



Université catholique de Louvain
Faculté de Médecine
Ecole des Sciences Biomédicales

**Caractérisation des transporteurs effluant les antibiotiques
dans des macrophages et des cellules épithéliales MDCK :
études de compétition entre
la ciprofloxacine (fluoroquinolone) et l'ampicilline (β -lactame)**

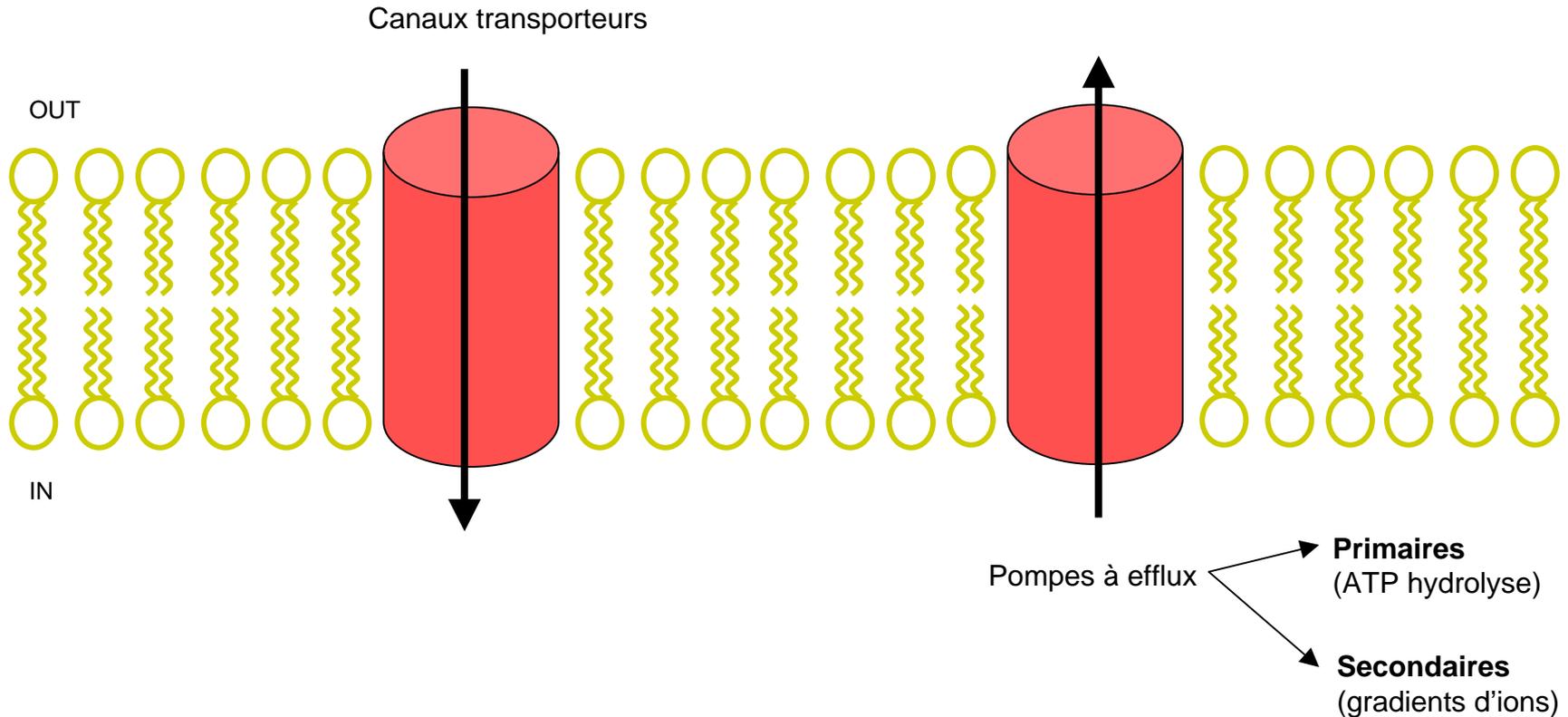
Présentation du mémoire de SBEX 22

Brancovianu Lavinia

Promoteur : **Pr. Françoise Van Bambeke**

Unité de Pharmacologie cellulaire et moléculaire

Transporteurs transmembranaires



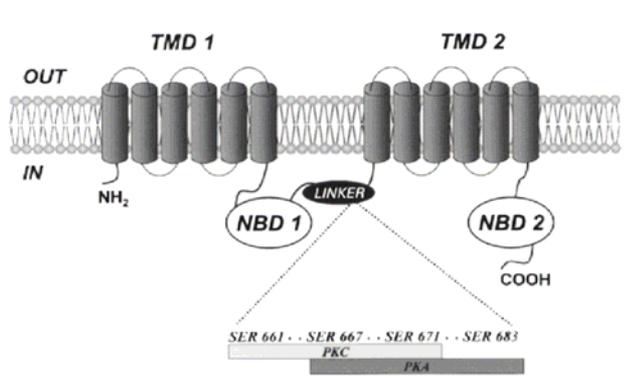
Molécules hydrophiles : ne diffusent pas → transporteurs d'entrée

Molécules amphiphiles : diffusent → transporteurs de sortie

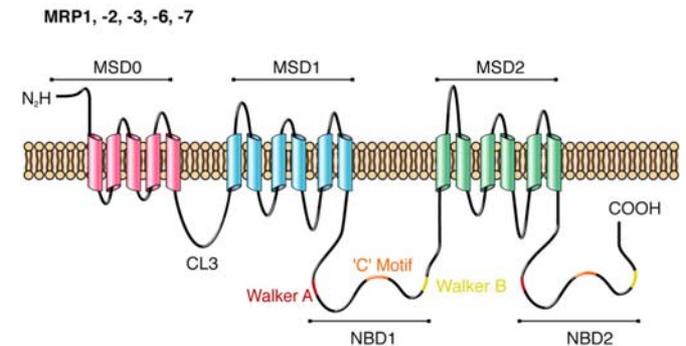
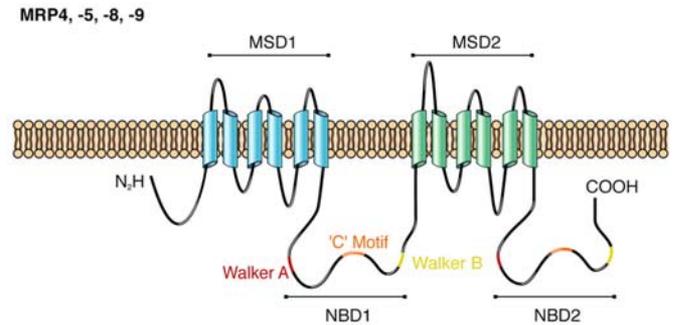
Transporteurs ABC multidrogues

