



Université Catholique de Louvain  
Ecole des Sciences Biomédicales  
Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire

# L'efflux actif comme mécanisme d'interactions médicamenteuses : compétition entre fluoroquinolones et AINS pour un même transporteur dans un modèle de macrophages J774.

Mémoire présenté par Fanny Huyghe

Promoteur : Prof. F Van Bambeke

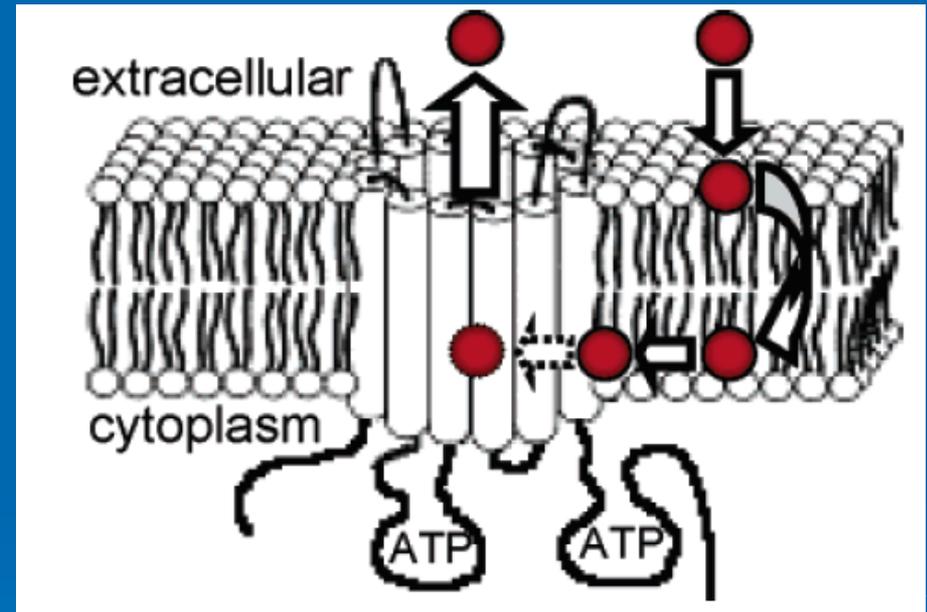
2006-2007

# Introduction



# Les transporteurs

- Protéines membranaires ubiquitaires
- import de nutriments (bactéries);  
export de toxines, déchets, ...
- Eucaryotes : pompes ATP-dépendantes  
= Famille ATP-Binding Cassette (ABC)



# Modèle cellulaire

- Macrophages J774 sauvages

  - accumulation de la ciprofloxacine en présence d'un inhibiteur de pompes

➡ efflux ralenti

- Sélection de macrophages résistants à la cipro. par exposition chronique à ds conc. croissantes

➡ réduction de l'accumulation

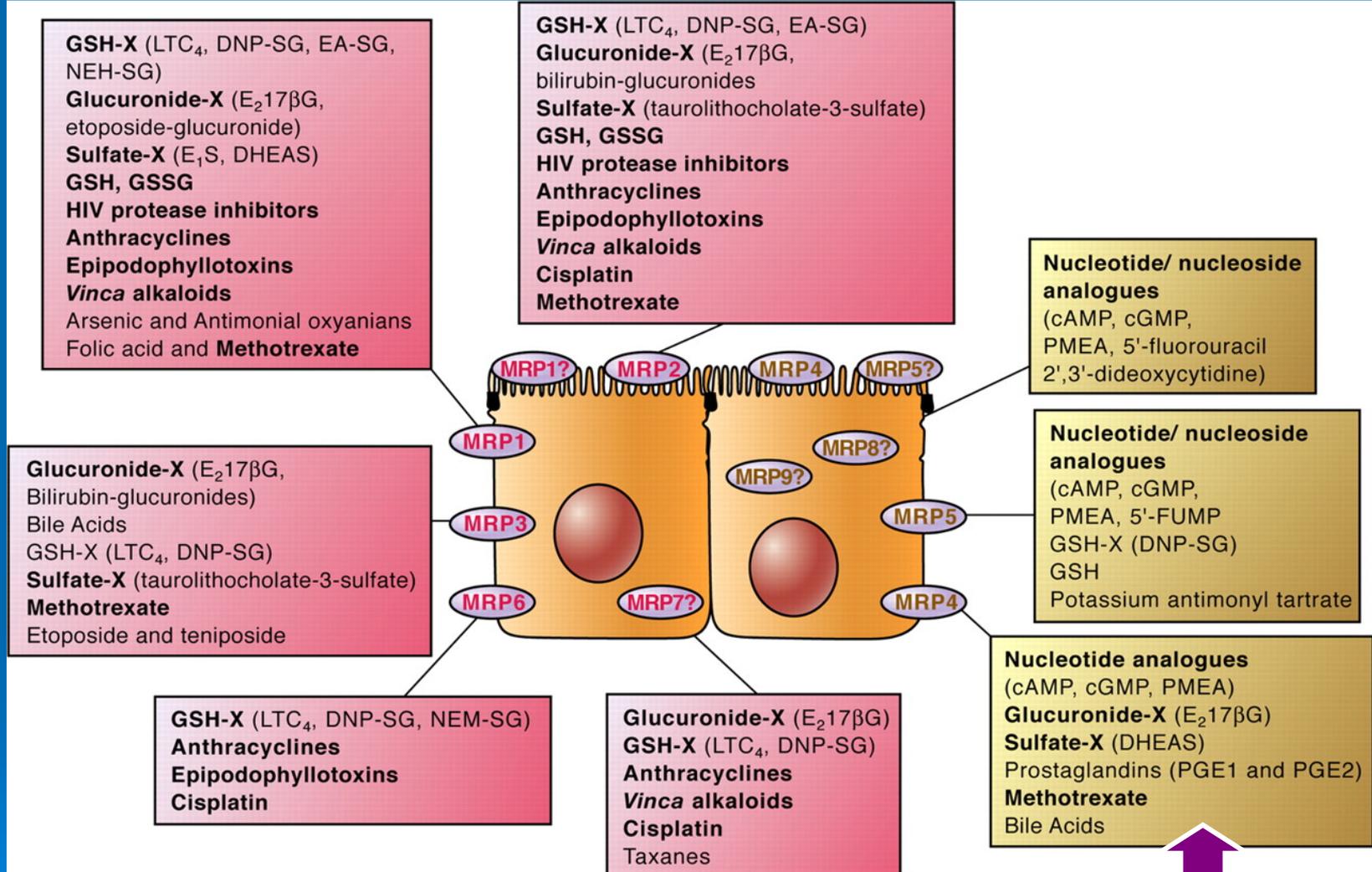
- ➤ accumulation de la cipro. en conditions de déplétion d'ATP

