

Accumulation et efflux des fluoroquinolones dans les macrophages J774 sauvages et résistants à la ciprofloxacine

M. Heremans – FACM

Promoteurs:

P.-M. Tulkens

F. Van Bambeke

1. Introduction

Fluoroquinolones

= Antibiotiques

à large spectre

bactéricides

de bonne biodisponibilité

} Intérêt clinique

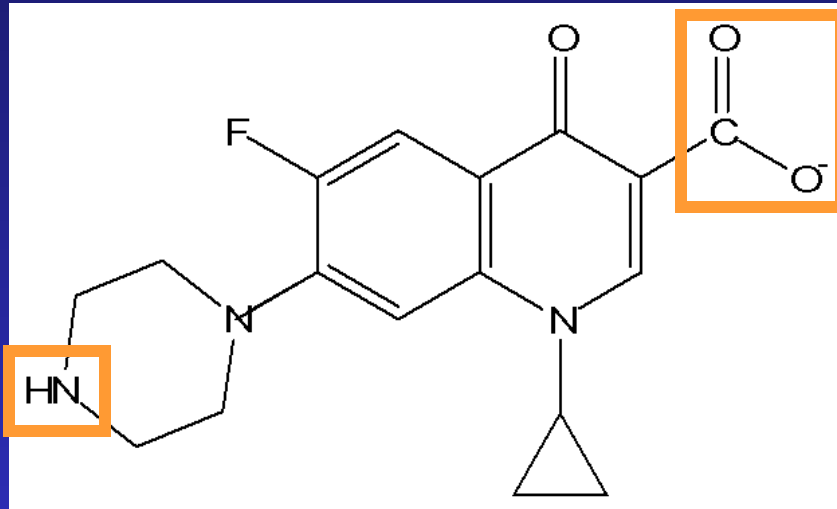
+ activité vis-à-vis des infections intracellulaires

- **Mode d'action**

Interférence avec la multiplication de l'ADN par inhibition de l'activité de la DNA gyrase et de la topoisomérase IV