P-glycoprotéine (cations amphiphiles)
(ABCB)

MRP (anions amphiphiles)
(ABCC)
ABC protein topology

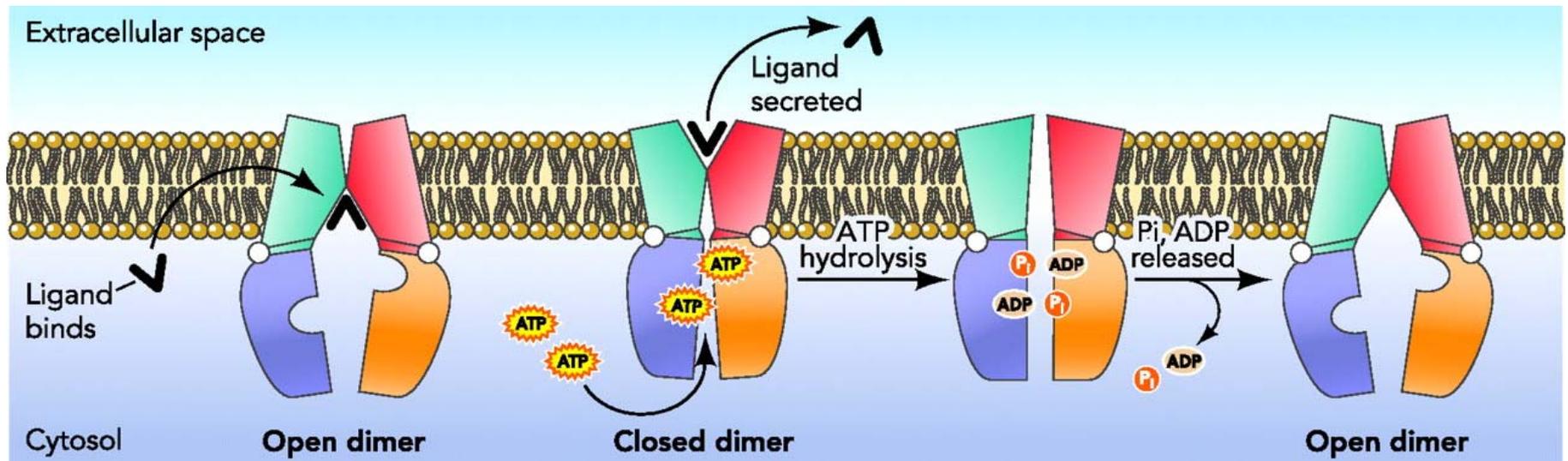


(Idriss et al, 2000)



(Deeley et al., 2006)

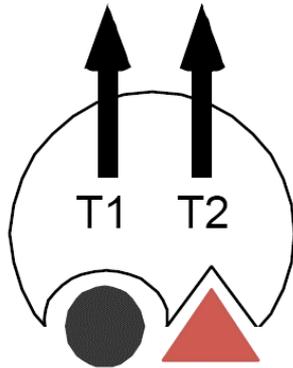
Mécanismes de transport par les MRP (1/2)



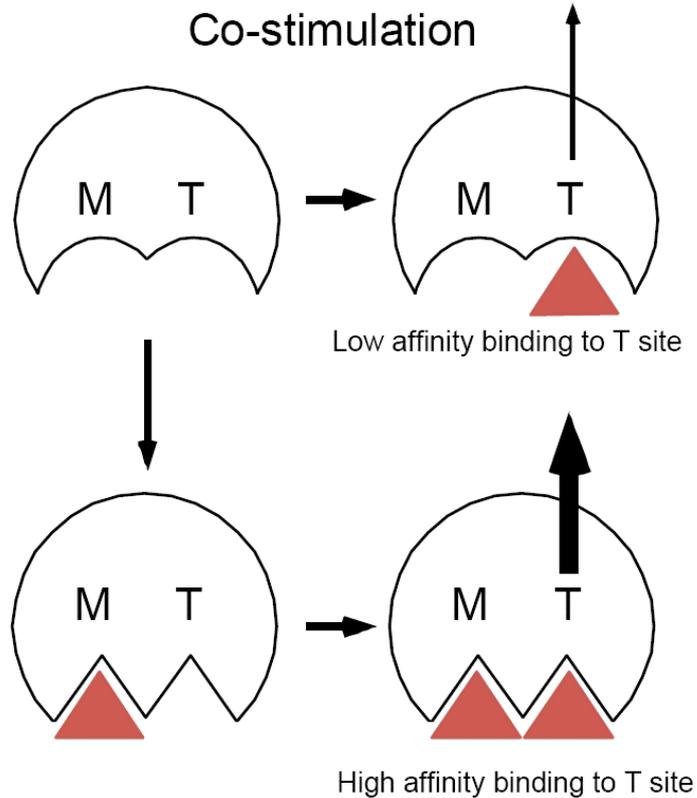
(Linton, 2007)

Mécanismes de transport par les MRP (2/2)

