



**Université Catholique de Louvain**  
**Faculté de Médecine**  
**Ecole des Sciences Biomédicales**

**L'efflux actif comme mécanisme d'interactions  
médicamenteuses : Compétition entre Fluoroquinolones et  
Antiviraux dans un modèle de macrophages J774**

**Mémoire présenté par Garcia Laetitia**

**En vue de l'obtention d'une Licence en Sciences Biomédicales, orientation toxicologie**

**Promoteur : Professeur F. Van Bambeke**

**Unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire**

**Année académique 2007-2008**

## REMERCIEMENTS

En guise de préambule, je souhaite dédier ces quelques lignes à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Je remercie chaleureusement le Professeur Françoise Van Bambeke, ma promotrice, pour avoir encadré ce travail avec beaucoup de compétence, d'enthousiasme et de disponibilité. Merci à vous pour vos conseils, votre optimisme et la confiance que vous m'avez accordée au cours de cette année.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance aux Professeurs Marie-Paule Mingeot-Leclercq et Paul Tulkens pour leurs remarques constructives et leurs judicieux conseils.

Un grand merci à toute l'équipe de l'Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, pour son accueil chaleureux durant cette année, qui a su créer une ambiance très sympathique d'entraide.

Un clin d'œil tout particulier à Nathalie Couwenbergh et Stéphane Carryn, Marie-Claire Cambier, Charlotte Misson, Virginie Mohymont et Martial Vergauwen. Merci pour votre patience, votre précieuse aide.

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier de tout cœur ma famille et mes amis.

Laetitia GARCIA

## RESUME

Les cellules eucaryotes expriment des pompes à efflux capables d'expulser un grand nombre de médicaments. Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que la Ciprofloxacine, une Fluoroquinolone, était substrat d'un transporteur Mrp dans les macrophages J774 et que l'exposition chronique de ces cellules à la Ciprofloxacine sélectionnait des cellules résistantes surexprimant la Mrp2 et la Mrp4.

Le but de notre travail est d'examiner dans les macrophages sauvages ou résistants la compétition potentielle entre la Ciprofloxacine et des substrats préférentiels de Mrp2 et Mrp4, afin de mieux caractériser le transporteur de cette Fluoroquinolone. Les trois substrats utilisés, le PME A (Adefovir), le Saquinavir et le Ritonavir, sont des agents antiviraux appartenant respectivement à la classe des Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse et à la classe des Inhibiteurs des Protéases. Le PME A est décrit comme substrat préférentiel de la MRP4 et la MRP5, le Saquinavir et le Ritonavir, de la MRP1 et MRP2.

Ces études de compétition ont démontré :

- La forte réduction de l'accumulation de Ciprofloxacine et de PME A dans les cellules résistantes à la Ciprofloxacine ;
- L'augmentation de l'accumulation de Ciprofloxacine dans les deux types cellulaires, en présence de concentrations élevées de la prodrogue du PME A, le Bis(POM)PME A et de Saquinavir ;
- L'absence d'effet du Ritonavir sur l'accumulation de la Ciprofloxacine ;
- L'augmentation de l'accumulation de PME A dans les deux types cellulaires en présence de Ciprofloxacine.

Nos données suggèrent dès lors que la Ciprofloxacine et le PME A sont à la fois substrats et inhibiteurs d'un même transporteur surexprimé dans les cellules résistantes à la Ciprofloxacine, tandis que le Saquinavir serait inhibiteur de ce même transporteur. Elles soulignent également le caractère de transporteur multidrogue des MRPs et indiquent des interactions médicamenteuses potentielles entre Ciprofloxacine et certains antiviraux par compétition pour un même transporteur.

## SUMMARY

Eukaryotic cells express efflux pumps capable of expelling a wide variety of drugs. Previous studies from our laboratory have demonstrated that Ciprofloxacin, a Fluoroquinolone, is substrate for a Mrp transporter in J774 macrophages and that chronic exposure of these cells to Ciprofloxacin selects for resistant cells that over-express Mrp2 and Mrp4.

The aim of this work is to examine in wild-type and Ciprofloxacin-resistant macrophages the potential competition between Ciprofloxacin and some preferential substrates of Mrp2 and Mrp4, to better characterize the transporter of this Fluoroquinolone. The selected substrates are PMEAs (Adefovir), Saquinavir and Ritonavir which are antiviral agents belonging respectively to the class of Nucleotidic Reverse Transcriptase Inhibitors and Protease Inhibitors. PMEAs are described so far as a substrate for MRP4 and MRP5; Saquinavir and Ritonavir, for MRP1 and MRP2.