Structure chimique

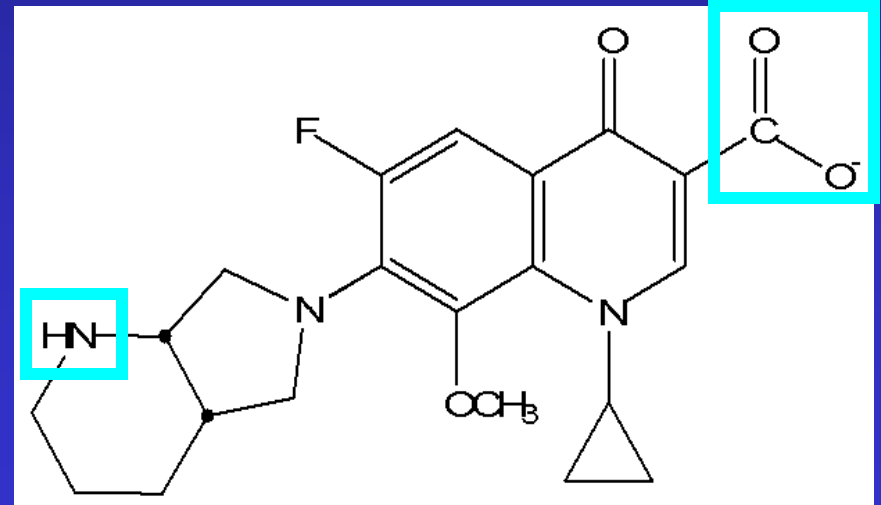
ciprofloxacin



pKa = 2.77

pKa = 8.76

pKa = 2.17

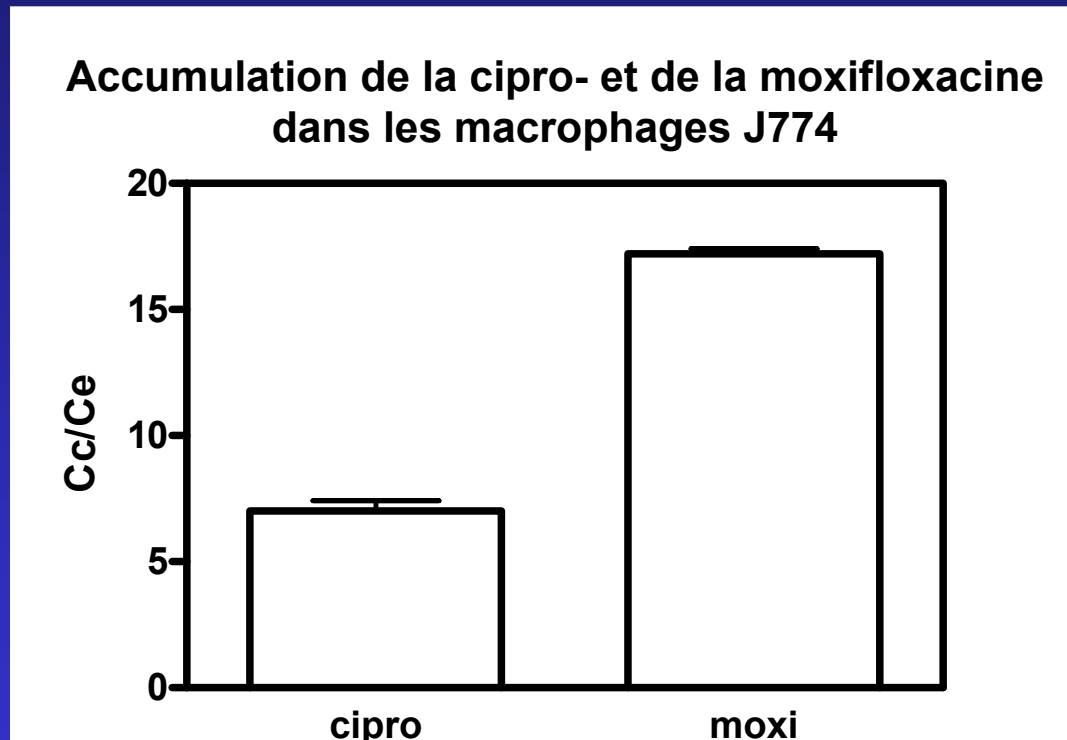


pKa = 10.77

moxifloxacin

Accumulation des fluoroquinolones

- Accumulation des fluoroquinolones dans les cellules eucaryotes, y compris les macrophages

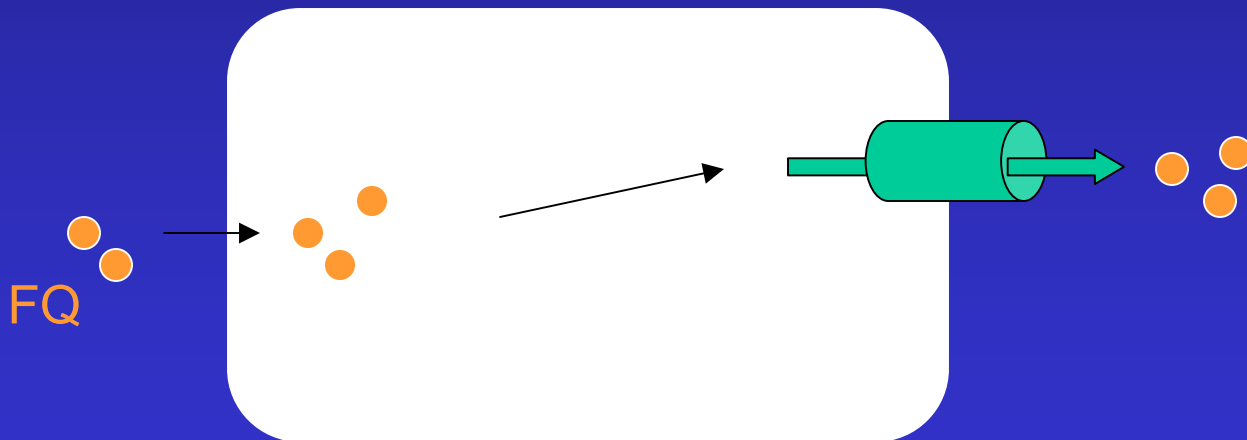


- différence d'accumulation due à une différence de reconnaissance par les pompes à efflux

