dans les mêmes conditions que précédemment montre une fluorescence intracellulaire de même localisation mais de plus faible intensité que celle obtenue avec 1 μ M de VRP-BP, témoignant de l'existence d'une relation dose-réponse (Figure 36 a).

œ Témoin de fluorescence (protocole 3)

Le témoin de cette expérience, c'est-à-dire l'incubation de 1 mM de glucose dilué dans du PBS, permettant d'évaluer le « bruit de fond », montre une autofluorescence très faible qui ne devrait donc pas interférer avec la fluorescence du VRP-BP au sein de la cellule (Figure 36 c).

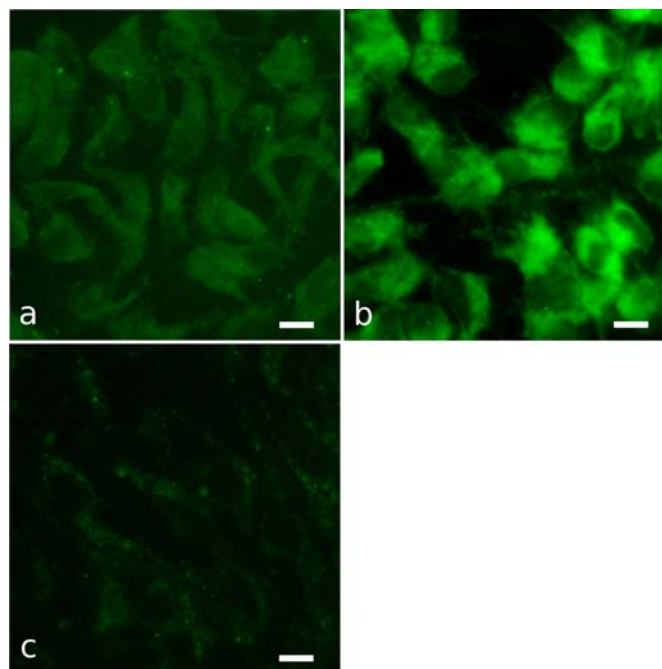


Figure 36 : Fluorescence de fibroblastes pulmonaires de Hamster Chinois D/ADX incubés pendant 18 minutes avec le vérapamil-bodipy 100 nM (a) ou 1 μ M (b) en présence de glucose 1 mM, ou incubés avec du glucose 1 mM uniquement (c). Afin de permettre une meilleure observation des images, les intensités de fluorescence des images a et c ont été multipliées par 5 par rapport à l'image b. [barre = 10 μ m]

3.2.4.2.2. Protocoles d'« efflux » entre lame et lamelle

œ Efflux du VRP-BP (protocole 4)

L'incubation de 1 μ M de VRP-BP en présence de glucose pendant 10 minutes, suivie d'un lavage par le PBS puis d'un montage entre lame et lamelle en présence de glucose uniquement, entraîne l'apparition d'une fluorescence verte intracellulaire correspondant au réticulum endoplasmique. L'intensité de fluorescence observée est plus faible que celle obtenue en suivant le protocole d'accumulation avec 1 μ M de VRP-BP (protocole 1). Ainsi, dès la première observation suivant le lavage (6 minutes, temps nécessaire au montage de la lamelle et au séchage du vernis utilisé pour fixer la lamelle sur la lame), le VRP-BP est sorti hors du réticulum endoplasmique puis hors de la cellule. La même manipulation effectuée sur cellules sensibles DC-3F ne surexprimant pas la P-gp permettrait de déterminer si la P-gp est responsable de cet efflux. Lelong *et al.* [72] ont montré que le VRP-BP ne s'accumule pas dans les fibroblastes MDR de souris NIH3T3 (dérivant des cellules sensibles NIH3T3 par sélection en présence de 1 μ g/mL de colchicine après transfection d'ADN complémentaire de

MDR1) après incubation des cellules en présence de 1 μ M de VRP-BP pendant 20 minutes. Le VRP-BP est probablement rejeté hors de la cellule par la P-gp surexprimée. A l'inverse, le VRP-BP se concentre dans les lysosomes des cellules sensibles. L'ajout du groupement bodipy au vérapamil ne semble donc pas empêcher l'efflux de celui-ci par les cellules MDR.

œ Efflux du VRP-BP en présence d'un inhibiteur de transport actif (protocole 5)

La fluorescence obtenue après incubation de 1 μ M de VRP-BP avec 10 mM d'azoture de sodium pendant 10 minutes présente la même localisation intracellulaire que précédemment. L'intensité de fluorescence semble plus importante que celle obtenue avec le protocole d'efflux avec 1 μ M de VRP-BP (protocole 4) et moins importante que celle obtenue avec le protocole d'accumulation avec 1 μ M de VRP-BP (protocole 1). Cependant, ces différences d'intensité sont difficiles à évaluer à l'œil nu du fait d'une grande hétérogénéité de fluorescence. Il paraîtrait normal de s'attendre, lors d'une telle expérience, à observer des cellules fortement marquées. En effet, l'azoture de sodium étant un inhibiteur des pompes H^+ ATPases d'origine mitochondriale, donc de la synthèse d'ATP, la P-gp ne fonctionne pas au maximum de sa capacité et l'efflux, s'il est dû à une protéine de transport actif ATP-dépendant, est donc diminué.

œ Efflux du VRP-BP en présence d'un inhibiteur de la P-gp

a) 1 μ M de VRP-BP (protocoles 6 et 7)

La fluorescence obtenue avec l'ajout de 30 μ M de vérapamil (VRP) placé en continu dans le milieu (pendant l'incubation, le lavage et le montage) (protocole 6) semble être d'intensité intermédiaire entre le protocole d'efflux et le protocole d'accumulation réalisés avec le VRP-BP seul (protocoles 4 et 1). De plus, des points fluorescents intracytoplasmiques peuvent être localisés dans certaines cellules, faisant penser à un marquage des lysosomes.

L'ajout de VRP uniquement lors de l'incubation (protocole 7) conduit à une fluorescence de localisation et d'intensité semblables à celle obtenue avec le VRP présent en continu dans le milieu (protocole 6). Des grains intracytoplasmiques sont également présents,

cependant leur intensité de fluorescence est difficilement comparable à celle obtenue précédemment.

L'intensité de fluorescence intracellulaire moins importante que celle obtenue avec le protocole d'accumulation montre qu'il existe un efflux, et que cet efflux est ralenti, probablement par la présence de VRP (fluorescence plus intense que celle observée avec le protocole d'efflux du VRP-BP seul). Les observations se faisant aux mêmes temps, l'efflux paraît rapide pour une petite quantité de VRP (1 μ M de VRP-BP, protocole 4), alors qu'il est ralenti en présence d'une quantité de VRP plus importante (1 μ M de VRP-BP et 30 μ M de VRP, protocole 7). Un transport actif semble donc être mis en jeu dans ces expériences. L'implication de la P-gp dans ce type de transport ne peut pas être affirmée dans ces circonstances. L'utilisation de fibroblastes sensibles DC-3F pauvres en P-gp permettrait une conclusion plus fine.