These competition studies showed that:

- Ciprofloxacin and PMEAs accumulation is markedly reduced in Ciprofloxacin-resistant cells;
- High concentrations of the PMEAs prodrug, Bis(POM)PMEAs, and of Saquinavir increase Ciprofloxacin accumulation, in both cell types;
- Ritonavir does not affect Ciprofloxacin accumulation;
- Ciprofloxacin increase PMEAs accumulation in both cell types.

Our data therefore suggest that Ciprofloxacin and PMEAs are both substrates and inhibitors of a same transporter overexpressed in Ciprofloxacin-resistant cells, while Saquinavir is only inhibitor of the same transporter. These data confirm the fact that the Ciprofloxacin transporter is truly a multidrug transporter and highlight potential drug interactions between Ciprofloxacin and antiviral agents, due to competition for transport.

## LISTE DES ABREVIATIONS

AAG	Alpha-1-Acid Glycoprotein
ABC	ATP Binding Cassette
ANP	Acyclic Nucleoside Phosphonates
ATP	Adenosine TriPhosphate
AUC	Area Under the Curve
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
Bis(POM)PMEA	9-[2-(BisPivalOyoloxyMethyl)PhosphoMEthoxy]Adenine
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CL3	Cytoplasmic Linker 3
cMOAT	canalicular Multispecific Organic Anion Transporter
CNT	Concentrative Nucleoside Transporter
DMSO	DiMethylSulfOxyde
DMT	Drug/Metabolite Transporter
hOAT	human Organic Anion Transporter
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
LDH	Lactate DeHydrogenase
PI	Protease Inhibitors
MCT	MonoCarboxylate Transporter
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MET	Multidrug Endosomal Transporter
MFS	Major Facilitator Superfamily
MOP	Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide
MRP	Multidrug Resistance Protein
MSD	Membrane Spanning Domain
NBD	Nucleotide Binding Domain
OAT	Organic Anion Transporter
OCT	Organic Cation Transporter
PCR	Polymerase Chain reaction
PEPT	Peptide Transporter
P-gp	P-Glycoprotein

PMEA	9-[2-(PhosphonoMethoxy)Ethyl]Adenine
POT	Proton-dependant Oligopeptide Transporter
PTS	Phosphoenolpyruvate : Sugar
RND	Resistance-Nodulation-Cell Division
SUR	SulfonylUrea Receptor
TMD	TransMembrane Domain

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	1
RESUME .....	2
SUMMARY .....	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
TABLE DES MATIERES .....	6
INTRODUCTION .....	11
<b>1. LES TRANSPORTEURS.....</b>	<b>11</b>
1.1. CLASSIFICATION .....	11
1.1.1. <i>Premier modèle de classification (Saier, Jr., 2000)</i> .....	12
1.1.1.1. Les transporteurs actifs primaires .....	12
1.1.1.1.1. Classification .....	13
1.1.1.1.2. Structure .....	14
1.1.1.1.3. Mécanisme d'action.....	15
1.1.1.1.4. Substrats et fonctions .....	16
1.1.1.2. Les transporteurs actifs secondaires .....	17
1.1.1.3. Les translocateurs .....	19
1.1.2. <i>Second modèle de classification</i> .....	19
1.1.2.1. Les protéines d'influx .....	19
1.1.2.2. Les protéines d'efflux .....	19
1.2. LES POMPES A EFFLUX .....	20
1.2.1. <i>Structure des MRPs</i> .....	20
1.2.2. <i>Mécanisme d'action</i> .....	21
1.2.3. <i>Substrats</i> .....	22
1.2.4. <i>Localisation et fonction</i> .....	23
1.2.4.1. La MRP2.....	24
1.2.4.2. La MRP4.....	25
<b>2. LES ANTIBIOTIQUES .....</b>	<b>25</b>
2.1. PHARMACOCINETIQUE CELLULAIRE DES ANTIBIOTIQUES.....	26
2.2. PHARMACODYNAMIE CELLULAIRE DES ANTIBIOTIQUES .....	28
<b>3. LES FLUOROQUINOLONES.....</b>	<b>28</b>
3.1. GENERALITES .....	28