➡ transporteur ABC

- ➤ accumulation de la cipro. en présence d'un inhibiteur spécifique des MRP

➡ transporteur MRP

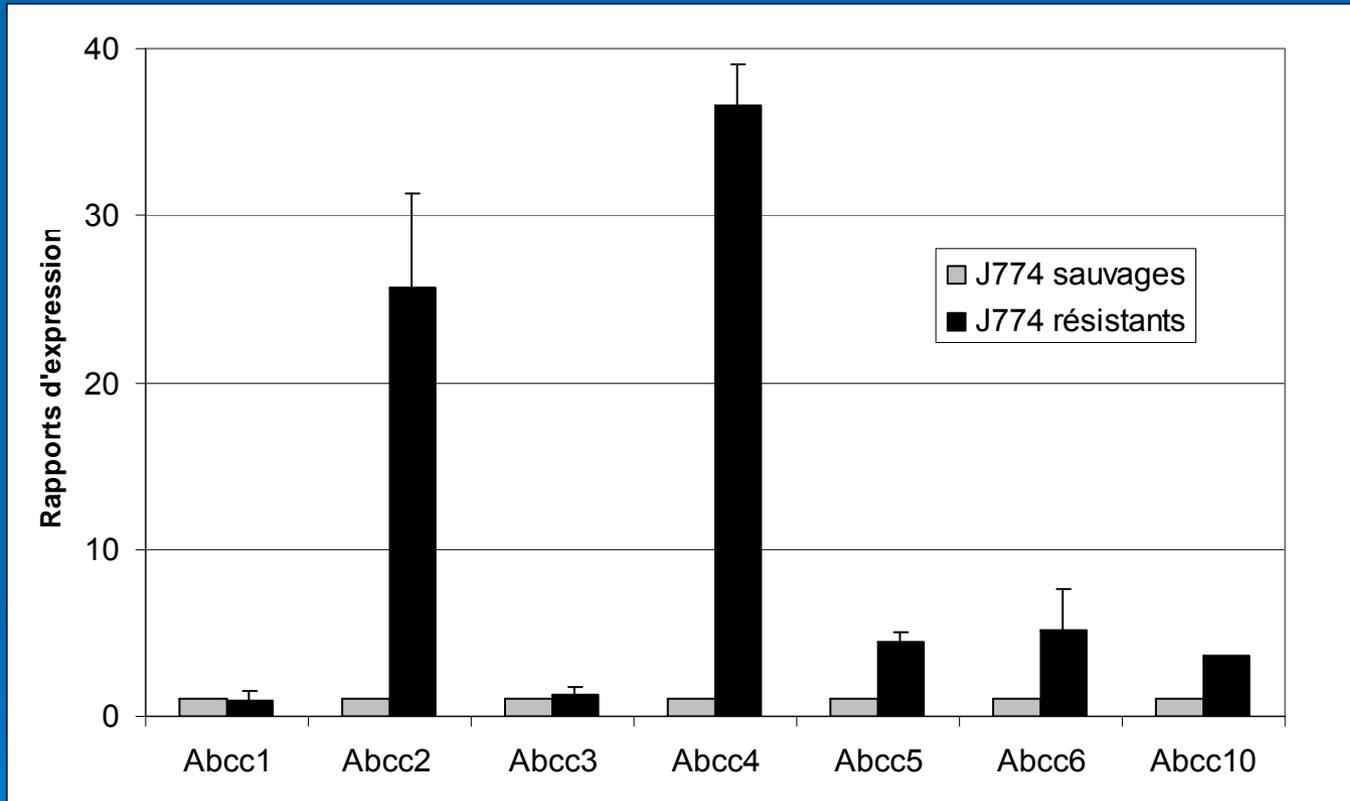
# Large spécificité de substrats



Deeley et al. 2006. *Physiol Rev* 86:849-899.