Concernant les grains intracytoplasmiques fluorescents semblant marquer les lysosomes, il se peut que le VRP présent dans la cellule bloque la P-gp. Ainsi, le VRP-BP ne peut plus sortir de la cellule et a tendance à s'accumuler dans les lysosomes. En effet, Lelong *et al.* [72] ont démontré que l'incubation des cellules MDR en présence de 1 μ M de VRP-BP et de 10 μ M de VRP entraîne une fluorescence des lysosomes, suggérant un blocage de la P-gp par l'excès de VRP, le VRP-BP restant ainsi dans le cytosol. Le même phénomène est observé au niveau des lysosomes lorsqu'1 μ M de VRP-BP et 10 μ M de vinblastine (VBL) sont incubés simultanément avec les cellules MDR. De plus, il apparaît que le VRP-BP, contrairement au VRP seul, n'a que peu ou pas de capacité à réverser la résistance à la vinblastine ou à la colchicine dans les cellules MDR. Cette différence pourrait être due à une modification de la spécificité de substrat de la P-gp, les cellules résistantes étant transfectées avec un ADN complémentaire porteur d'une mutation. Le VRP-BP, du fait de son encombrement stérique, pourrait avoir une affinité plus faible que le VRP pour le site de liaison sur la P-gp.

b) 100 nM de VRP-BP (protocole 8)

L'incubation d'une faible concentration de VRP-BP (100 nM) et de VRP en continu dans le milieu entraîne des effets identiques à ceux observés après incubation d'une plus forte concentration de VRP-BP (1 μ M) et de VRP (protocole 6), l'intensité de fluorescence étant plus faible, démontrant la relation dose-réponse vue précédemment (entre les protocoles 1 et 2).

3.2.4.2.3. Incubations dans les boîtes de Pétri

La décision de réaliser le même type d'expérience que précédemment directement sur des cellules D/ADX adhérentes au fond d'une boîte de culture est prise afin d'observer les événements se produisant à des temps précoces. De plus, la phase d'accumulation du produit, mais également la phase d'efflux, peuvent être suivies au microscope. La cinétique peut également être appréciée. Ces résultats pourront alors être reportés sur une courbe représentant l'intensité de fluorescence de l'échantillon en fonction du temps. En effet, un logiciel, créé par Jean-Marc VERBAVATZ (CEA Saclay), permettant de quantifier les fluorescences à partir de photographies obtenues lors de l'observation au microscope à épifluorescence, a été utilisé pour les méthodes n°9, 10 et 11. Une moyenne des intensités de fluorescence a été obtenue sur un nombre déterminé de points les plus fluorescents (arbitrairement, le nombre de 40000 points est choisi) sur chaque photographie obtenue à des temps différents pour les trois expériences. Un graphique représentant les moyennes d'intensité de fluorescence (sur les 40000 points les plus fluorescents) en fonction du temps peut donc être tracé pour chaque expérience.

œ *Accumulation et efflux du VRP-BP (protocole 9) (Figure 37)*

L'incubation des cellules adhérentes au fond d'une boîte de Pétri avec 1 μ M de VRP-BP en présence de glucose pendant 10 minutes, suivi d'un lavage par une solution glucosée, permet d'observer un marquage intracellulaire au niveau du réticulum endoplasmique. Pendant la période d'accumulation, l'intensité de la fluorescence intracellulaire augmente rapidement, dès les premières secondes, puis se stabilise au bout de 1 à 2 minutes environ. Le VRP-BP, après passage de la membrane plasmique, s'accumule rapidement au niveau du réticulum endoplasmique. Après lavage, l'intensité de fluorescence diminue rapidement puis progressivement de façon continue dans le temps jusqu'à la fin de la période d'observation (environ 20 minutes). Lorsque le VRP-BP n'est plus au contact des cellules, le VRP-BP accumulé au préalable dans le réticulum endoplasmique subit un efflux hors de cet organe intracellulaire puis hors de la cellule. Ce protocole a permis d'évaluer en une fois les trois étapes suivantes : pénétration du substrat dans la cellule, accumulation puis efflux, alors que deux expériences distinctes entre lame et lamelle étaient nécessaires.

La moyenne d'intensité de fluorescence atteinte à la fin de l'expérience est inférieure à celle observée au début, c'est-à-dire environ 15 secondes après l'ajout du produit. En effet, l'intensité de fluorescence obtenue lors de la phase d'efflux se stabilise vers 4000 à 6000 unités arbitraires d'intensité de fluorescence. Il persiste donc une fluorescence résiduelle, pouvant refléter la fluorescence intrinsèque de l'échantillon cellulaire (fluorescence détectée sans ajout de substrat) ou bien représentant la liaison du VRP-BP sur des cibles intracellulaires.

Des grains fluorescents intracytoplasmiques sont observés dans un nombre restreint de cellules. Ces cellules présentent probablement des difficultés à expulser le substrat, le VRP-BP restant s'accumule donc dans les lysosomes.

œ Accumulation et efflux du VRP-BP en présence d'un inhibiteur de la P-gp (protocoles 10 et 11) (Figure 37)

Lorsque le milieu de lavage, après incubation de VRP-BP et VRP, est une solution glucosée (protocole 10), le même type de cinétique et de marquage qu'avec le VRP-BP seul est observé (protocole 9). Les intensités de fluorescence lors de l'accumulation et de l'efflux sont du même ordre de grandeur que celles déterminées après incubation du VRP-BP seul (protocole 9). De même que lors de cette dernière expérience, le lavage entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence d'un facteur deux. Les temps de demi-vie d'élimination du composé fluorescent sont approximativement de 1 et 3 minutes pour les méthodes sans (protocole 9) et avec (protocole 11) le VRP pendant la phase d'accumulation. L'efflux semble donc être ralenti par le VRP.