3.1.1.	<i>Mécanisme d'action</i> .....	29
3.1.2.	<i>Résistance aux Fluoroquinolones</i> .....	29
3.2.	LA CIPROFLOXACINE .....	30
3.3.	PHARMACOCINETIQUE ET PHARMACODYNAMIE CELLULAIRE .....	30
3.4.	LES TRANSPORTEURS D'EFFLUX DE LA CIPROFLOXACINE .....	31
<b>4.</b>	<b>ANTIVIRAUX SUBSTRATS DES MRPS</b> .....	<b>33</b>
4.1.	LES INHIBITEURS DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE .....	33
4.2.	LES INHIBITEURS DES PROTEASE .....	34
4.3.	LE PMEA, SUBSTRAT PREFERENTIEL DE MRP4 .....	34
4.3.1.	<i>Généralités</i> .....	35
4.3.2.	<i>Cibles et conséquences de l'activité du PMEA</i> .....	36
4.3.3.	<i>Métabolisation du PMEA et de sa prodrogue</i> .....	36
4.3.4.	<i>Transport du PMEA par MRP4</i> .....	37
4.3.5.	<i>Toxicité du PMEA</i> .....	37
4.4.	LE SAQUINAVIR ET LE RITONAVIR, SUBSTRATS PREFERENTIELS DE MRP2 .....	38
4.4.1.	<i>Généralités</i> .....	38
4.4.2.	<i>Transport du Saquinavir et du Ritonavir par MRP2</i> .....	39
4.4.3.	<i>Toxicité du Saquinavir</i> .....	39
	<b>OBLECTIFS DU TRAVAIL</b> .....	<b>40</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>41</b>
<b>1.</b>	<b>CULTURE CELLULAIRE</b> .....	<b>41</b>
1.1.	LES MACROPHAGES J774 SAUVAGES .....	41
1.2.	LES MACROPHAGES J774 RESISTANTS A LA CIPROFLOXACINE .....	41
<b>2.</b>	<b>PROTOCOLE DES MANIPULATIONS D'ACCUMULATION</b> .....	<b>42</b>
2.1.	INCUBATION DES MACROPHAGES J774 .....	42
2.2.	RECUPERATION DES CELLULES .....	42
<b>3.</b>	<b>HYDROLYSE DE LA PRODRUGUE DU PMEA</b> .....	<b>43</b>
<b>4.</b>	<b>COMPETITIONS</b> .....	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b>DOSAGES</b> .....	<b>43</b>
5.1.	DOSAGE DES PROTEINES .....	43
5.2.	DOSAGE DE LA CIPROFLOXACINE .....	44
5.3.	DOSAGE DU PMEA .....	45
5.3.1.	<i>Conditions d'utilisation</i> .....	45
5.3.2.	<i>Validations de cette méthode de dosage</i> .....	46



5.3.2.1.	Linéarité.....	46
5.3.2.2.	Reproductibilité.....	47
5.3.2.3.	Zone de sensibilité.....	48
5.3.3.	<i>Adaptation du gradient</i> .....	48
5.4.	DOSAGE DU SAQUINAVIR ET DU RITONAVIR.....	48
5.4.1.	<i>Conditions d'utilisation</i> .....	48
5.4.2.	<i>Validations de cette méthode de dosage</i> .....	49
5.4.2.1.	Linéarité.....	49
5.4.2.2.	Reproductibilité.....	50
5.4.2.3.	Zone de sensibilité.....	50
5.5.	VERIFICATION DE L'ABSENCE D'INTERFERENCE.....	50
5.6.	DOSAGE DE LA LACTATE DEHYDROGENASE.....	51
5.7.	ANALYSE STATISTIQUE.....	52
<b>RESULTATS</b> .....		<b>53</b>
<b>1. LA CIPROFLOXACINE</b> .....		<b>53</b>
<b>2. LE PMEA ET SA PRODRUGUE, LE BIS(POM)PMEA</b> .....		<b>54</b>
2.1.	INTRODUCTION.....	54
2.2.	CARACTERISATION IN VITRO.....	54
2.2.1.	<i>Stabilité</i> .....	54
2.2.2.	<i>Hydrolyse</i> .....	55
2.3.	HYDROLYSE DANS UN LYSAT CELLULAIRE.....	55
2.4.	ACCUMULATIONS.....	56
2.4.1.	<i>Accumulation de PMEA</i> .....	56
2.4.2.	<i>Viabilité cellulaire</i> .....	56
2.4.3.	<i>Accumulation de Bis(POM)PMEA</i> .....	57
2.5.	COMPETITIONS.....	58
2.5.1.	<i>Viabilité cellulaire</i> .....	59
2.5.2.	<i>Compétition entre la Ciprofloxacine et le PMEA</i> .....	59
2.5.3.	<i>Compétition entre la Ciprofloxacine et le Bis(POM)PMEA</i> .....	61
2.5.2.1.	Accumulation de la Ciprofloxacine.....	61
2.5.2.2.	Accumulation de Bis(POM)PMEA.....	62
2.6.	CINETIQUE D'EFFLUX.....	63
<b>3. LE SAQUINAVIR</b> .....		<b>64</b>
3.1.	ACCUMULATION DU SAQUINAVIR.....	64
3.2.	COMPETITIONS ENTRE LA CIPROFLOXACINE ET LE SAQUINAVIR.....	66
3.2.1.	<i>Accumulation de Ciprofloxacine</i> .....	66
3.2.2.	<i>Accumulation de Saquinavir</i> .....	67