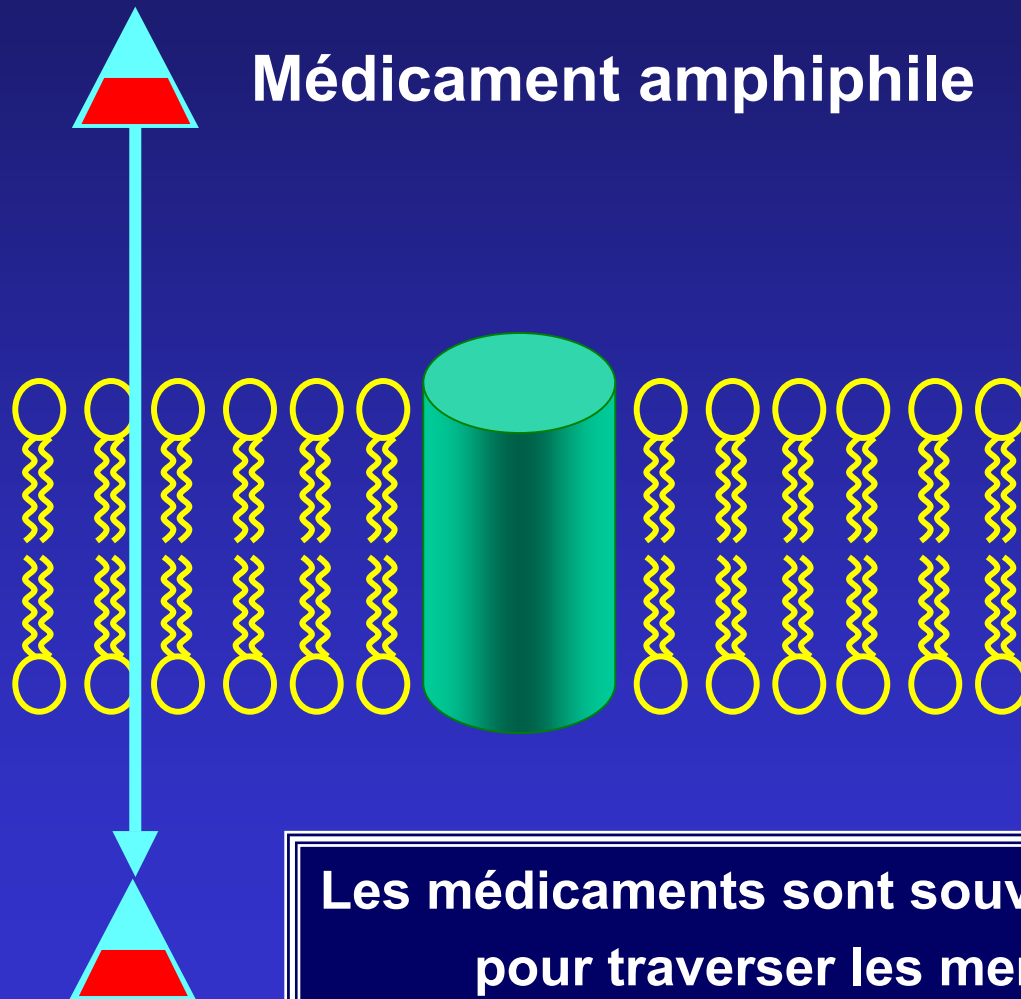
Pompes à efflux

extrusion des fluoroquinolones de la cellule

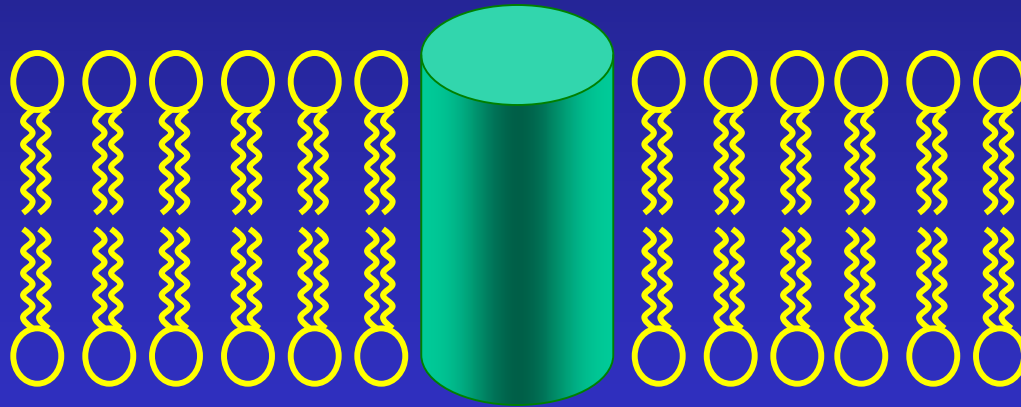
- ➔ Accumulation suboptimale
- ➔ Activité suboptimale



Pourquoi des pompes à efflux ?



Pourquoi des pompes à efflux ?

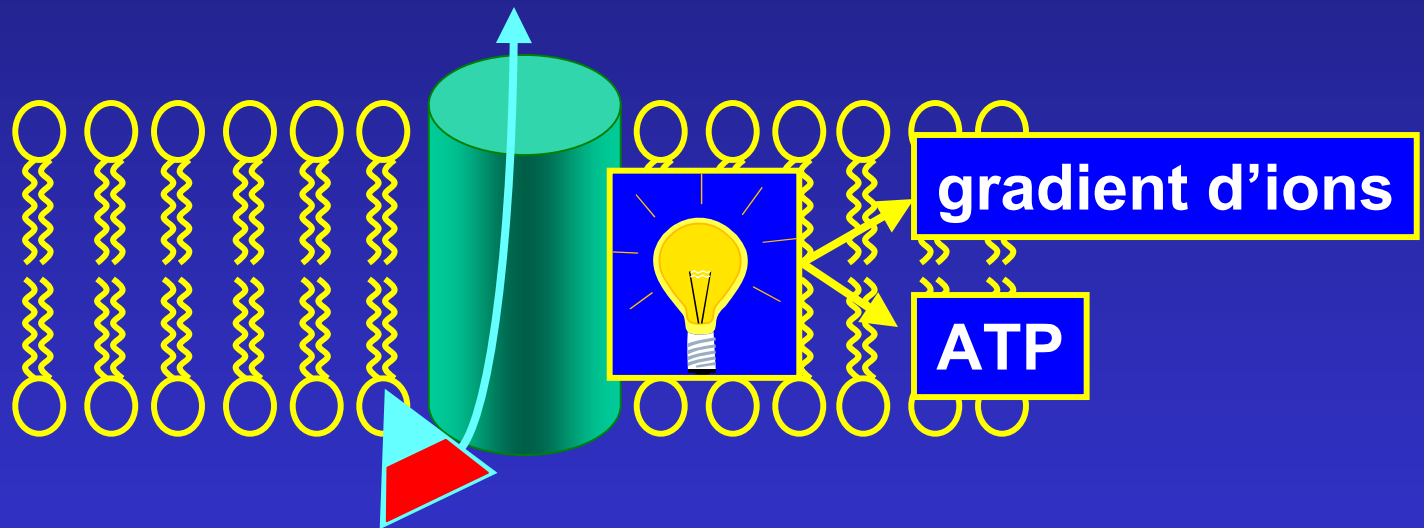


Mais un composé amphiphile
peut être toxique !