Co-transport



Co-stimulation

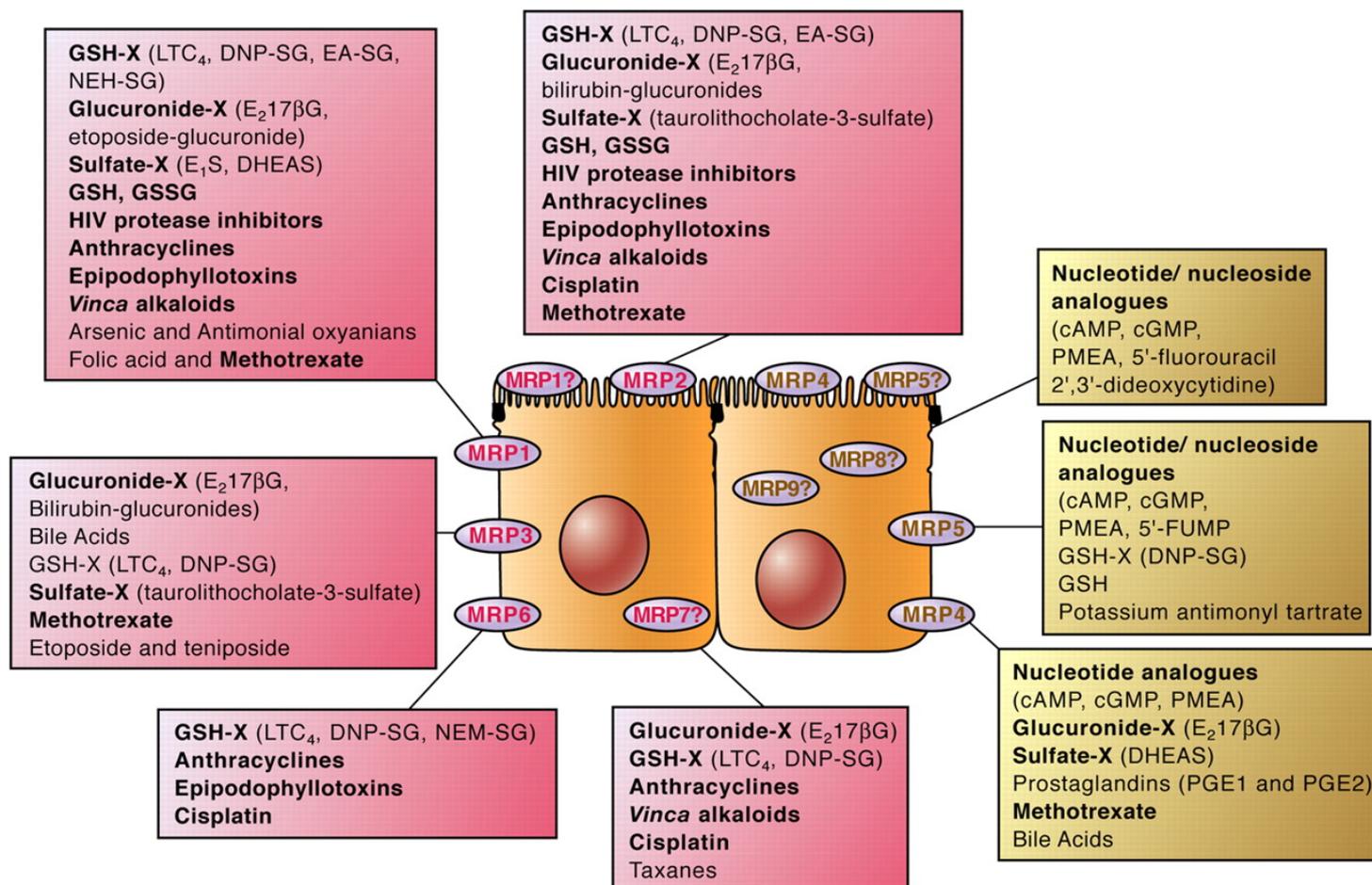


Site M: site de Modulation

Site T: site de Transport

Borst *et al.* 2006. *Cancers Letters* 234:51-61.

Localisation et spécificité de substrats des MRP



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

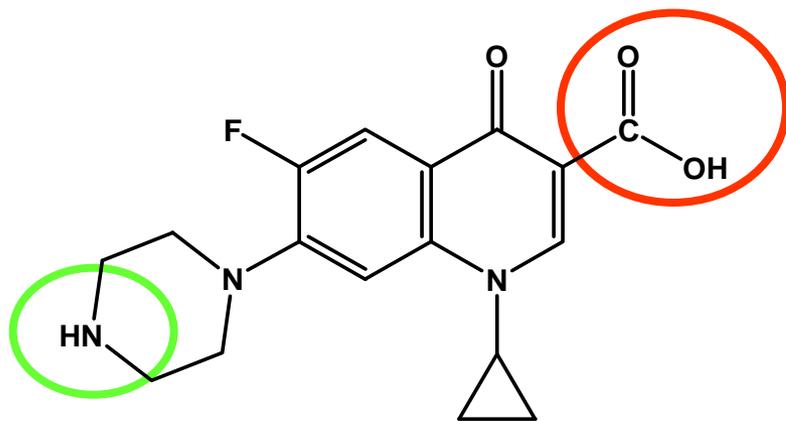
Pharmacophore des MRP

La reconnaissance des substrats par le MRP est basée sur des propriétés physico-chimiques telles que l'aromaticité, l'hydrophobicité, un caractère ionisable ou la capacité à former des ponts hydrogène.



But : Etudier la compétition entre deux antibiotiques amphiphiles et zwitterioniques

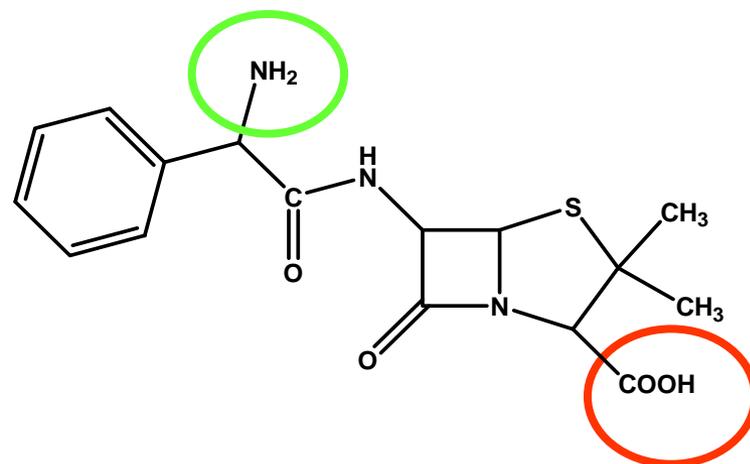
Ciprofloxacin



Substrat d'une pompe MRP :
MRP2 et/ou MRP4



Ampicilline



Pas d'évidence rapportée pour un transport
par une pompe à efflux

Transport de la ciprofloxacine par une MRP

Précédentes études réalisées au laboratoire FACM

■ Michot et al. 2004 : caractérisation phénotypique

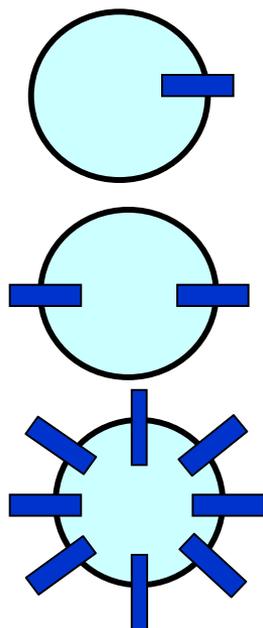
Accumulation ciprofloxacine / en cas de :

- ATP déplétion
- présence d'inhibiteurs d'anions (Gemfibrozil, Probenécide)
- présence d'inhibiteurs spécifiques des MRP (MK 571)