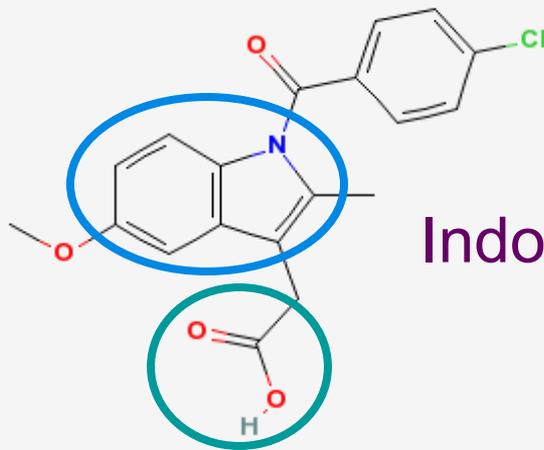
# Identification du transporteur de ciprofloxacine: expression des ARNm codant pour les MRP

Augmentation des ARNm de la MRP2 et de la MRP4 d'un facteur 20-30



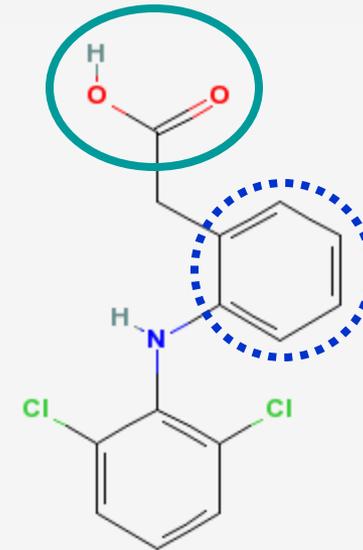
Marquez-Garrido.2006

# Les AINS, inhibiteurs préférentiels de MRP4



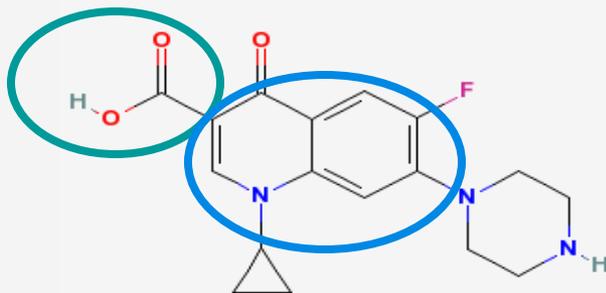
Indométacine

(1-[4 chlorobenzoyl]-5-methoxy-2-methylindole -3-acetic acid)



Diclofenac

2-[2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetic acid



Ciprofloxacin

# Les AINS, inhibiteurs préférentiels de MRP4

## Effets des AINS sur le transport de E<sub>2</sub>17βG

NSAID	μM	MRP4
Indomethacin	1	68 ± 2
	5	56 ± 8
	50	11 ± 3
Diclofenac	100	61 ± 2

Les vésicules membranaires Sf9 surexprimant MRP4 sont incubées avec une concentration de 1 μM [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>17βG pendant 2 minutes. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle et correspondent aux moyennes ± SE de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Reid *et al.* 2003. PNAS, 100:9244-9249.

# Objectifs



# Objectifs

- Compétition potentielle entre la ciprofloxacine et les AINS pour un transporteur d'efflux de la ciprofloxacine
  - caractérisation de l'accumulation des AINS dans les J774
  - comparaison de la capacité des AINS et d'inhibiteurs connus de MRP à augmenter l'accumulation de la ciprofloxacine
  - réciproquement, caractérisation de l'accumulation des AINS en présence de ciprofloxacine et d'inhibiteurs connus des MRP
  - caractérisation de l'accumulation de la ciprofloxacine et des AINS dans des cellules surexprimant un type de MRP

# Matériel - Méthodes de dosage



# Modèles cellulaires

## Modèles expérimentaux utilisés:

macrophages J774 sauvages et résistants

cellules MDCK sauvages et surexprimant MRP1  
ou MRP2

# Méthodes de dosage



HPLC - colonne RP C18  
- T° des échantillons: 4°C

Indométacine : acétonitrile / tampon acide acétique 0.1M pH 2.8  
(78/22), flux 1 ml/min

$\lambda$  254 nm Chauhan et al. 2003. Journal of Controlled Release 90 : 335-343.

Diclofenac : acétonitrile / tampon acétate de sodium 0.075M pH 5  
(57/43), flux 0.75 ml/min

$\lambda$  280 nm Kaphalia et al. 2006. Journal of Chromatography B 830 : 231-237.