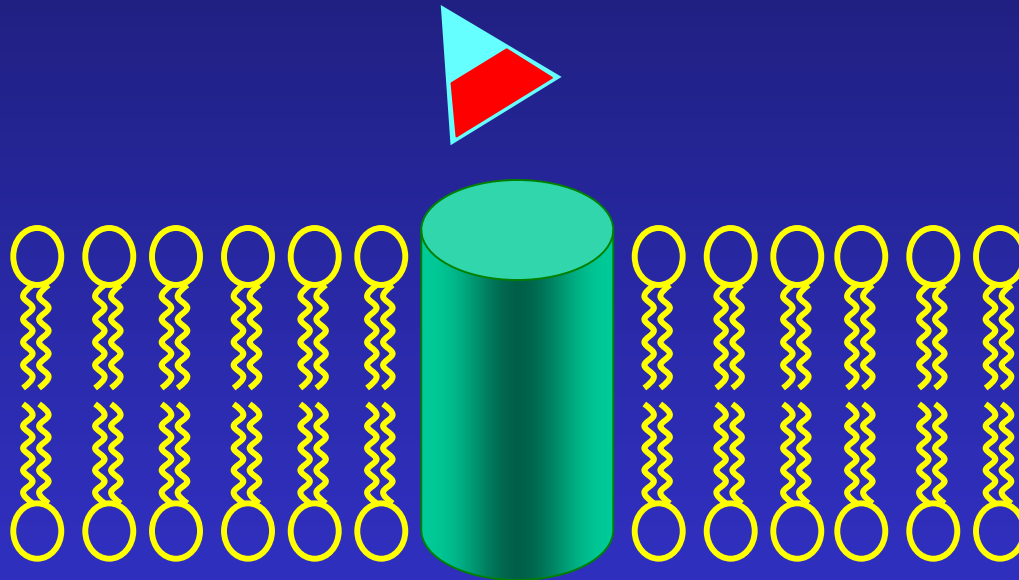
Pourquoi des pompes à efflux ?

Extrusion par les pompes à efflux



Pourquoi des pompes à efflux ?

Extrusion par les pompes à efflux



**Moyen général de protection contre l'invasion
par les substances étrangères**

Pompes et résistances

Cellule eucaryote

Anticancéreux

↳ ↗ pompes à efflux

Cellule procaryote

Antibiotiques

↳ ↗ pompes à efflux

Antibiotique

↳ pompes à efflux

Cellule eucaryote

Caractérisation de l'efflux (1/2)

Travail du labo:



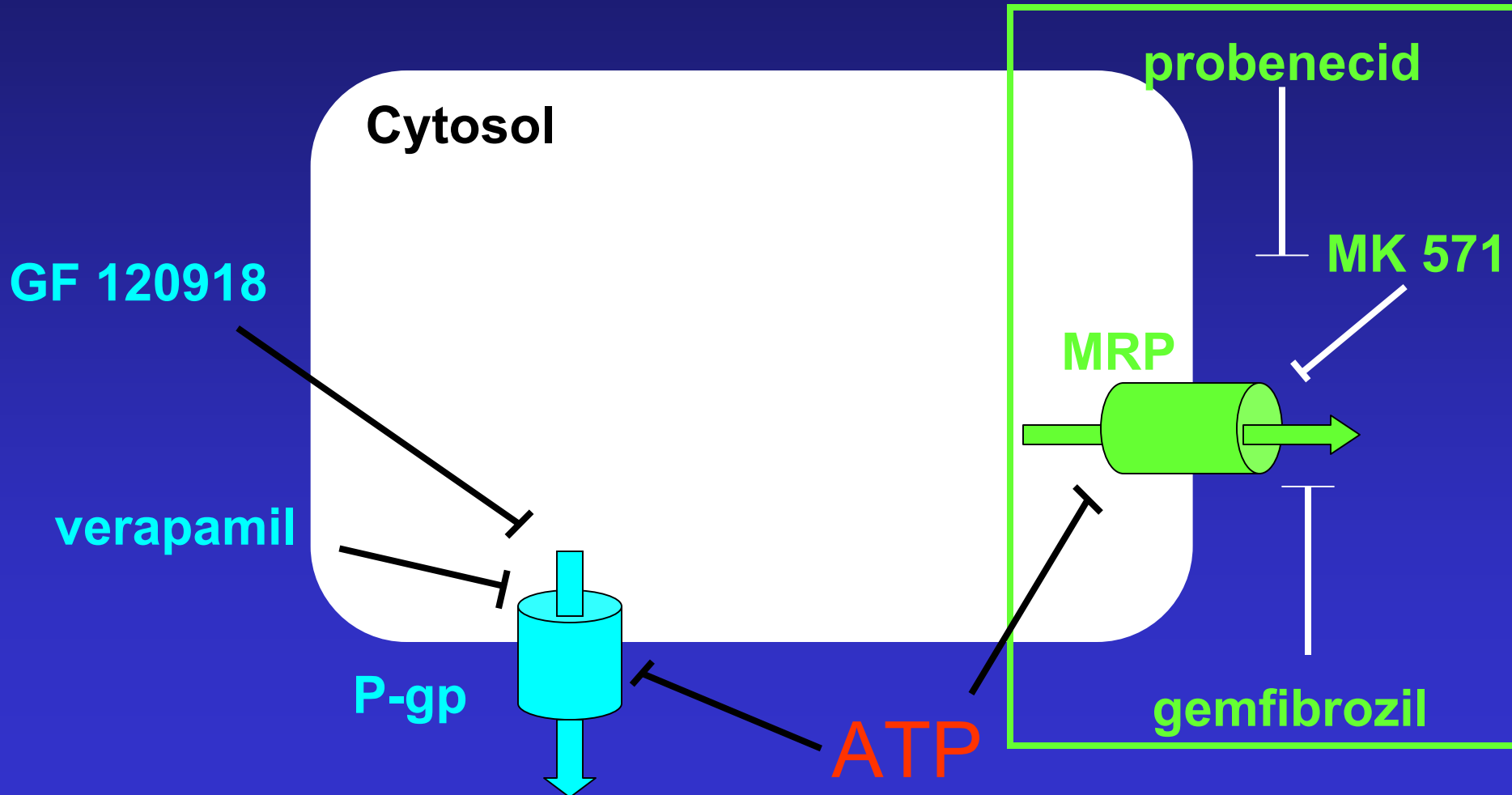
caractérisation de l'efflux de la ciprofloxacine dans les macrophages en raison de son intérêt clinique