■ Michot et al. 2006 : obtention de cellules surexprimant les transporteurs

Transport de la ciprofloxacine par une MRP

Obtention de macrophages ciprofloxacine-résistants

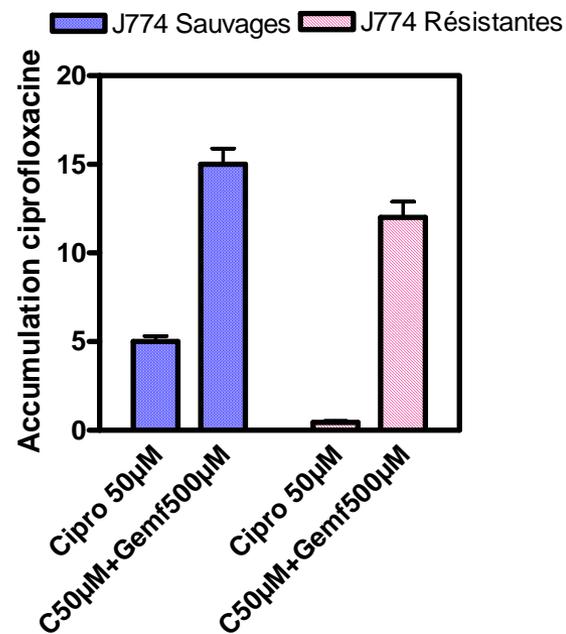


34mg/L (0.1mM) 4 semaines

51mg/L (0.15mM) 3 semaines

68mg/L (0.2mM) 6 mois

Accumulation ciprofloxacine dans les J774



Michot *et al.* 2006. Antimicrob. Agents Chemother 50: 1689-1695.

Transport de la ciprofloxacine par une MRP

Précédentes études réalisées au laboratoire FACM

■ Michot et al. 2004 : caractérisation phénotypique

Accumulation ciprofloxacine ↗ en cas de :

- ATP déplétion
- présence d'inhibiteurs d'anions (Gemfibrozil, Probenécide)
- présence d'inhibiteurs spécifiques des MRP (MK 571)

■ Michot et al. 2006 : obtention de cellules surexprimant les transporteurs

Obtention de macrophages ciprofloxacine-résistants

■ Marquez-Garrido (en cours)

Les macrophages J774 résistants surexpriment MRP2 et MRP4

Canevas général des expériences d'accumulation

■ **Types cellulaires**

Macrophages J774 sauvages ou résistants

ou

Cellules MDCK sauvages ou transfectées par MRP1, MRP2, Pgp

■ **Types d'expériences**

- Incubations des cellules avec l'antibiotique \pm gemfibrozil

 - Cinétique → incubations 6h

 - Dose-effet

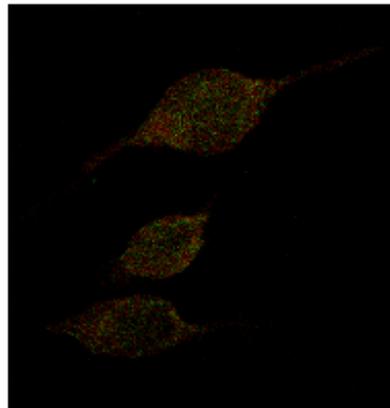
- Compétition entre deux antibiotiques

■ **Dosage fluorimétrique des antibiotiques et dosage des protéines cellulaires**

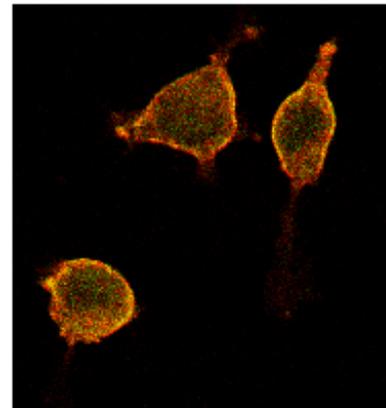
Expression des résultats en facteur d'accumulation

Etudes sur les J774

Macrophages sauvages



Macrophages résistants

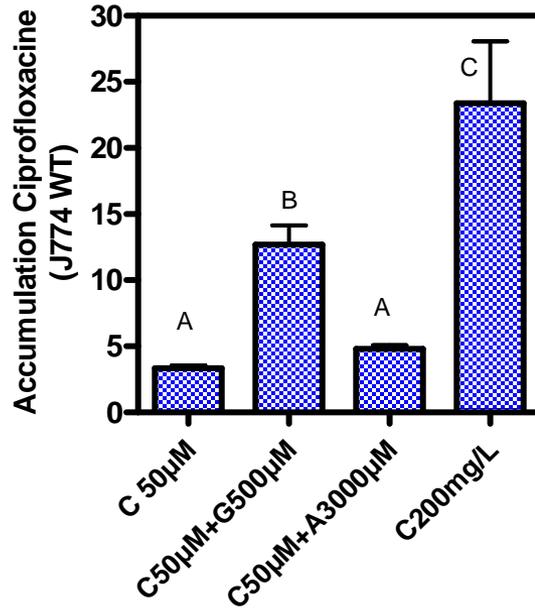


MRP2
MRP4

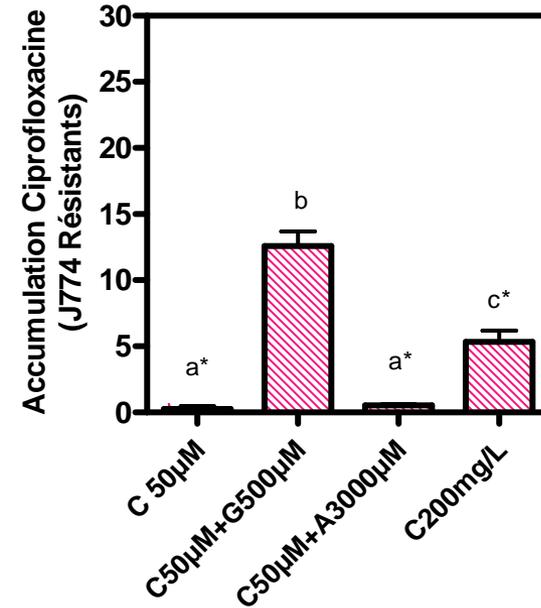
- **Macrophages sauvages** : niveau d'expression de base de la MRP2 et MRP4 ainsi que de la MRP1 (Michot et al., 2004) et de la Pgp (Lemaire et al., 2007)
- **Macrophages résistants** : expression de la MRP2 ↗ et de la MRP4 ↗↗