Ciprofloxacin : acétonitrile / tampon phosphate 0.025M pH 3  
(20/80), flux 1 ml/min

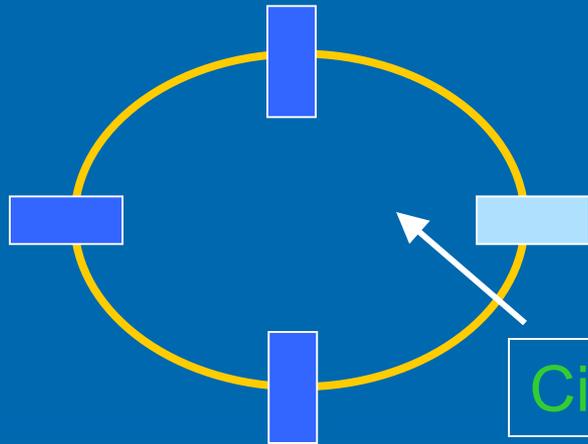
$\lambda$  275 nm Al-Dgither et al. 2006. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41 : 251-255.

# Méthodes expérimentales- Résultats

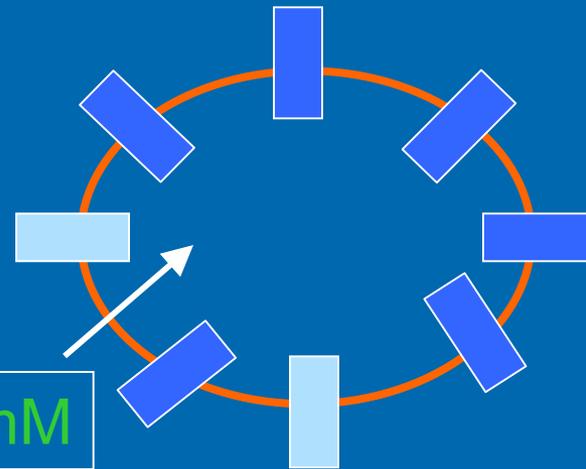


# Compétition AINS/ Cipro : Accumulation de ciprofloxacin

## Cellules sauvages



## Cellules résistantes



Cipro 0,05 mM

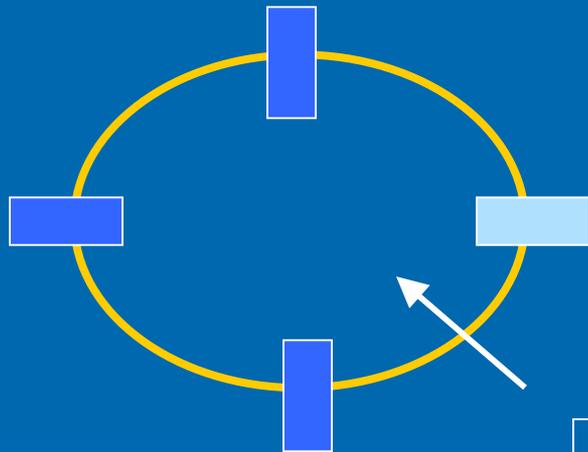
MRP4  
MRP2

Les incubations ont  
toutes été réalisées  
pendant 6h.

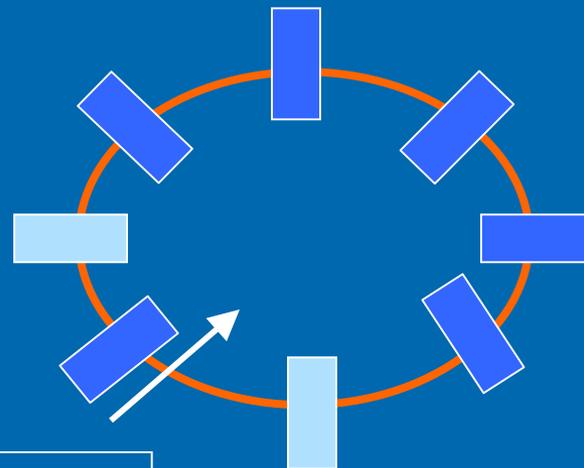
+ Gemfibrozil  
OU  
+ AINS à conc. élevée