Source d'énergie

Inhibiteurs de pompes à efflux

Caractérisation de l'efflux (2/2)



Pompes et résistances

Cellule eucaryote

Anticancéreux

↳ ↗ pompes à efflux

Cellule procaryote

Antibiotiques

↳ ↗ pompes à efflux

Antibiotique

↳ ↗ pompes à efflux ?

Cellule eucaryote

Meilleure caractérisation
génotypique et phénotypique

Macrophages J774

Macrophages J774 sauvages

= cellules dérivant d'un réticulosarcome de souris

Macrophages J774 résistants à la ciprofloxacine

Comment les obtenir?

Introduction du gène codant pour la pompe
ms identification (9 MRP!)

Exposition chronique à l'antibiotique

- incubation des macrophages en présence de conc croissantes en ciprofloxacine (40 → 60 → 80 µg/ml)
- maintien des macrophages en présence d'une conc de 80 µg cipro/ml

2. But de l'étude

But de l'étude

→ Etude phénotypique

- caractérisation accumulation – efflux de la cipro dans les macrophages sauvages et résistants
- comparaison accumulation – efflux pour différentes fluoroquinolones
- comparaison de l'activité intracellulaire de différentes fluoroquinolones dans les macrophages sauvages et résistants

→ Etude génotypique (en coll. avec N. Caceres)

Etude de l'expression des pompes à efflux dans les cellules sauvages et résistantes par Western Blot

→ Etude morphologique par microscopie

3. Méthodes

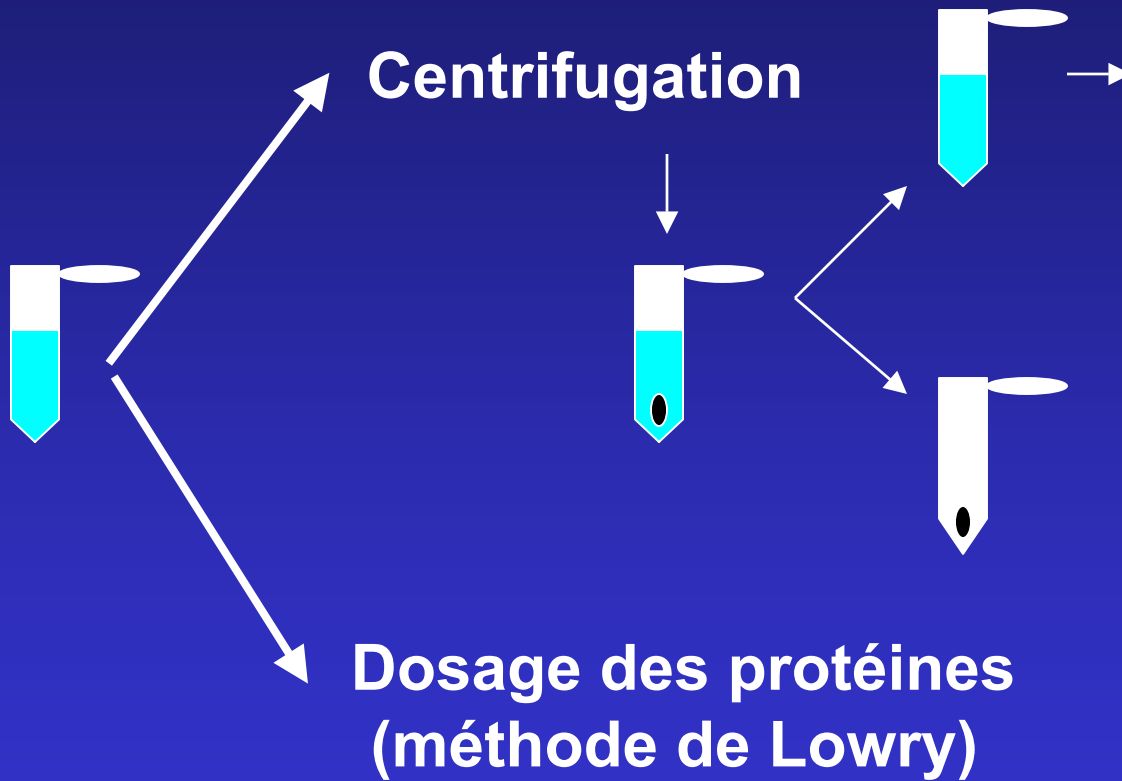
Expériences d'accumulation (1/2)