L'ajout du VRP pendant toute la durée de l'expérience (lors de l'incubation et du lavage) (protocole 10) montre le même type de cinétique et de marquage que lors des deux méthodes précédentes, c'est-à-dire avec le VRP-BP seul (protocole 9) ou avec le VRP présent uniquement lors de la phase d'accumulation (protocole 11). Cependant, l'intensité de fluorescence obtenue lors de la période d'accumulation est environ deux fois plus intense. Pourtant, lors des deux expériences avec le VRP, le milieu est exactement identique et contient 1 μ M de VRP-BP et 30 μ M de VRP dans du PBS. Ceci peut être expliqué par une grande hétérogénéité de fluorescence selon les champs observés. L'observation des résultats de l'expérience impliquant le VRP en continu dans le milieu a probablement été effectué au

niveau d'une zone très fluorescente de la boîte de Pétri. En effet, après les différentes mises au point du microscope, la cinétique est suivie dès les premières secondes après l'ajout du substrat en restant focalisé sur un seul champ. Il est donc impossible de prédire si cette zone va bien fluorescer ou non. A la fin de la période d'observation (environ 30 minutes après le lavage), l'intensité de fluorescence est trois à quatre fois plus faible que celle observée juste après le lavage mais est semblable à celle observée à la fin des expériences 9 et 11. Le temps de demi-vie d'élimination obtenu avec le VRP placé en continu dans le milieu (protocole 10) est identique à celui obtenu dans avec le VRP-BP seul (protocole 9), soit environ 1 minute, ce qui suggère que l'efflux n'est pas ralenti par la présence de VRP, alors qu'il l'était après ajout de VRP uniquement pendant la phase d'accumulation (protocole 11). Ces résultats ne sont donc pas simples à interpréter.

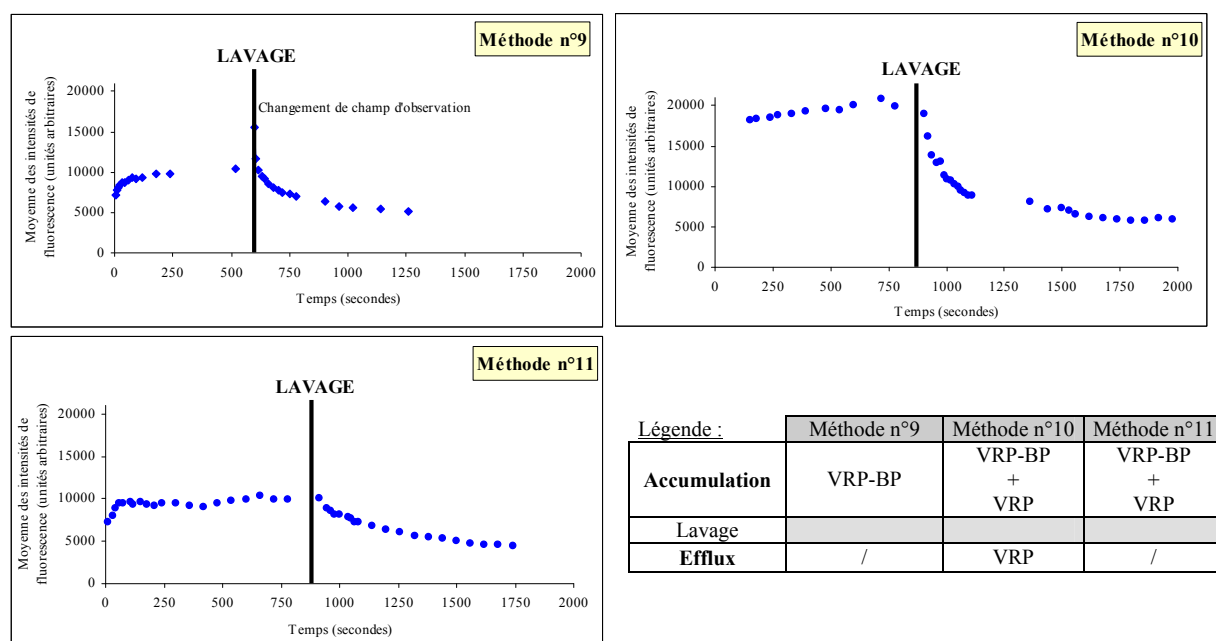


Figure 37: Quantification de la fluorescence après incubation des cellules D/ADX avec le VRP-BP \pm VRP

Accumulation et efflux du VRB-BP en présence d'un inhibiteur de transport actif (protocoles 12 et 13)

L'ajout d'azoture de sodium dans le milieu d'incubation lors de la phase d'accumulation uniquement (protocole 12) ou lors des phases d'accumulation et d'efflux (protocole 13) entraîne une augmentation de la fluorescence lente et continue dans le temps pendant la phase d'accumulation. Le marquage, d'abord intracytoplasmique périnucléaire,

s'accompagne d'un marquage de la membrane plasmique après environ 7 minutes d'incubation. Après lavage, l'efflux est très difficile à déterminer, le marquage étant à la fois intracytoplasmique et membranaire. L'intensité de fluorescence a tendance à diminuer alors que le marquage membranaire reste stable. De plus, il apparaît que ces effets ne sont présents que sur la zone illuminée par le faisceau de fluorescence, aucune fluorescence n'étant détectable à la fin de l'expérience dans les champs non observés au préalable. De même, la fluorescence est plus importante en périphérie de la zone d'observation ; c'est en effet à cet endroit que le photoblanchiment est moins important. Plusieurs questions peuvent alors se poser :

- Le faisceau de fluorescence a-t-il un effet sur le VRP-BP et/ou l'azide ?
- L'azide, molécule photoactivable, est-elle responsable d'une photoexcitation ?
- La lumière et/ou la chaleur produites par le faisceau jouent-elles sur l'affinité des membranes pour le VRP-BP ?

œ Accumulation et efflux du VRP-BP en présence de modulateurs de la P-gp : la ciclosporine A et la vinblastine (protocoles 14 et 15)

Les effets de deux autres modulateurs de la P-gp, la CsA et la VBL, ont également été étudiés après leur ajout lors des phases d'accumulation et d'efflux. Avec la CsA, seul un marquage périnucléaire apparaît au niveau de la zone éclairée par le faisceau lumineux du microscope. Tous les autres endroits de la boîte de Pétri ne sont pas fluorescents. Avec la VBL, un marquage du réticulum endoplasmique, accompagné d'un léger marquage de la membrane plasmique, apparaît au niveau de la zone éclairée uniquement. Après lavage, cette fluorescence disparaît totalement et le marquage devient peu à peu membranaire.

Les résultats obtenus avec l'azoture de sodium, la ciclosporine A et la vinblastine, du fait d'une grande hétérogénéité de fluorescence, ne peuvent pas être exploités.