Accumulation de ciprofloxacine dans les macrophages J774

J774 Sauvages



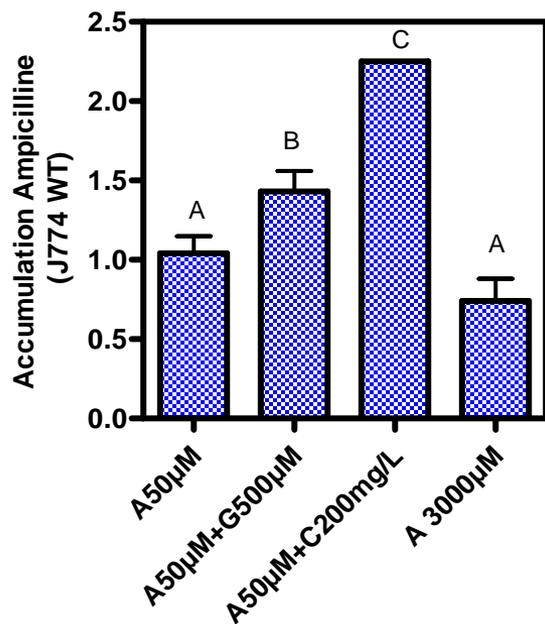
J774 Résistants



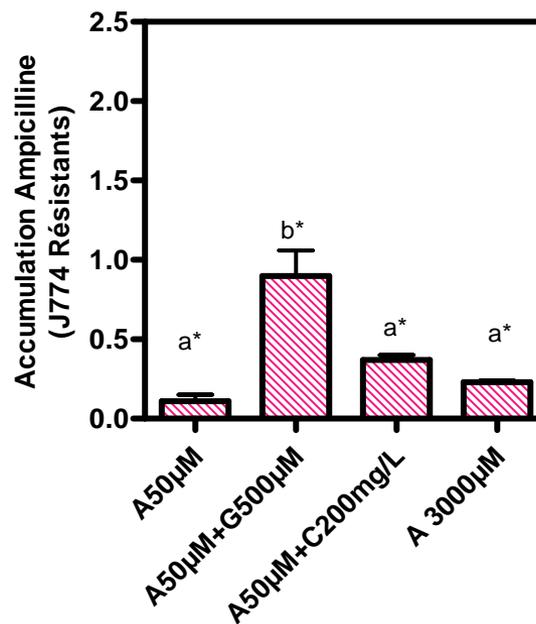
- J774 résistants < sauvages
- Effet du gemfibrozil
- Pas d'effet de l'ampicilline
- Dose-dépendante

Accumulation d'ampicilline dans les macrophages J774

J774 Sauvages



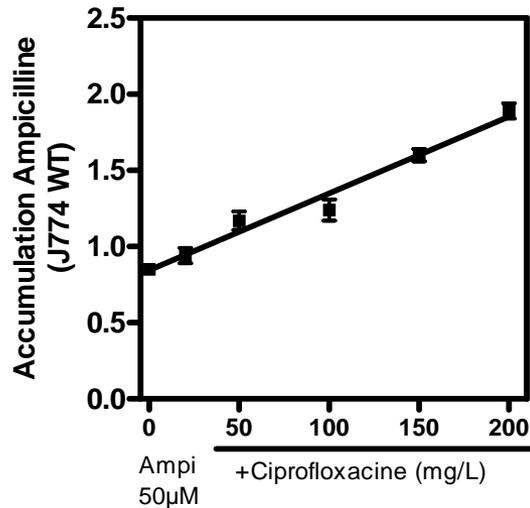
J774 Résistants



- J774 résistants < sauvages
- Effet du gemfibrozil plus marqué dans les résistants
- Effet de la ciprofloxacine
- Pas dose-dépendante

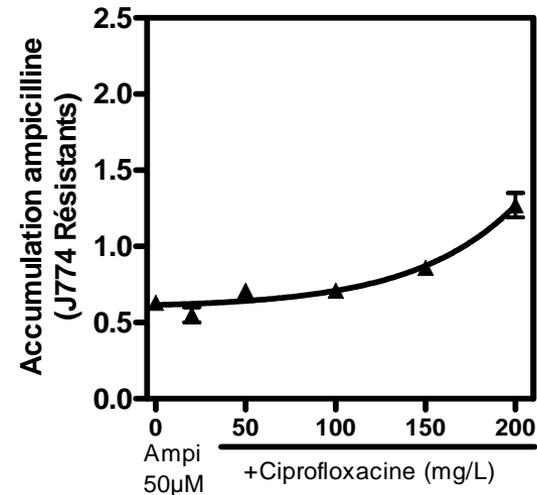
Accumulation d'ampicilline dans les macrophages J774 Effet-dose de la ciprofloxacine

J774 Sauvages



Effet dose-dépendant

J774 Résistants

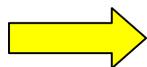


Effet ne se manifeste clairement que pour 200mg/l Ciprofloxacine
→ Pourrait dépendre de la concentration cellulaire

Conclusions des expériences réalisées sur les J774

1. Accumulation de la ciprofloxacine

- Plus faible dans les J774 résistants que dans les sauvages
- Effet gemfibrozil J774 résistants < sauvages
- Pas d'effet de l'ampicilline



Implication de la MRP2 et/ou MRP4

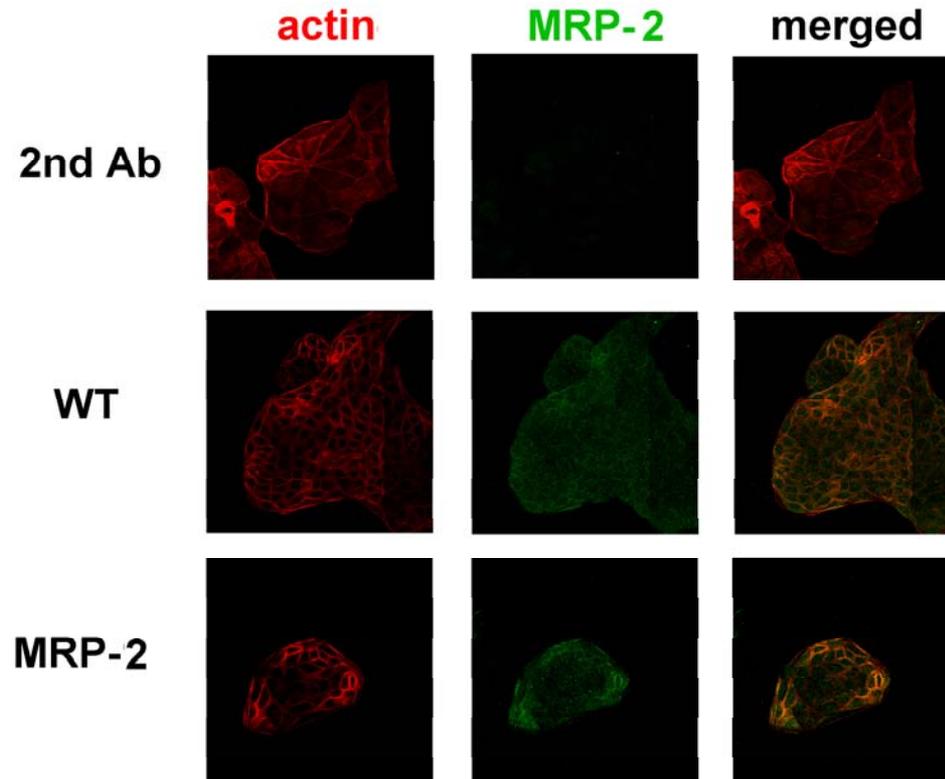
2. Accumulation de l'ampicilline

- Plus faible dans les J774 résistants que dans les sauvages également
- Effet gemfibrozil J774 résistants <<< sauvages
- Augmentée par la ciprofloxacine 2-3x