# Compétition AINS/Cipro : Accumulation des AINS

## Cellules sauvages



## Cellules résistantes



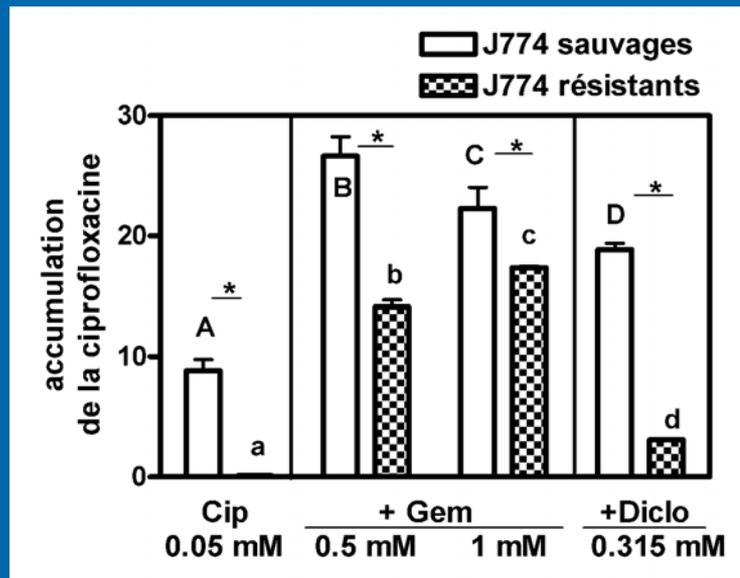
AINS 0,05 mM

ou + Gemfibrozil  
+ Cipro à conc. élevée

MRP4  
MRP2

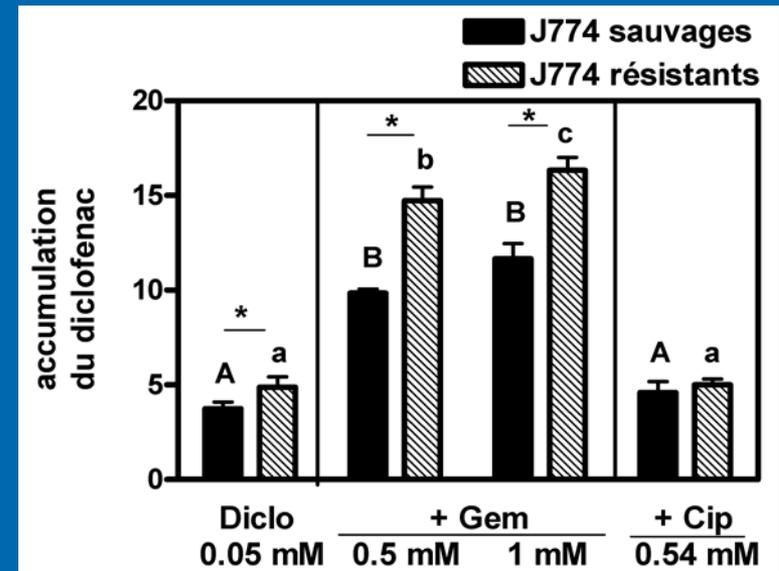
# Compétition Ciprofloxacine/Diclofenac

Accumulation de la **ciprofloxacine**



→ ↑ de l'accumulation de la cipro en présence de diclofenac dans les J774 sauvages essentiellement

Accumulation du **diclofenac**



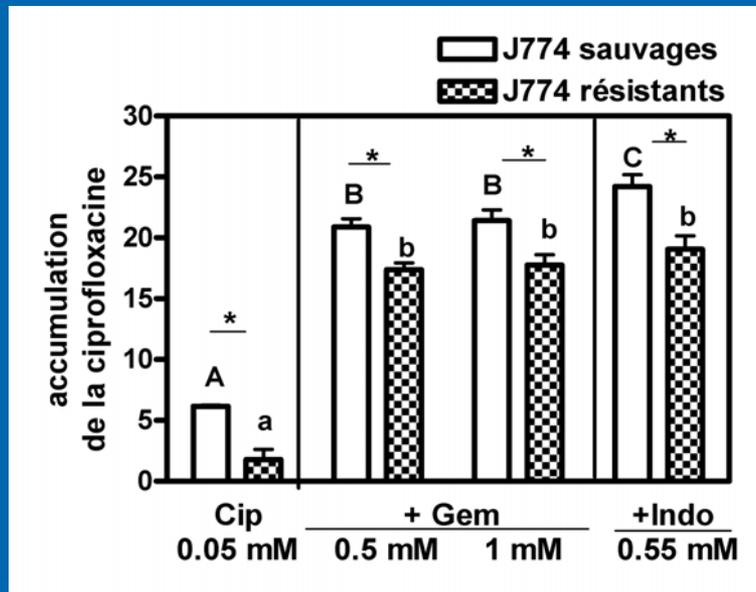
→ Pas de différence majeure d'accumulation dans les J774 sauvages et résistants

→ ↑ de l'accumulation du diclo en présence de gemfibrozil

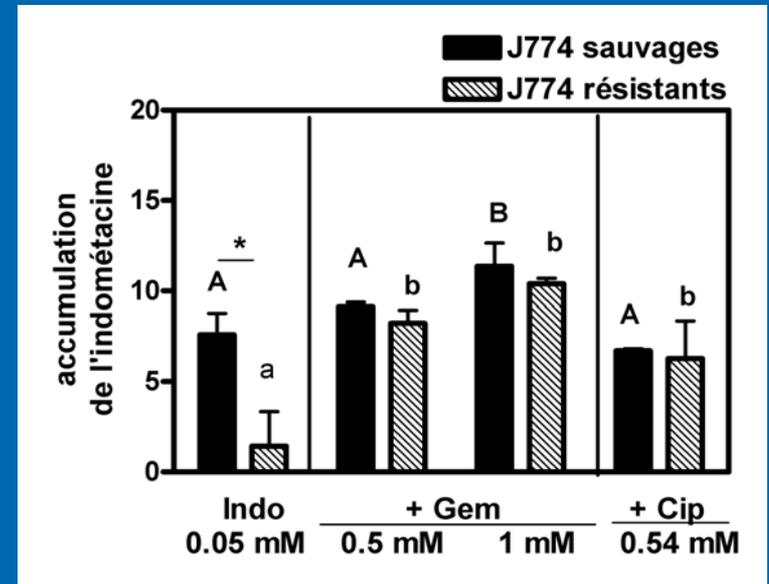
→ Aucune influence de la cipro sur l'accumulation du diclofenac