Conclusion des expériences réalisées avec le vérapamil bodipy sur des fibroblastes de Hamster chinois D/ADX surexprimant la P-gp :

Les résultats obtenus lors de ces expériences avec le VRP-BP sont représentés dans le tableau XV en page suivante. En résumé, le VRP-BP est un substrat fluorescent qui pénètre dans les fibroblastes puis s'accumule dans le réticulum endoplasmique après environ 1 minute d'incubation, selon une relation dose-réponse. Lorsque le milieu contenant le VRP-BP est retiré et remplacé par une solution glucosée, le VRP-BP subit un efflux hors de la cellule. Cet efflux est ralenti par l'ajout d'un inhibiteur de la P-gp, le vérapamil, pendant la phase d'accumulation ou pendant les phases d'accumulation et d'efflux. Les expériences réalisées avec d'autres modulateurs de la P-gp, la ciclosporine A et la vinblastine, ou un inhibiteur des H^+ ATPases, l'azoture de sodium, ne sont pas interprétables du fait d'une très grande hétérogénéité de fluorescence au sein des boîtes de Pétri observées.

Pour déterminer si les différents phénomènes d'accumulation et d'efflux sont dus à la P-gp, il serait utile de travailler sur des cellules sensibles DC-3F pauvres en P-gp et de comparer les résultats obtenus avec ceux décrits ci-dessus. Il se peut en effet que plusieurs phénomènes soient superposés et que les résultats obtenus ne soient pas uniquement dus à la P-gp.

N°	Protocole	Résultats Intensité de fluorescence	Conclusions
Protocoles d'accumulation entre lame et lamelle			
1	VRP-BP 1 μ M	++++	1/ Pénétration dans la cellule 2/ Accumulation dans le RE
2	VRP-BP 100 nM	++	1/ Pénétration dans la cellule 2/ Accumulation dans le RE 3/ Relation dose-réponse
3	PBS	+/-	Autofluorescence faible
Protocoles d'efflux entre lame et lamelle			
4	1/ VRP-BP 1 μ M 2/ PBS	++	Efflux
5	1/ VRP-BP 1 μ M + azoture 10 mM 2/ PBS	Hétérogène	Non exploitable
6	1/ VRP-BP 1 μ M + VRP 30 μ M 2/ VRP 30 μ M	+++ + lysosomes	1/ Efflux 2/ Efflux ralenti par le VRP
7	1/ VRP-BP 1 μ M + VRP 30 μ M 2/ PBS	+++ + lysosomes	1/ Efflux 2/ Efflux ralenti par le VRP
8	1/ VRP-BP 100 nM + VRP 30 μ M 2/ VRP 30 μ M	+	1/ Efflux, ralenti par le VRP 2/ Relation dose-réponse
Protocoles d'accumulation et d'efflux dans les boîtes de Pétri			
9	1/ VRP-BP 1 μ M 2/ PBS	A : ++ E : +	1/ Accumulation dans le RE (maximale après 1 minute) 2/ Efflux (progressif)
10	1/ VRP-BP 1 μ M + VRP 30 μ M 2/ VRP 30 μ M	A : ++++ E : +	1/ Accumulation dans le RE (maximale après 1 minute) 2/ Efflux (progressif) 3/ Hétérogénéité de fluorescence
11	1/ VRP-BP 1 μ M + VRP 30 μ M 2/ PBS	A : ++ E : +	1/ Accumulation dans le RE (maximale après 1 minute) 2/ Efflux (progressif) 3/ Efflux ralenti par le VRP
12	1/ VRP-BP 1 μ M + azoture 10 mM 2/ PBS	Hétérogène	Non exploitable
13	1/ VRP-BP 1 μ M + azoture 5 mM 2/ azoture 5 mM	Hétérogène	Non exploitable
14	1/ VRP-BP 1 μ M + CsA 1 μ M 2/ CsA 1 μ M	Hétérogène	Non exploitable
15	1/ VRP-BP 1 μ M + VBL 10 μ M 2/ VBL 10 μ M	Hétérogène	Non exploitable

Tableau XV : Résultats des protocoles d'accumulation et/ou d'efflux réalisés avec des fibroblastes de Hamster Chinois D/ADX surexprimant la P-gp

Abréviations : A : accumulation ; CsA : ciclosporine A ; E : efflux ; PBS : phosphate buffer saline ; RE : réticulum endoplasmique ; VBL : vinblastine ; VRP : vérapamil ; VRP-BP : vérapamil bodipy

CONCLUSION

A travers ces différentes expériences, nous avons pu mettre en évidence la localisation du CYP3A et de la P-gp au sein des hépatocytes et des fibroblastes. Il a ainsi été démontré sur coupes de foie humain et de foie de rat que le CYP3A se trouve au niveau du réticulum endoplasmique des hépatocytes, alors que la P-gp se localise exclusivement sur la membrane plasmique du pôle apical des hépatocytes, au niveau des canalicules biliaires. De même, dans les fibroblastes pulmonaires de hamster chinois surexprimant la P-gp, le CYP3A semble être présent en très faible quantité au niveau du réticulum endoplasmique et la P-gp se localise sur la membrane plasmique des fibroblastes. Nous n'avons pas trouvé les autres localisations parfois décrites dans la littérature. En effet, le CYP3A n'a pas été retrouvé au niveau de la membrane plasmique, ni la P-gp au niveau de l'enveloppe nucléaire ou de l'appareil de Golgi.

Cependant, nos autres objectifs n'ont pas pu être atteints, à savoir le choix d'un couple substrat/métabolite adéquat et la mise en évidence du couplage fonctionnel entre le CYP3A et la P-gp. En effet, d'une part, ce travail ne nous a pas permis de trouver un couple substrat non fluorescent/métabolite fluorescent dont le métabolite, formé par action du CYP3A, ait une plus grande affinité pour la P-gp que la molécule mère. D'autre part, la localisation du substrat et/ou de son métabolite au sein d'une cellule hépatique n'a pas pu être mise en évidence, ni une superposition éventuelle entre les enzymes CYP3A et P-gp d'une part et le substrat et/ou le métabolite fluorescent d'autre part dans cette même cellule.

En effet, nous avons rencontré plusieurs points délicats lors de ces différentes études.

En premier lieu, de nombreux problèmes ont été rencontrés lors de l'utilisation des hépatocytes de rats congelés et/ou isolés. L'obtention de matériel biologique a d'abord été une étape limitante. En effet, le protocole d'isolement des cellules hépatiques à partir du foie de rat est un acte difficile à réaliser, en particulier dans un laboratoire où cette manipulation ne se fait pas en routine. Cette étape a donc conduit à de nombreux échecs. De plus, la mise en place de la culture cellulaire des hépatocytes, aussi bien congelés qu'isolés, n'a pas fonctionné correctement. Les cellules n'ont pas adhéré aux plaques de culture et le taux de mortalité des cellules étaient très important.