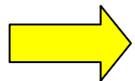
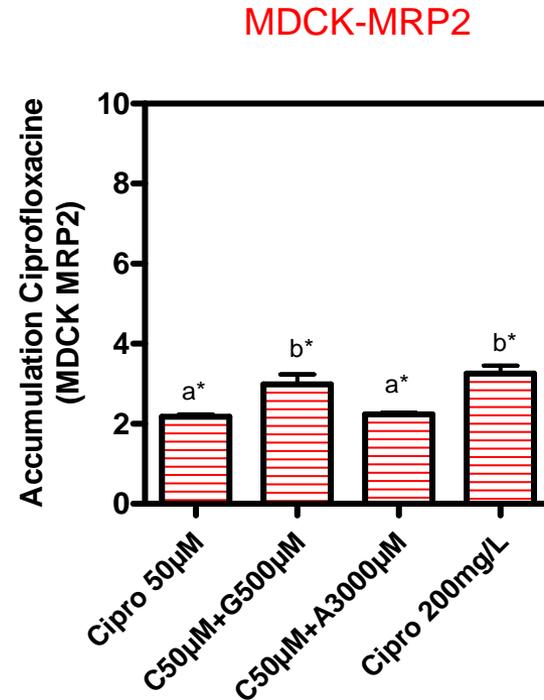
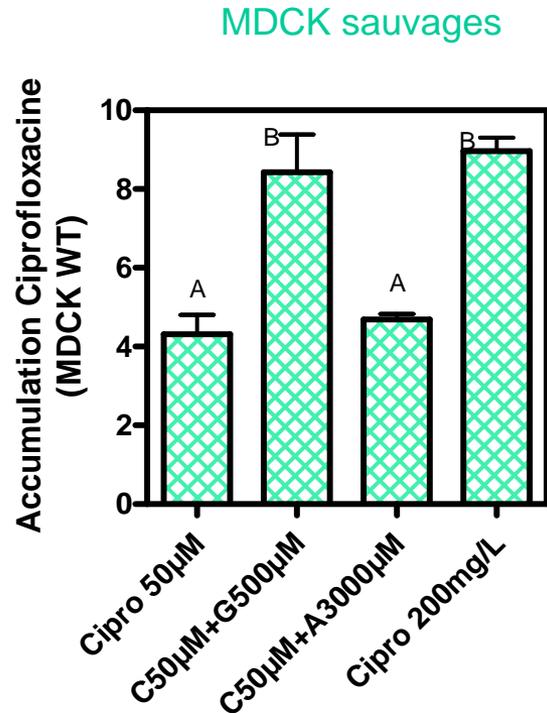
Implication de la MRP2 et/ou MRP4; ciprofloxacine comme inhibiteur ?

Implication de la MRP2 : MDCK WT et MDCK-MRP2



Pas de différence très marquée entre l'expression de MRP2 des cellules sauvages et transfectées

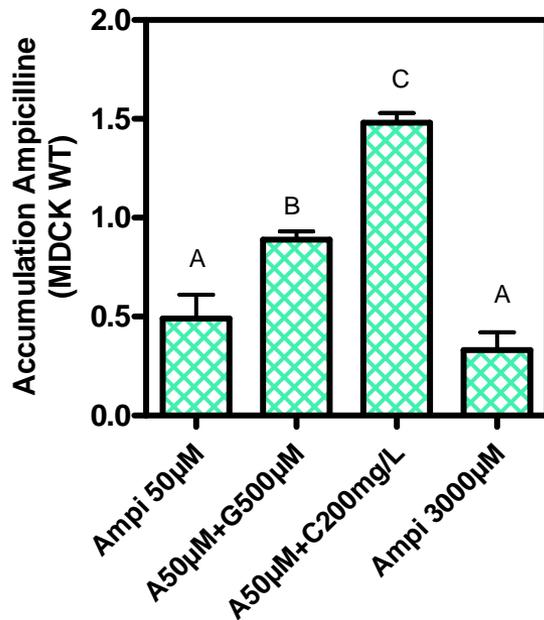
Implication de la MRP2 : Accumulation de ciprofloxacine



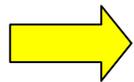
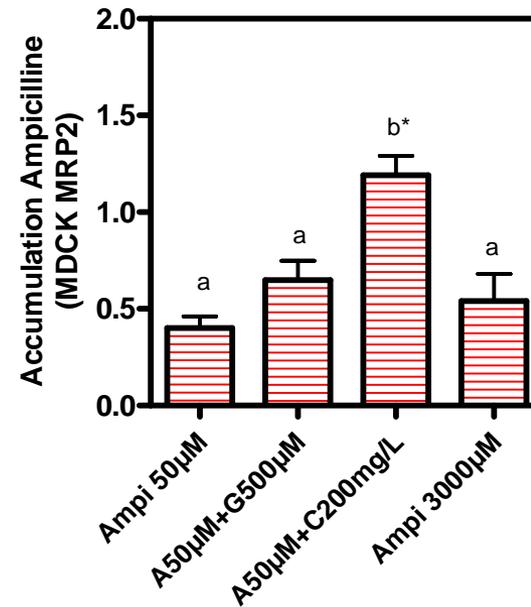
MRP2 est responsable, du moins en partie, de l'efflux actif de la ciprofloxacine dans les cellules surexprimant la MRP2

Implication de la MRP2 : Accumulation d'ampicilline

MDCK sauvages



MDCK-MRP2



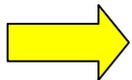
- Pas d'effet de la MRP2
- Effet du gemfibrozil
- Effet de la ciprofloxacine (↑ accumulation 2-3X)
- Pas d'effet de la Pgp, ni MRP1

Implication d'un autre transporteur non surexprimé dans les cellules testées...

→ MRP4 ? (Garrido-Marquez, non publié et Bartholomé et al., 2007)

Caractérisation de la compétition ciprofloxacine-ampicilline

- 1) L'effet est-il spécifique à la ciprofloxacine ou aux quinolones?