# Compétition Ciprofloxacine/Indométacine

Accumulation de la ciprofloxacine



Accumulation de l'indométacine



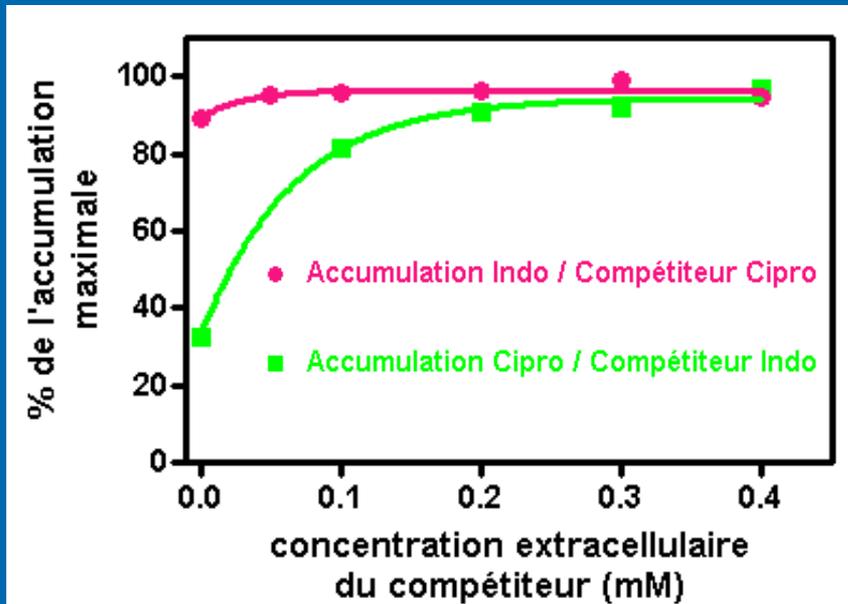
→ ↑ de l'accumulation de la cipro en présence d'indométacine dans les J774 sauvages et résistants

→ Indo s'accumule moins dans les J774 résistants

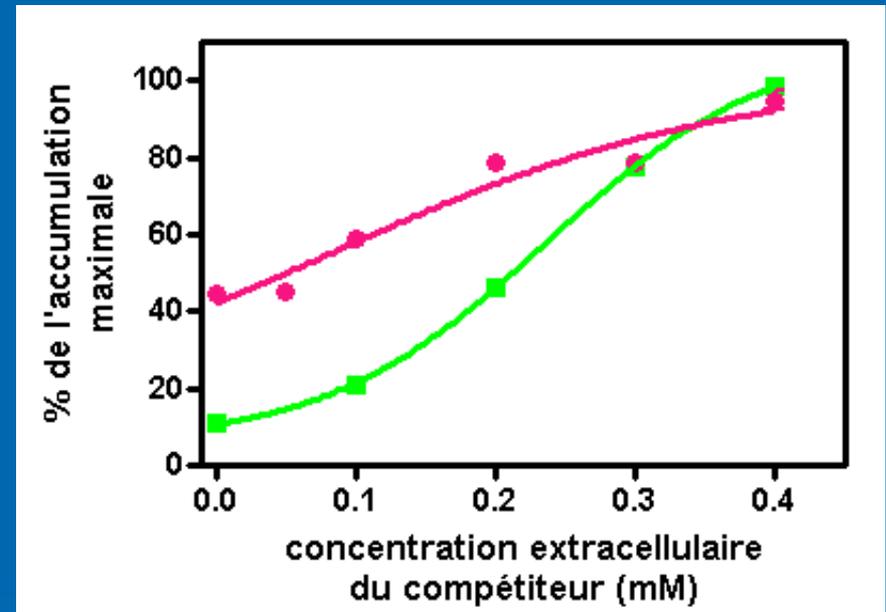
→ La cipro restaure l'accumulation de l'indo dans les J774 résistants