Concernant le suivi fonctionnel de substances fluorescentes réalisé sur les coupes de foie de rats, malgré un métabolisme observé au fluorimètre, la fluorescence observée au microscope à épifluorescence n'a pas montré d'augmentation significative. Il se peut que le

composé ne soit pas correctement immobilisé sur la lame, que celui-ci ait peu diffusé au sein du tissu, que les conditions expérimentales ne soient pas optimales pour ce type d'étude (effets du fixateur ?) ou encore que la fluorescence du composé soit insuffisante. En effet, au fluorimètre, la fluorescence du métabolite, formé par action du CYP3A sur les substrats non fluorescents, est détectée pour des concentrations de l'ordre du μM . Cependant, les anticorps habituellement utilisés pour les observations au microscope à épifluorescence montrent au fluorimètre une intensité de fluorescence environ 50 fois plus élevée que celle du métabolite pour une même concentration, avec une fluorescence détectable à partir de concentrations de l'ordre du nM (test réalisé avec un anticorps anti-lapin produit chez la souris et couplé au FITC, Jackson ImmunoResearch Laboratories® et la résorufine). La fluorescence intrinsèque des composés est donc suffisante pour des études enzymatiques à l'aide d'un fluorimètre, mais pourrait être insuffisante pour une détection au microscope à épifluorescence. Il faudrait donc trouver des molécules beaucoup plus fluorescentes ou bien des molécules se fixant au niveau des systèmes enzymatiques étudiés par des liaisons covalentes.

Dans ce dernier but, j'ai réalisé des expériences avec un substrat photoactivable, le lapachénole [44, 134]. Il est apparu que, sans photolyse, le lapachénole est substrat du CYP3A4 et subit une hydroxylation. Après irradiation à 365 nm, ce composé inactive le CYP3A4 en formant des adduits de façon covalente au niveau du site actif du P450. Le lapachénole n'est fluorescent que lorsqu'il est lié au CYP3A4 après irradiation. Cependant, le lapachénole ne semble pas interagir avec la P-gp. De plus, l'observation de coupes de foie incubées avec du lapachénole puis irradiées, ou bien de coupes de foie lui-même incubé avec le composé puis irradié, au microscope à épifluorescence, n'a pas permis de localiser une fluorescence, en raison des mêmes problèmes que précédemment.

Concernant les incubations des fibroblastes pulmonaires de Hamster chinois D/ADX avec le vérapamil-bodipy, une accumulation du VRP-BP dans le réticulum endoplasmique a été démontrée, suivi de son efflux après lavage du milieu, cet efflux étant ralenti par l'ajout de vérapamil, modulateur de la P-gp, dans le milieu. Il se pourrait que les effets observés soient en relation avec l'activité de la P-gp. Cependant, il serait nécessaire d'effectuer ces mêmes manipulations sur des cellules sensibles pauvres en P-gp pour déterminer le rôle exact de la P-gp. Il serait également intéressant d'améliorer ces méthodes, en particulier celles impliquant un modulateur de la P-gp, avec lesquelles nous avons rencontrées de nombreux obstacles.

Cette éventuelle coopération fonctionnelle entre le CYP3A et la P-gp d'un point de vue cellulaire est un sujet qui reste très intéressant et devrait continuer à être étudié au laboratoire. Pour cela, il faudrait donc trouver des couples de composés substrat/métabolite

pour lesquels une fluorescence suffisante peut être observée, mais également optimiser la manipulation visant à isoler les cellules hépatiques du foie de rat, afin d'obtenir des cellules viables en nombre suffisant. De plus, il faudrait tenter de régler le problème d'adhésion des hépatocytes sur les plaques de culture.

Un autre type cellulaire pourrait également permettre d'étudier l'interaction fonctionnelle entre ces deux protéines. Il s'agit des lignées cellulaires Caco-2, dérivant d'un adénocarcinome colorectal humain. Ces cellules intestinales, contenant beaucoup de P-gp et peu de CYP3A, sont des cellules en lignée et sont plus faciles à obtenir et à cultiver.

De plus en plus, métabolisme et transport apparaissent comme deux mécanismes difficilement dissociables. Ainsi, la compréhension de l'interaction fonctionnelle entre le CYP3A et la P-gp nécessite des études complémentaires. Cette découverte permettrait non seulement d'approfondir les connaissances dans le domaine de l'absorption de médicaments administrés par voie orale, mais serait également utile lors du développement d'un médicament pour résoudre les problèmes liés à la faible biodisponibilité de nouvelles entités chimiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:361-398
2. Anandatheerthavarada HK, Addya S, Dwivedi RS, Biswas G, Mullick J, Avadhani NG (1997) Localization of multiple forms of inducible cytochromes P450 in rat liver mitochondria: immunological characteristics and patterns of xenobiotic substrate metabolism. *Arch Biochem Biophys* 339:136-150
3. Arancia G, Molinari A, Calcabrini A, Meschini S, Cianfriglia M (2001) Intracellular P-glycoprotein in multidrug resistant tumor cells. *Ital J Anat Embryol* 106:59-68
4. Axelrod J (1955) The enzymatic demethylation of ephedrine. *J Pharmacol Exp Ther* 114:430-438
5. Balayssac D, Authier N, Cayre A, Coudore F (2005) Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug-drug interactions? *Toxicol Lett* 156:319-329
6. Belpomme D (1991) Diversité des mécanismes de résistance aux chimiothérapies anticancéreuses. *Médecine/Sciences* 7:465-472
7. Bendayan R, Lee G, Bendayan M (2002) Functional expression and localization of P-glycoprotein at the blood brain barrier. *Microsc Res Tech* 57:365-380
8. Bertilsson L (1995) Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet* 29:192-209
9. Biedler JL, Chang TD, Meyers MB, Peterson RH, Spengler BA (1983) Drug resistance in Chinese hamster lung and mouse tumor cells. *Cancer Treat Rep* 67:859-867
10. Biedler JL, Riehm H (1970) Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 30:1174-1184
11. Bienvenüe A (2004) Université Montpellier II - Enseignement à distance de "Biologie physico-chimique et structurale". Le cytochrome P450. In: <http://www.biochimie.univ-montp2.fr/maitrise/reinhard/p450.htm>
12. Brodie BB, Axelrod J, Cooper JR, Gaudette L, La Du BN, Mitoma C, Udenfriend S (1955) Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science* 121:603-604
13. Caraco Y, Sheller J, Wood AJ (1996) Pharmacogenetic determination of the effects of codeine and prediction of drug interactions. *J Pharmacol Exp Ther* 278:1165-1174