Réalisation des mêmes expériences avec la moxifloxacine

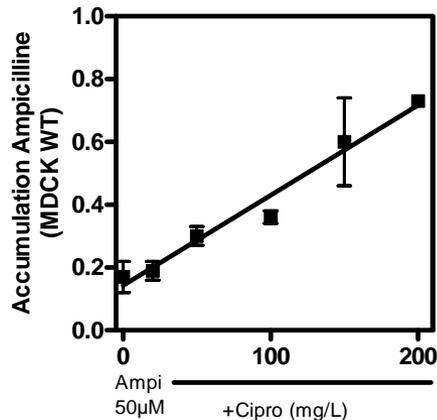


Effet identique avec la moxifloxacine
Non spécifique à la ciprofloxacine

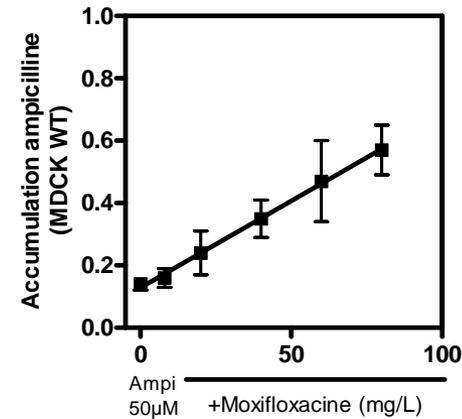
Caractérisation de la compétition ciprofloxacine-ampicilline

2) L'effet dépend-il de la concentration en quinolone?

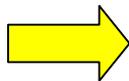
Ciprofloxacine



Moxifloxacine



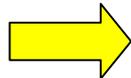
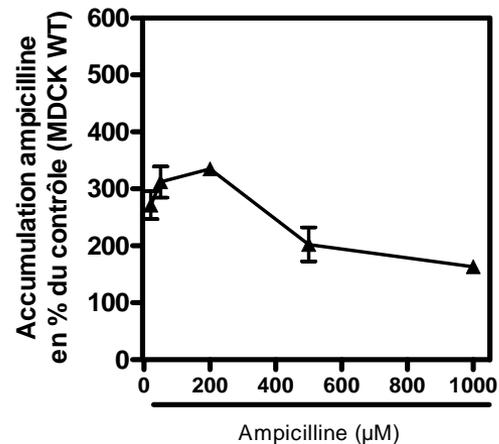
Doses-effet des FQ sur l'accumulation de l'ampicilline dans MDCK



Effet dose-dépendant pour les deux fluoroquinolones

Caractérisation de la compétition ciprofloxacine-ampicilline

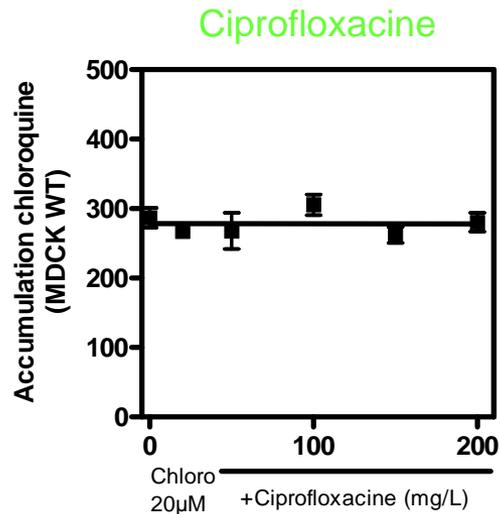
3) L'effet dépend-t-il de la concentration en ampicilline?



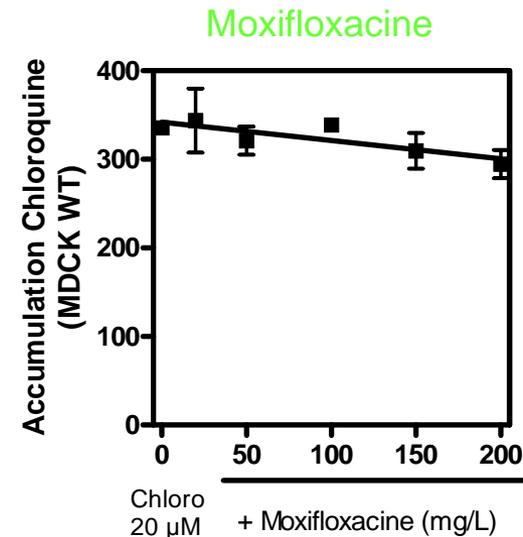
- Accumulation ampicilline x3 en présence de ciprofloxacine pour une concentration ampicilline jusqu'à 200µM
- Au-delà, x2

Caractérisation de la compétition ciprofloxacine-ampicilline

- 4) Effet dû à un mécanisme autre qu'une compétition pour la pompe?
a) Effet sur les gradients de pH ?



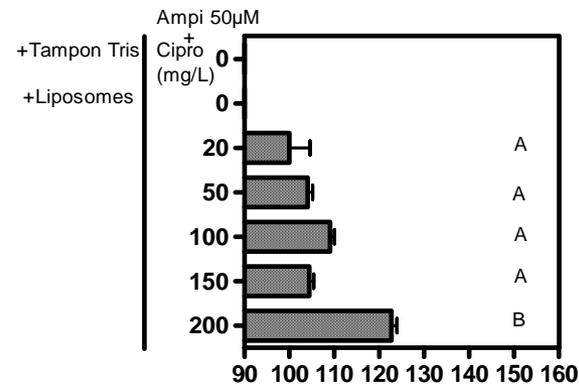
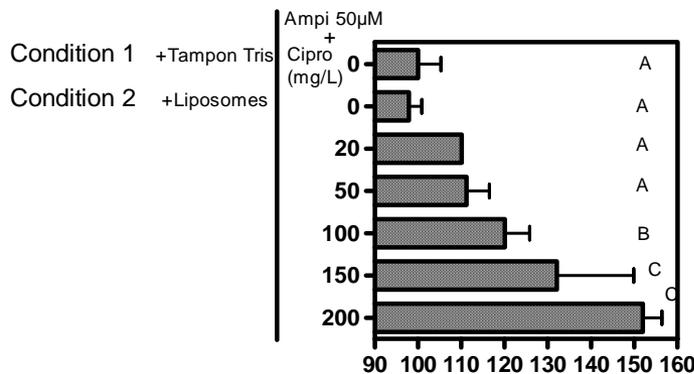
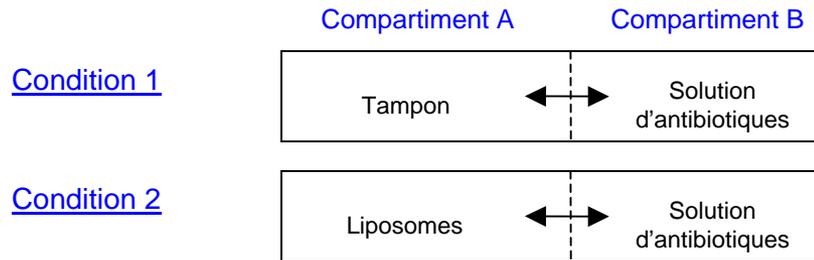
Pas d'effet de la ciprofloxacine sur la capture de chloroquine