# Cross-compétition : ciprofloxacine/indométacine

Cellules sauvages



Cellules résistantes

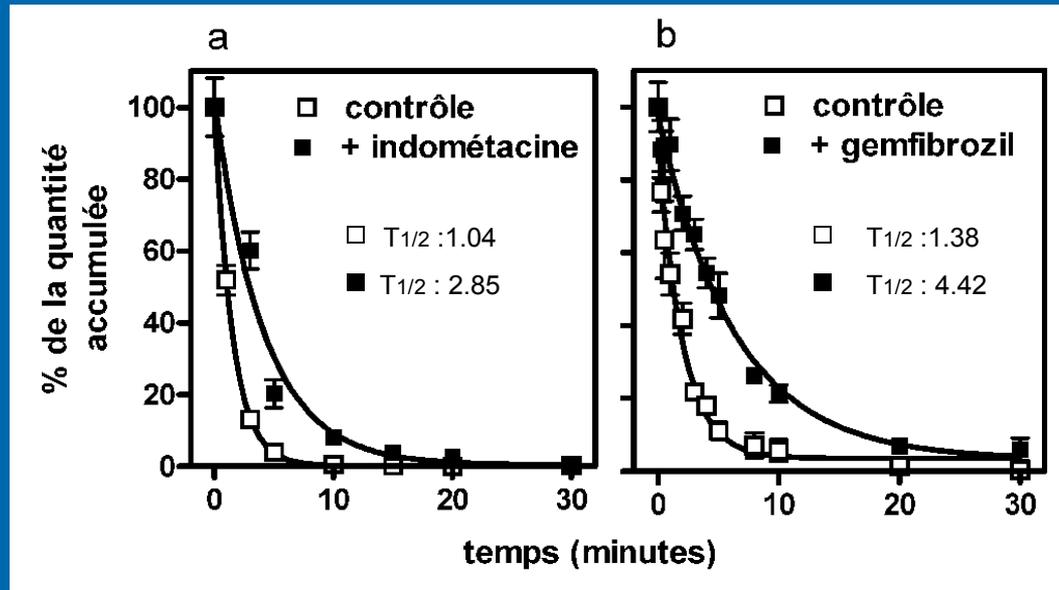


→ Aucune influence de la cipro sur l'accumulation de l'indo

→ Effet maximal d'accumulation de la cipro dès la conc de 0.1 mM d'indo

→ Les 2 médicaments augmentent l'accumulation l'un de l'autre

# Efflux de la ciprofloxacine en présence d'inhibiteurs dans les J774 sauvages



Incubation des cellules avec 0,05 mM de cipro pendant 6h (a) ou 2h (b), remplacement du milieu par du milieu frais, sans agent pharmacologique ou additionné (a) d'indométacine 0,55 mM ou (b) de gemfibrozil 1mM.



Efflux de la ciprofloxacine rapide en absence d'inhibiteur



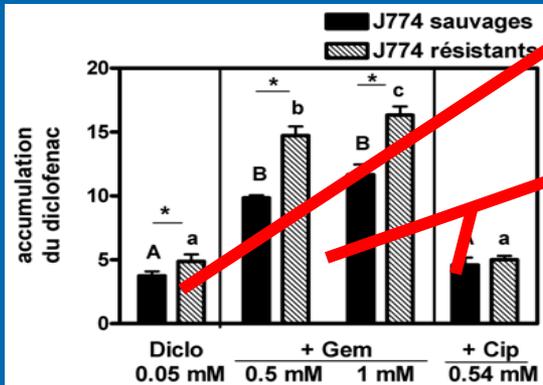
Indométacine et gemfibrozil ralentissent, tous les 2, l'efflux de la ciprofloxacine

# Conclusions



# Conclusions : Diclofenac

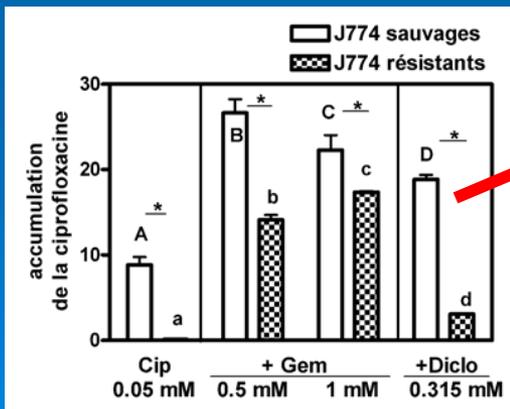
- accumulation influencée par la concentration



- accumulation semblable dans les J774 sauvages et résistants

- ↑ de son accumulation en présence de gemfibrozil mais pas en présence de cipro

- accumulation semblable dans les MDCK sauvages et surexprimant MRP1 ou MRP2



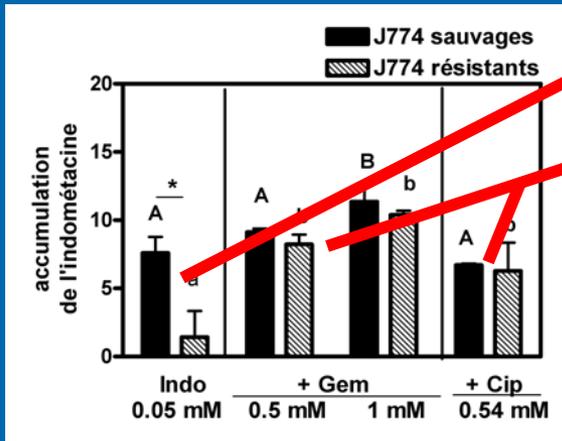
- ↑ de l'accumulation de la ciprofloxacin dans les J774 sauvages essentiellement

→ Inhibiteur moins puissant du transporteur de la cipro

→ Transporteur différent de celui de la cipro

# Conclusions : Indométacine

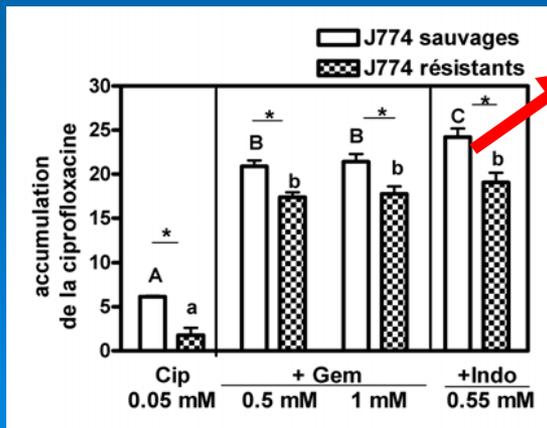
- accumulation indépendante de la concentration