- Expériences d'accumulation

- conc en antibiotique: 17 μ g/ml (cipro) } 50 μ M
- 20 μ g/ml (moxi) }
- temps d'accumulation (équilibre): 2h
- Agents inhibiteurs
 - Probenecid 5mM, 10mM et 15mM | MRP
 - MK571 100 μ M, 200 μ M et 300 μ M |
 - Verapamil 100 μ M | P-gp
 - Déplétion en ATP | MRP
 - (azide de Na 5mM | P-gp
 - 2-déoxyglucose 60mM)

Expériences d'accumulation (2/2)

- Dosages



antibiotique	excitation	émission
cipro	275nm	450nm
moxi	298nm	504nm
levo	282nm	441nm
gareno	298nm	500nm

Test de viabilité cellulaire (1/2)

A. Vassault, Methods of enzymatic analysis

- **But:** déterminer la toxicité d'une substance vis-à-vis des cellules
- **Principe:** Dosage de la lactate déshydrogénase basé sur la réaction enzymatique



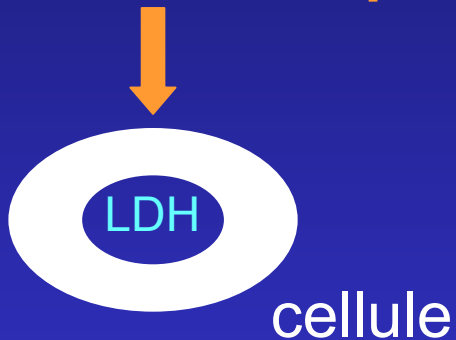
Absorbe à 339nm

→ Mesure de la consommation de NADH

Test de viabilité cellulaire (2/2)

- Interprétation des résultats

Agent non toxique



Agent toxique



Infections intracellulaires (1/2)

- **But:** Relation entre l'accumulation et activité intracellulaire des antibiotiques vis-à-vis de la bactérie *L. monocytogenes*
- **Infection:**
 - inoculum = 7 bactéries/macrophages
 - temps d'infection: 1h
- **Incubation:**
 - contrôle: milieu RPMI + 10% SF décomplémenté
 - antibiotiques (cipro ou moxi): 4µg/ml
 - temps d'incubation:
 - contrôle: 0 et 5h
 - antibiotiques: 5h

Infections intracellulaires (2/2)

- Dosages

- **comptage des bactéries**
- **dosage de protéines**
 - expression de la concentration en bactéries en fonction de la qté de protéines
 - calcul d'un facteur de croissance des bactéries

Western Blot (1/2)

-Principe général

lyse des cellules



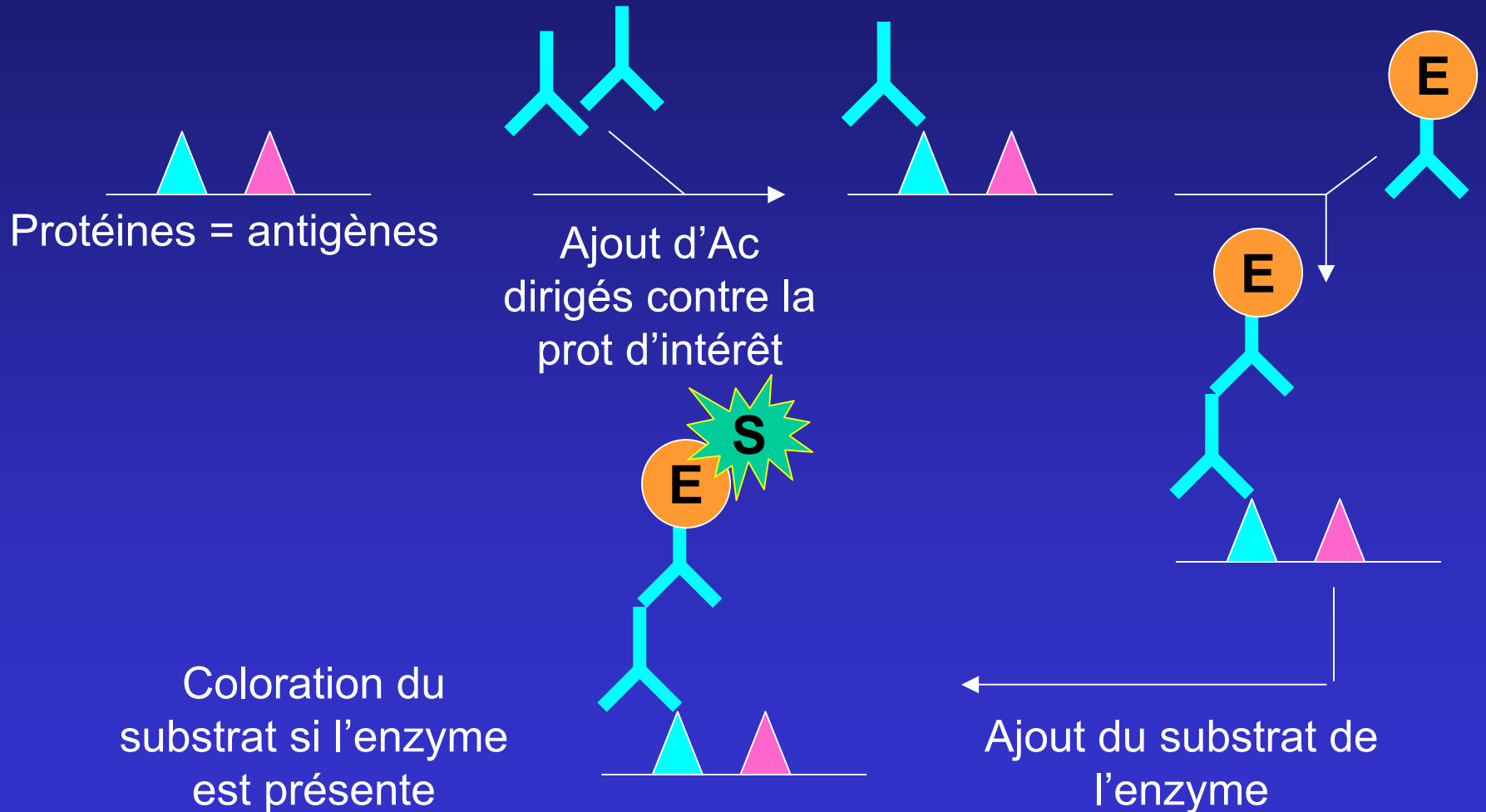
Séparation des protéines
par électrophorèse