14. Christians U, Schmitz V, Haschke M (2005) Functional interactions between P-glycoprotein and CYP3A in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1:641-654
15. CNRS (2007) Centre Nationale de la Recherche Scientifique- Informations aux laboratoires – Expérimentation animale, euthanasie des animaux de laboratoire. In:<http://www.cnrs.fr/infoslabos/reglementation/euthanasie.htm>
16. Cooper DY, Levin S, Narasimhulu S, Rosenthal O (1965) Photochemical Action Spectrum Of The Terminal Oxidase Of Mixed Function Oxidase Systems. *Science* 147:400-402
17. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 38:1277-1287
18. Cornwell MM, Tsuruo T, Gottesman MM, Pastan I (1987) ATP-binding properties of P glycoprotein from multidrug-resistant KB cells. *Faseb J* 1:51-54
19. Cummins CL, Jacobsen W, Benet LZ (2002) Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther* 300:1036-1045
20. Cummins CL, Salphati L, Reid MJ, Benet LZ (2003) In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. *J Pharmacol Exp Ther* 305:306-314
21. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD (1984) N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1327-1331
22. Danielson PB (2002) The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* 3:561-597
23. Demeule M, Jodoin J, Beaulieu E, Brossard M, Beliveau R (1999) Dexamethasone modulation of multidrug transporters in normal tissues. *FEBS Lett* 442:208-214
24. Devine SE, Ling V, Melera PW (1992) Amino acid substitutions in the sixth transmembrane domain of P-glycoprotein alter multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4564-4568
25. Diehl H, Capalna S, Ullrich V (1969) The photochemical action spectrum of the carbon monoxide inhibited hydroxylation of cyclohexane by rat liver microsomes. *FEBS Lett* 4:99-102
26. Dogra SC, Whitelaw ML, May BK (1998) Transcriptional activation of cytochrome P450 genes by different classes of chemical inducers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:1-9
27. Doige CA, Sharom FJ (1992) Transport properties of P-glycoprotein in plasma membrane vesicles from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 1109:161-171

28. Doige CA, Yu X, Sharom FJ (1992) ATPase activity of partially purified P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 1109:149-160
29. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG (2000) Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* 38:41-57
30. Ducharme MP, Warbasse LH, Edwards DJ (1995) Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 57:485-491
31. Eliasson E, Kenna JG (1996) Cytochrome P450 2E1 is a cell surface autoantigen in halothane hepatitis. *Mol Pharmacol* 50:573-582
32. Estabrook RW, Cooper DY, Rosenthal O (1963) The Light Reversible Carbon Monoxide Inhibition Of The Steroid C21-Hydroxylase System Of The Adrenal Cortex. *Biochem Z* 338:741-755
33. Faed EM (1984) Properties of acyl glucuronides: implications for studies of the pharmacokinetics and metabolism of acidic drugs. *Drug Metab Rev* 15:1213-1249
34. FDA (2007) Food and Drug Administration - Center for Drug Evaluation and Research. Drug-induced liver toxicity. In:<http://www.fda.gov/cder/livertox>
35. Ferte J (2000) Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem* 267:277-294
36. Filipits M (2004) Mechanisms of cancer: multidrug resistance. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 1:229-234
37. Flexner C (2000) Dual protease inhibitor therapy in HIV-infected patients: pharmacologic rationale and clinical benefits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:649-674
38. Ford JM, Hait WN (1990) Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 42:155-199
39. Fuhr U (2000) Induction of drug metabolising enzymes: pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. *Clin Pharmacokinet* 38:493-504
40. Garfinkel D (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* 77:493-509
41. Garrigos M, Belehradek J, Jr., Mir LM, Orlowski S (1993) Absence of cooperativity for MgATP and verapamil effects on the ATPase activity of P-glycoprotein containing membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1034-1041

42. Garrigues A, Escargueil AE, Orlowski S (2002) The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10347-10352
43. Garrigues A, Loiseau N, Delaforge M, Ferte J, Garrigos M, Andre F, Orlowski S (2002) Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 62:1288-1298
44. Gartner CA, Wen B, Wan J, Becker RS, Jones G, 2nd, Gygi SP, Nelson SD (2005) Photochromic agents as tools for protein structure study: lapachenole is a photoaffinity ligand of cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* 44:1846-1855
45. Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP (1995) Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 25:25-65
46. Gonzalez FJ, Gelboin HV (1991) Human cytochromes P450: evolution, catalytic activities and interindividual variations in expression. *Prog Clin Biol Res* 372:11-20
47. Gottesman MM, Pastan I (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62:385-427
48. Guengerich FP (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 14:611-650
49. Guengerich FP (2003) Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions. *Arch Biochem Biophys* 409:59-71
50. Guengerich FP (2004) Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues? *Drug Metab Rev* 36:159-197
51. Guengerich FP, Johnson WW, Shimada T, Ueng YF, Yamazaki H, Langouet S (1998) Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutat Res* 402:121-128
52. Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (1983) Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Mol Cell Biochem* 53-54:35-56
53. Guillouzo A (1998) Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 2:511-532
54. Hochman JH, Chiba M, Nishime J, Yamazaki M, Lin JH (2000) Influence of P-glycoprotein on the transport and metabolism of indinavir in Caco-2 cells expressing cytochrome P-450 3A4. *J Pharmacol Exp Ther* 292:310-318
55. Hochman JH, Chiba M, Yamazaki M, Tang C, Lin JH (2001) P-glycoprotein-mediated efflux of indinavir metabolites in Caco-2 cells expressing cytochrome P450 3A4. *J Pharmacol Exp Ther* 298:323-330
56. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3473-3478

57. Horio M, Gottesman MM, Pastan I (1988) ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3580-3584
58. Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Lai SL, Yang SY, Chang FY, Lee SD (2002) Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 35:883-889
59. Ingelman-Sundberg M (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 5:6-13
60. INSERM (2000) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale - Expertise collective. Dioxines dans l'environnement - Quels risques pour la santé? In:<http://ist.inserm.fr/basisrapports/dioxine.html>
61. IU Indiana University School of Medicine - Division of Clinical Pharmacology. Drug interactions - Cytochrome P450 system. In:<http://medicine.iupui.edu/flockhart/>
62. Jakubowski D (2006) College of Saint Benedict - Saint John's University. Oxidation/Phosphorylation. In:<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/oxphos/oloxidationenzym.html>
63. James LP, Mayeux PR, Hinson JA (2003) Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* 31:1499-1506
64. Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152-162
65. Kirchheiner J, Brockmoller J (2005) Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 77:1-16
66. Kivisto KT, Niemi M, Fromm MF (2004) Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein. *Fundam Clin Pharmacol* 18:621-626
67. Klingenberg M, Yamafuji K, Omura H, Otomo N (1958) Pigments of rat liver microsomes - An immunological investigation of viral polyhedrosis. *Arch Biochem Biophys* 75:376-386
68. Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, Merion RM, Watkins PB (1994) CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 4:247-259
69. Lau YY, Wu CY, Okochi H, Benet LZ (2004) Ex situ inhibition of hepatic uptake and efflux significantly changes metabolism: hepatic enzyme-transporter interplay. *J Pharmacol Exp Ther* 308:1040-1045
70. Lee G, Schlichter L, Bendayan M, Bendayan R (2001) Functional expression of P-glycoprotein in rat brain microglia. *J Pharmacol Exp Ther* 299:204-212