- s'accumule moins dans les cell. cipro-résistantes

- ↑ de son accumulation en présence de gemfibrozil et de ciprofloxacine

- accumulation semblable du médicament dans les MDCK sauvages et surexprimant MRP1 ou MRP2

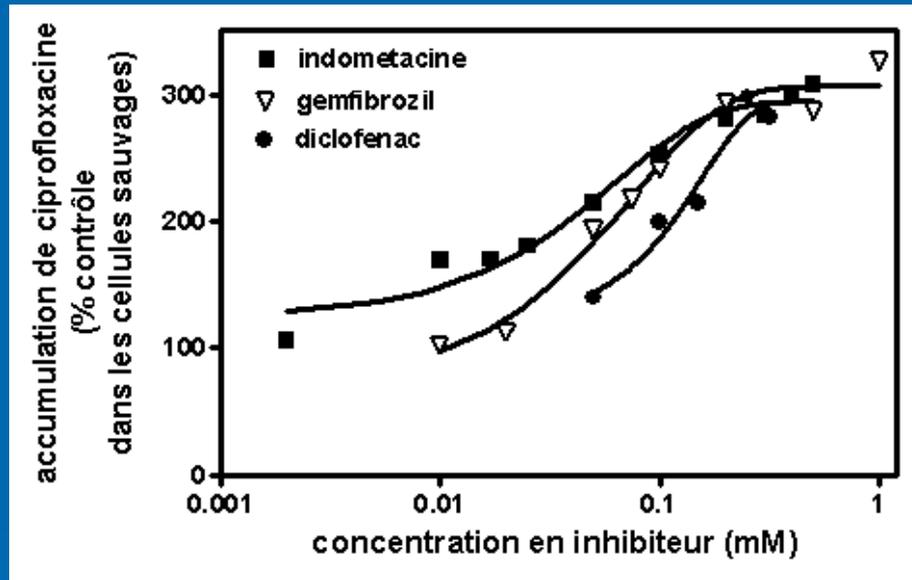


- ↑ de l'accumulation de ciprofloxacine dans les J774 sauvages et résistants

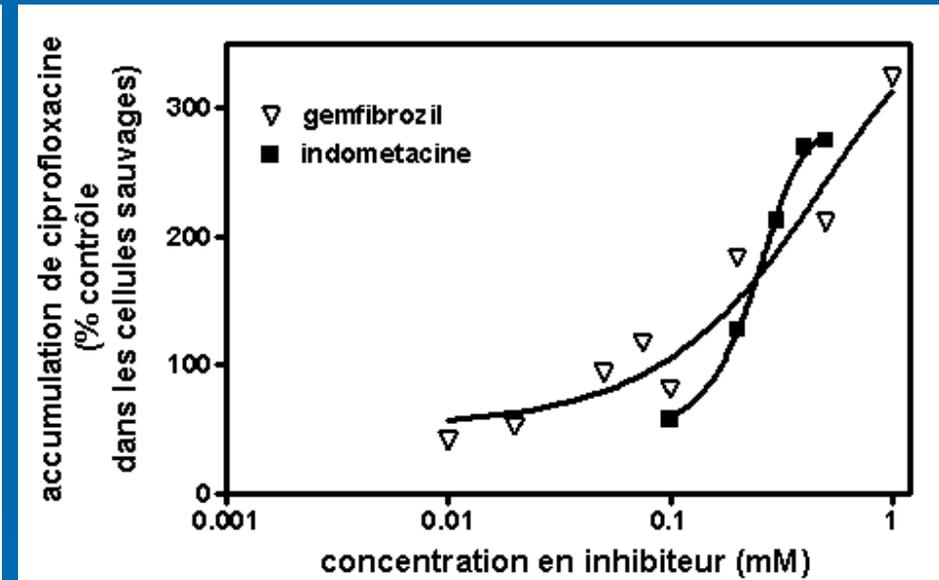
→ Inhibiteur puissant du transporteur de la cipro  
 → Transporteur en commun avec celui de la cipro  
 → MRP4 ?

# Inhibiteurs du transporteur de la ciprofloxacine

## Cellules sauvages



## Cellules résistantes



→ Indométacine > Gemfibrozil > Diclofenac

→ Gemfibrozil ~ Indométacine

# Perspectives



# Perspectives

## ➤ À court terme:

- vérifier la surexpression de MRP1 et MRP2 dans les MDCK
- étudier la compétition cipro/AINS dans des MDCK surexprimant MRP4 ou dans des cellules knockout pour ce gène
- étudier le transport du diclofenac dans des cellules surexprimant MRP3

# Perspectives

## ➤ À long terme:

- étudier le transport de la ciprofloxacin dans des vésicules
- étudier in vivo les interactions médicamenteuses potentielles entre AINS/cipro
- étudier les conséquences des modifications des concentrations cellulaires des médicaments sur leur activité

# Remerciements

Merci à

ma promotrice, F. Van Bambeke

M-P. Mingeot, P. Tulkens

toute l'équipe FACM

Merci pour votre  
attention