- Pas d'effet de la moxifloxacine aux concentrations < 100mg/l
- Effet à des concentrations supérieures à celles nécessaires à augmenter la concentration cellulaire en ampicilline (≤ 80 mg/l)

Caractérisation de la compétition ciprofloxacine-ampicilline

- 4) Effet dû à un mécanisme autre qu'une compétition pour la pompe?
- Effet sur les gradients de pH ?
 - Interaction physique? → dialyse (1/2)

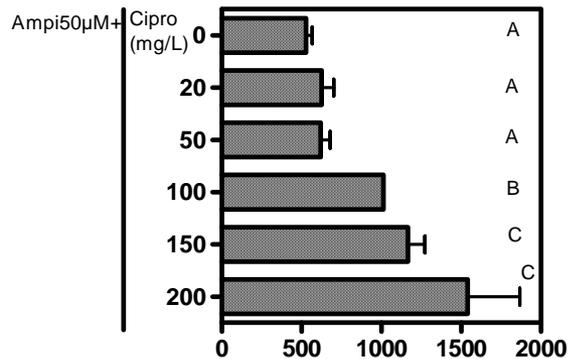


- Signal fluorescent de l'ampicilline dans le compartiment B
- Au plus il y a de ciprofloxacine, au moins l'ampicilline diffuse vers A

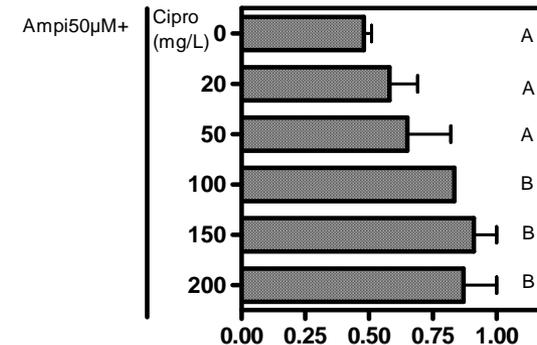
- Signal fluorescent de ciprofloxacine dans le compartiment B sur la concentration initiale
- Diffusion similaire sauf pour la Cipro 200mg/l

Caractérisation de la compétition ciprofloxacine-ampicilline

- 4) Effet dû à un mécanisme autre qu'une compétition pour la pompe?
- a) Effet sur les gradients de pH ?
 - b) Interaction physique? → dialyse (2/2)



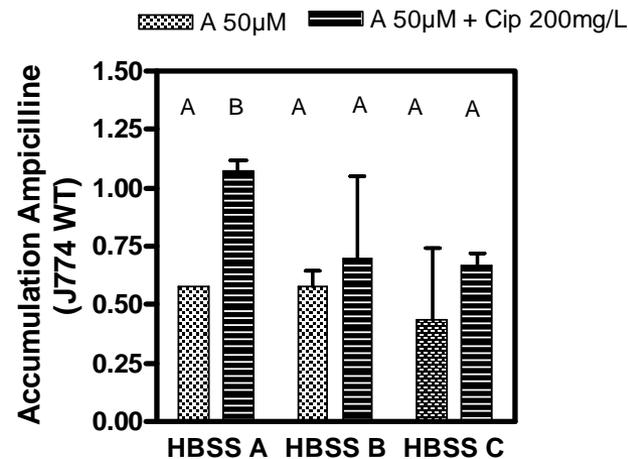
- Taille moyenne des particules (nm)
- La taille s'accroît avec l'augmentation de concentration en ciprofloxacine
- Formation de complexes



- Dispersion des particules
- Le facteur de dispersion s'accroît avec l'augmentation de la concentration en ciprofloxacine

Caractérisation de la compétition ciprofloxacine-ampicilline

- 4) Effet dû à un mécanisme autre qu'une compétition pour la pompe?
- Effet sur les gradients de pH ?
 - Interaction physique
 - Influence des ions bivalents



HBSS A : milieu sans Ca^{2+} et Mg^{2+}

HBSS B : concentrations standard en Ca^{2+} et Mg^{2+}

HBSS C : quantités x5 en Ca^{2+} et Mg^{2+}

- Ca^{2+} et Mg^{2+} forment des complexes avec la fluoroquinolone et réduisent sa biodisponibilité
- Dans le milieu sans ions, la ciprofloxacine augmente l'accumulation d'ampicilline
- Cet effet disparaît au fur et à mesure que la concentration des ions augmente dans le milieu

Conclusions et perspectives (1/4)

Caractérisation des pompes transportant la ciprofloxacine et l'ampicilline

	J774 WT	J774 Résistants (MRP2/MRP4)	MDCK WT	MDCK-MRP2
Ciprofloxacine		>>>		>
Ampicilline		>		=

- MRP2 semble transporter la ciprofloxacine
- MRP2 ne semble pas être impliquée dans le transport de l'ampicilline



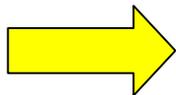
tester mêmes expériences sur MDCK-MRP4

Conclusions et perspectives (2/4)

Mécanisme de l'effet de la ciprofloxacine sur l'accumulation de l'ampicilline

1. Compétition pour le transport?

- Dépend de la concentration - en ampicilline
- cellulaire en ciprofloxacine
- Observé avec la moxifloxacine (inhibiteur du transport de la ciprofloxacine)
- Observé dans tous les types cellulaires : transporteur exprimé à un niveau de base (MRP4 ?)



Expérience de cinétique d'efflux de l'ampicilline
en présence de ciprofloxacine

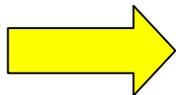
Conclusions et perspectives (3/4)

Mécanisme de l'effet de la ciprofloxacine sur l'accumulation de l'ampicilline

1. Compétition pour le transport?

2. Autre mécanisme?

- Pas d'effet sur le pH
- In vitro, interaction physique ciprofloxacine-ampicilline
- Complexation ciprofloxacine par les ions bivalents : ↘ effet



Expérience de cinétique d'accumulation de l'ampicilline en présence de ciprofloxacine

Conclusions et perspectives (4/4)

Conséquences pharmacologiques des effets pharmacocinétiques

- Antibiotiques actifs dans des modèles d'infections intracellulaires (*S. aureus* et *L. monocytogenes*)
- Un efflux actif contribuerait à réduire leur activité