71. Lehne G, De Angelis P, Clausen OP, Egeland T, Tsuruo T, Rugstad HE (1995) Binding diversity of antibodies against external and internal epitopes of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Cytometry* 20:228-237
72. Lelong IH, Guzikowski AP, Haugland RP, Pastan I, Gottesman MM, Willingham MC (1991) Fluorescent verapamil derivative for monitoring activity of the multidrug transporter. *Mol Pharmacol* 40:490-494
73. Lewis DFV (2001) Guide to cytochromes P450: structure and function. Edition Taylor & Francis
74. Lin JH, Lu AY (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 35:361-390
75. Lin JH, Yamazaki M (2003) Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 42:59-98
76. Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE (2001) From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 58:931-959
77. Litman T, Zeuthen T, Skovsgaard T, Stein WD (1997) Competitive, non-competitive and cooperative interactions between substrates of P-glycoprotein as measured by its ATPase activity. *Biochim Biophys Acta* 1361:169-176
78. Loeffler WJ (2007) PubDrug. CYP3A4 inhibitors.
79. Loeper J, Descatoire V, Maurice M, Beaune P, Belghiti J, Houssin D, Ballet F, Feldmann G, Guengerich FP, Pessayre D (1993) Cytochromes P-450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autoantibodies. *Gastroenterology* 104:203-216
80. Loeper J, Descatoire V, Maurice M, Beaune P, Feldmann G, Larrey D, Pessayre D (1990) Presence of functional cytochrome P-450 on isolated rat hepatocyte plasma membrane. *Hepatology* 11:850-858
81. Loeper J, Louerat-Oriou B, Duport C, Pompon D (1998) Yeast expressed cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) exposed on the external face of plasma membrane is functionally competent. *Mol Pharmacol* 54:8-13
82. Luo G, Guenther T, Gan LS, Humphreys WG (2004) CYP3A4 induction by xenobiotics: biochemistry, experimental methods and impact on drug discovery and development. *Curr Drug Metab* 5:483-505
83. Mansouri A, Henle KJ, Nagle WA, Moss AJ (1990) Tumor cell drug resistance and its reversal. *SAAS Bull Biochem Biotechnol* 3:91-96
84. Maraldi NM, Zini N, Santi S, Scotlandi K, Serra M, Baldini N (1999) P-glycoprotein subcellular localization and cell morphotype in MDR1 gene-transfected human osteosarcoma cells. *Biol Cell* 91:17-28

85. Marie J-P (1990) Le phénomène de résistance multiple aux anti-cancéreux: les gènes MDR et la P-gp. *Médecine/Sciences* 6:443-448
86. Matheny CJ, Ali RY, Yang X, Pollack GM (2004) Effect of prototypical inducing agents on P-glycoprotein and CYP3A expression in mouse tissues. *Drug Metab Dispos* 32:1008-1014
87. McLean M, Dutton MF (1995) Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacol Ther* 65:163-192
88. Meyer UA, Zanger UM (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:269-296
89. Molden E, Christensen H, Sund RB (2000) Extensive metabolism of diltiazem and P-glycoprotein-mediated efflux of desacetyl-diltiazem (M1) by rat jejunum in vitro. *Drug Metab Dispos* 28:107-109
90. Molinari A, Calcabrini A, Meschini S, Stringaro A, Crateri P, Toccaceli L, Marra M, Colone M, Cianfriglia M, Arancia G (2002) Subcellular detection and localization of the drug transporter P-glycoprotein in cultured tumor cells. *Curr Protein Pept Sci* 3:653-670
91. Molinari A, Calcabrini A, Meschini S, Stringaro A, Del Bufalo D, Cianfriglia M, Arancia G (1998) Detection of P-glycoprotein in the Golgi apparatus of drug-untreated human melanoma cells. *Int J Cancer* 75:885-893
92. Mourez M, Jéhanho M, Hofnung M, Dassa E (2000) Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs ATP binding cassette (ABC). *Médecine/Sciences* 16:386-394
93. Müller M (25 avril 2007) 49 human ATP-binding cassette transporters. In:<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>
94. Muratori L, Parola M, Ripalti A, Robino G, Muratori P, Bellomo G, Carini R, Lenzi M, Landini MP, Albano E, Bianchi FB (2000) Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* 46:553-561
95. NEB New England Biolabs. Drug Discovery - Overviews. In:http://neb.com/nebecomm/tech-reference/drug_discovery/overviews.asp
96. Nebert DW, Gonzalez FJ (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56:945-993
97. Nelson DR (2003) Cytochrome P450s in Humans. In:<http://drnelson.utmem.edu/P450lect.html>
98. Nelson DR (2004) P450 families and subfamilies. In:<http://drnelson.utmem.edu/family.list.htm>

99. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42
100. Ng IO, Liu CL, Fan ST, Ng M (2000) Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma. A determinant of chemotherapy response. *Am J Clin Pathol* 113:355-363
101. Ogilvie BW, Zhang D, Li W, Rodrigues AD, Gipson AE, Holsapple J, Toren P, Parkinson A (2006) Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: implications for drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* 34:191-197
102. Omura T, Sato R (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment Of Liver Microsomes. I. Evidence For Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* 239:2370-2378
103. Omura T, Sato R (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment Of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, And Properties. *J Biol Chem* 239:2379-2385
104. Oprea TI (2006) University of New Mexico School of Medicine - Division of biocomputing. Cytochromes P450 in drug metabolism and disease. In:<http://biocomp.health.unm.edu/p450/>
105. Ortiz de Montellano PR (1995) Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. 2nde édition. Plenum Press
106. Peretti E, Karlaganis G, Lauterburg BH (1987) Increased urinary excretion of toxic hydrazino metabolites of isoniazid by slow acetylators. Effect of a slow-release preparation of isoniazid. *Eur J Clin Pharmacol* 33:283-286
107. Perez MJ, Cederbaum AI (2003) Proteasome inhibition potentiates CYP2E1-mediated toxicity in HepG2 cells. *Hepatology* 37:1395-1404
108. Peyronneau MA, Delaforge M, Riviere R, Renaud JP, Mansuy D (1994) High affinity of ergopeptides for cytochromes P450 3A. Importance of their peptide moiety for P450 recognition and hydroxylation of bromocriptine. *Eur J Biochem* 223:947-956
109. Philip PA, Ali-Sadat S, Doehmer J, Kocarek T, Akhtar A, Lu H, Chan KK (1999) Use of V79 cells with stably transfected cytochrome P450 cDNAs in studying the metabolism and effects of cytotoxic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 43:59-67
110. Prueksaritanont T, Tang C, Qiu Y, Mu L, Subramanian R, Lin JH (2002) Effects of fibrates on metabolism of statins in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 30:1280-1287
111. Pubmed National Center for Biotechnology Information. In:<http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>
112. Ritter JK (2000) Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 129:171-193