Blotting

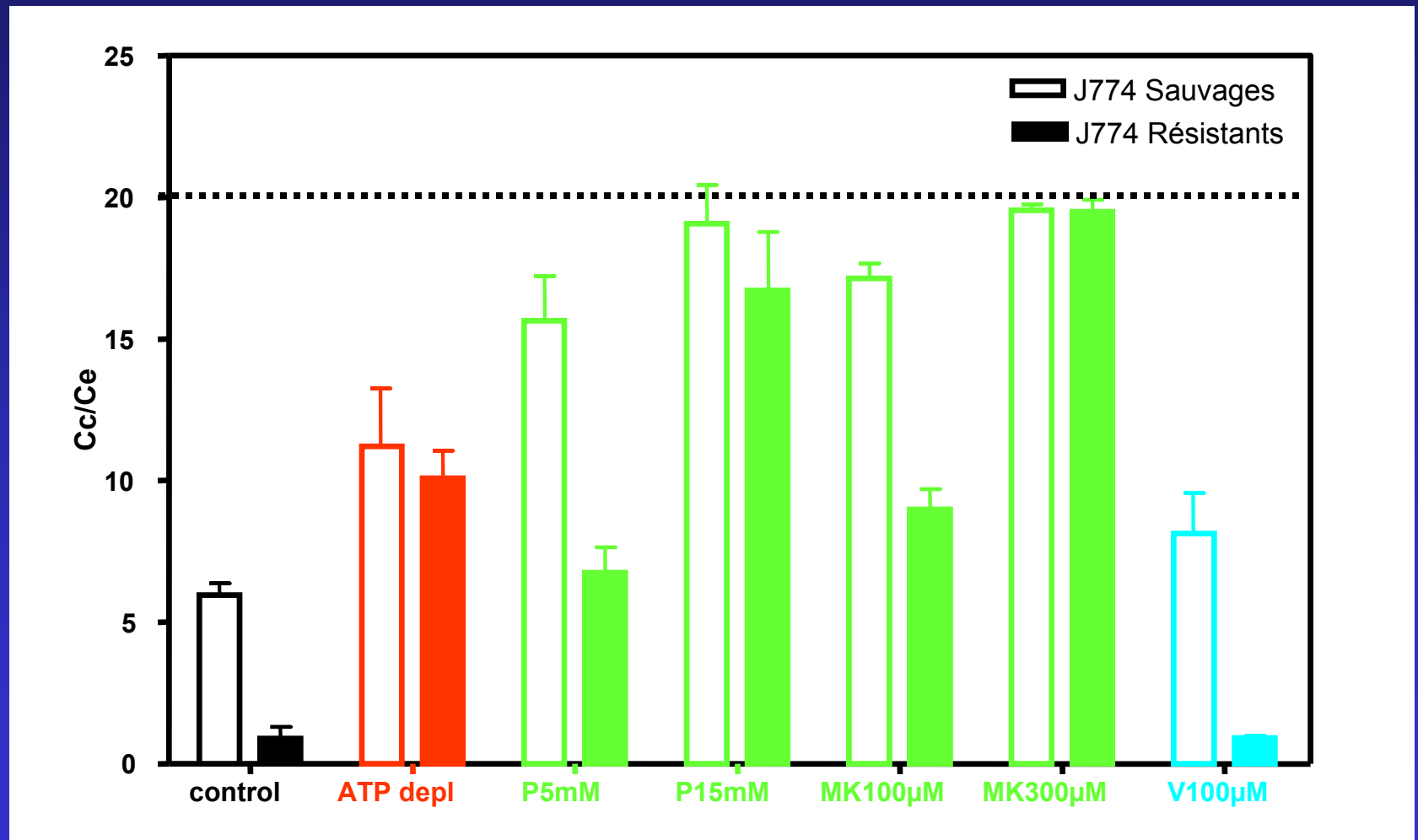


Western Blot (2/2)

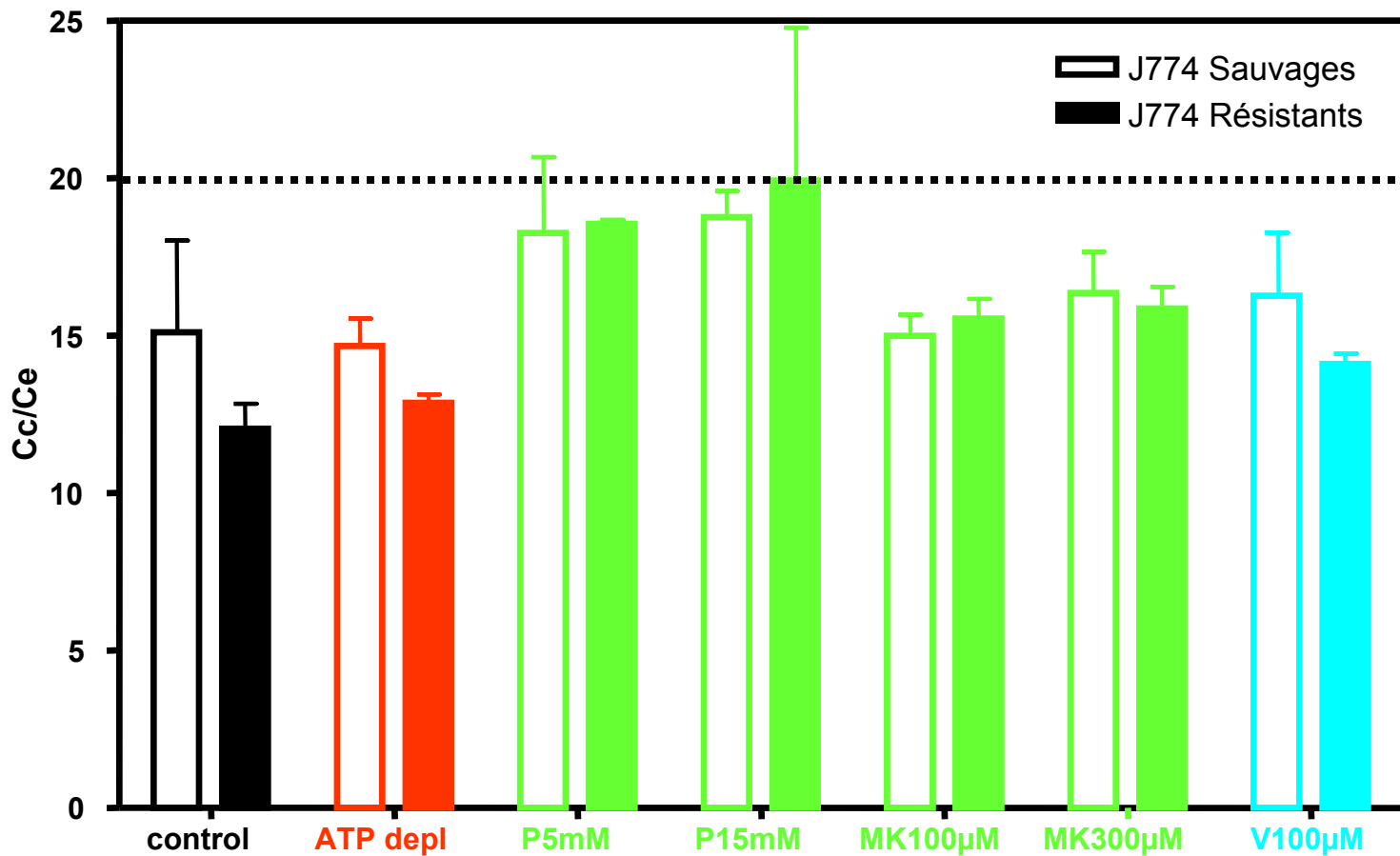


4. Résultats

Accumulation de la **ciprofloxacine** (2h – 50 μ M) dans les macrophages sauvages et résistants à la cipro



Accumulation de la **moxifloxacin** (2h 50 μ M) dans les macrophages J774 sauvages et résistants à la cipro



Interprétation des résultats

- Dans les 2 types cellulaires: moxi > cipro
- Dans les macrophages sauvages



Expression d'un transporteur pour la cipro avec propriétés « MRP-like »

- Dans les macrophages résistants

Nécessité d'une conc en inhibiteur plus élevée pour atteindre une accumulation maximale



↗ Expression et/ou activité du transporteur

5. Perspectives

En cours...

- Comparaison de différentes fluoroquinolones
- Relation dose-effet
- Stabilité du phénotype → révertants
- Infections intracellulaires

Pour la suite...

-Morphologie

-Western-blot

en fonction de l'avancement des travaux de biologie moléculaire effectués en parallèle