113. Robin MA, Maratrat M, Le Roy M, Le Breton FP, Bonierbale E, Dansette P, Ballet F, Mansuy D, Pessayre D (1996) Antigenic targets in tienilic acid hepatitis. Both cytochrome P450 2C11 and 2C11-tienilic acid adducts are transported to the plasma membrane of rat hepatocytes and recognized by human sera. *J Clin Invest* 98:1471-1480
114. Ronaldson PT, Bendayan M, Gingras D, Piquette-Miller M, Bendayan R (2004) Cellular localization and functional expression of P-glycoprotein in rat astrocyte cultures. *J Neurochem* 89:788-800
115. Rooseboom M, Commandeur JN, Vermeulen NP (2004) Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol Rev* 56:53-102
116. Salphati L, Benet LZ (1998) Modulation of P-glycoprotein expression by cytochrome P450 3A inducers in male and female rat livers. *Biochem Pharmacol* 55:387-395
117. Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, Schwab M (2001) Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet* 358:383-384
118. Schinkel AH (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 8:161-170
119. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97:2517-2524
120. Schuetz EG, Wrighton SA, Barwick JL, Guzelian PS (1984) Induction of cytochrome P-450 by glucocorticoids in rat liver. I. Evidence that glucocorticoids and pregnenolone 16 alpha-carbonitrile regulate de novo synthesis of a common form of cytochrome P-450 in cultures of adult rat hepatocytes and in the liver in vivo. *J Biol Chem* 259:1999-2006
121. Seglen PO (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13:29-83
122. Seglen PO (1972) Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca²⁺ on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. *Exp Cell Res* 74:450-454
123. Shapiro AB, Fox K, Lee P, Yang YD, Ling V (1998) Functional intracellular P-glycoprotein. *Int J Cancer* 76:857-864
124. Sharom FJ (1997) The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J Membr Biol* 160:161-175
125. Sharom FJ, Yu X, Doige CA (1993) Functional reconstitution of drug transport and ATPase activity in proteoliposomes containing partially purified P-glycoprotein. *J Biol Chem* 268:24197-24202
126. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270:414-423

127. Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M, Wieland E (2003) Acyl glucuronide drug metabolites: toxicological and analytical implications. *Ther Drug Monit* 25:1-16
128. Silverman JA (1999) Multidrug-resistance transporters. *Pharm Biotechnol* 12:353-386
129. Synold TW, Dussault I, Forman BM (2001) The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* 7:584-590
130. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7735-7738
131. Wachter VJ, Wu CY, Benet LZ (1995) Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog* 13:129-134
132. Wang JS, Neuvonen M, Wen X, Backman JT, Neuvonen PJ (2002) Gemfibrozil inhibits CYP2C8-mediated cerivastatin metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 30:1352-1356
133. Weinshilboum R (2003) Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 348:529-537
134. Wen B, Doneanu CE, Gartner CA, Roberts AG, Atkins WM, Nelson SD (2005) Fluorescent photoaffinity labeling of cytochrome P450 3A4 by lapachenole: identification of modification sites by mass spectrometry. *Biochemistry* 44:1833-1845
135. White PC, Speiser PW (2000) Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 21:245-291
136. Wolf CR, Mahmood A, Henderson CJ, McLeod R, Manson MM, Neal GE, Hayes JD (1996) Modulation of the cytochrome P450 system as a mechanism of chemoprotection. *IARC Sci Publ*:165-173
137. Woster P (2007) American Chemical Society - Division of Medicinal Chemistry. Chemistry of antibiotics used to treat tuberculosis. In:<http://www.acsmedchem.org/module/tb.html>
138. Wu CY, Benet LZ (2003) Disposition of tacrolimus in isolated perfused rat liver: influence of troleandomycin, cyclosporine, and gg918. *Drug Metab Dispos* 31:1292-1295
139. Wu CY, Benet LZ (2005) Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res* 22:11-23
140. Yumoto R, Murakami T, Sanemasa M, Nasu R, Nagai J, Takano M (2001) Pharmacokinetic interaction of cytochrome P450 3A-related compounds with rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, in rats pretreated with dexamethasone. *Drug Metab Dispos* 29:145-151

141. Yusa K, Tsuruo T (1989) Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Res* 49:5002-5006

RESUME :

La coopération fonctionnelle entre le cytochrome P450 3A (CYP3A) et la P-glycoprotéine (P-gp) décrite dans la littérature est un facteur déterminant contribuant à la variabilité de la biodisponibilité de la plupart des médicaments administrés *per os*. Le CYP3A et la P-gp sont des protéines membranaires dont les localisations respectives communément attribuées sont la membrane du réticulum endoplasmique pour le CYP3A et la membrane plasmique pour la P-gp. Le but de notre étude était une description intégrée au niveau cellulaire du fonctionnement de ces protéines membranaires de détoxification des médicaments et de leurs métabolites, grâce à la détermination de la localisation cellulaire de ces protéines par immunomarquage et par suivi fonctionnel de composés fluorescents, à l'aide de techniques de microscopie à épifluorescence. Le matériel utilisé comprenait des coupes de foie de rat et humain, des hépatocytes en culture primaire ou des lignées cellulaires de fibroblastes de Hamster chinois D/ADX surexprimant la P-gp. Nous avons ainsi démontré que le CYP3A se localise exclusivement au niveau du réticulum endoplasmique, alors que la P-gp est retrouvée au pôle apical des hépatocytes, au niveau des canalicules biliaires et sur la membrane plasmique des fibroblastes. Une colocalisation membranaire des composés et enzymes, synonyme d'une grande efficacité de détoxification, n'a pas été mise en évidence dans les hépatocytes, à cause de difficultés techniques et d'une trop faible fluorescence des substrats utilisés.

DISCIPLINE :

TOXICOLOGIE

MOTS-CLEFS :

Cytochrome P450 3A
P-glycoprotéine
Microscopie à épifluorescence
Coupes de foie
Hépatocytes
Fibroblastes D/ADX
Résorufine
Vérapamil bodipy

ADRESSE DE L'AUTEUR :

Adeline CAVELIER
63 rue de la Division Leclerc
94110 ARCUEIL