3.2.3. Viabilité .....	68
3.3. CINETIQUE D'EFFLUX.....	69
<b>4. LE RITONAVIR.....</b>	<b>70</b>
4.1. COMPÉTITIONS ENTRE LA CIPROFLOXACINE ET LE RITONAVIR .....	70
4.2.1. Accumulation de Ciprofloxacin.....	70
4.2.2. Accumulation de Ritonavir .....	71
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>1. LES ANTIVIRAUX COMME INHIBITEURS DU TRANSPORTEUR DE LA CIPROFLOXACINE .....</b>	<b>74</b>
<b>2. LES ANTIVIRAUX COMME SUBSTRATS DES POMPES MRPS .....</b>	<b>75</b>
2.1. LE PMEAS.....	75
2.2. SAQUINAVIR ET RITONAVIR .....	76
2.2.1. Le Saquinavir, substrat ou inhibiteur ?.....	76
2.2.2. Le Ritonavir, ni substrat, ni inhibiteur ?.....	78
<b>3. IMPLICATIONS PHARMACOLOGIQUES ET TOXICOLOGIQUES .....</b>	<b>78</b>
3.1. IMPLICATIONS PHARMACOLOGIQUES.....	78
3.2. IMPLICATIONS TOXICOLOGIQUES .....	79
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>80</b>
<b>1. ETUDES A COURT TERME .....</b>	<b>80</b>
1.1. ACCUMULATION DU SAQUINAVIR A DE PLUS FAIBLES CONCENTRATIONS .....	80
1.2. ETUDES DE LA CAPTURE ET DE L'EFFLUX DU SAQUINAVIR .....	80
1.3. COMPETITION ENTRE LE BIS(POM)PMEAS ET LE SAQUINAVIR .....	81
1.4. ETUDE DE L'ACCUMULATION DES ANTIVIRAUX ET DE LEUR POUVOIR INHIBITEUR SUR LE TRANSPORT DE CIPROFLOXACINE DANS DES CELLULES SUREXPRESSANT SPECIFIQUEMENT MRP2 OU MRP4.....	81
<b>2. ETUDES A LONG TERME .....</b>	<b>81</b>
2.1. ETUDES PHARMACOCINETIQUES .....	81
2.2. ETUDES PHARMACOLOGIQUES .....	82
<b>ANNEXES.....</b>	<b>84</b>
<b>1. DOSAGE DES PROTEINES.....</b>	<b>84</b>
1.1. REACTIF DE BIURET.....	84
1.2. REACTIF DE FOLIN-CIOCALTEAU .....	84
1.3. SOLUTION DE NAOH 1N.....	84
1.4. ETALON : SOLUTION D'ALBUMINE BOVINE A 100 µG/ML.....	84
<b>2. DOSAGE DE LA LACTATE DEHYDROGENASE.....</b>	<b>84</b>

2.1.	TAMPON TRIS 81,3 MM/NaCl 203,3 MM.....	84
2.2.	NADH 0,244 MM.....	85
2.3.	PYRUVATE 9,76 MM.....	85
<b>3.</b>	<b>PREPARATION DU TAMPON PBS 10X, A PH 7,4.....</b>	<b>85</b>
<b>4.</b>	<b>PREPARATION DU MILIEU HBSS 5X .....</b>	<b>85</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>86</b>

# INTRODUCTION

## 1. Les transporteurs

Les membranes biologiques ont longtemps été considérées comme de simples barrières physiques séparant les milieux intra- et extracellulaires. Cette vision est devenue caduque. En effet, il est aujourd'hui admis que la membrane joue un rôle prépondérant dans un grand nombre de processus physiologiques puisqu'elle comporte la plupart des éléments essentiels aux échanges entre la cellule et son environnement.

La membrane des cellules eucaryotes est organisée en une bicouche de phospholipides et de cholestérol dans laquelle sont insérées ou ancrées des protéines. Les phospholipides constituent le cœur de la membrane et lui confèrent un rôle de barrière efficace contre la diffusion des molécules hydrophiles. La pénétration de telles molécules nécessite dès lors la présence de transporteurs d'influx ou encore la mise en place d'un processus d'endocytose.

Les molécules lipophiles et amphiphiles peuvent quant à elles diffuser librement à travers la bicouche. Cependant, un envahissement par des molécules amphiphiles au sein de la cellule est potentiellement toxique pour cette dernière... Des mécanismes de protection visant à la défendre de ce type d'agressions ont donc été mis en place ; l'un d'entre eux étant l'expression de transporteurs d'efflux. Ces protéines transmembranaires sont en effet capables de reconnaître, avec une faible affinité, les substances amphiphiles et de les expulser hors des cellules.

Initialement décrites chez les procaryotes, certaines familles de transporteurs d'efflux présentent un continuum entre procaryotes et eucaryotes. Ceci laisse supposer qu'il s'agit de protéines codées par des gènes très anciens, conservés tout au long de l'évolution. On pense dès lors que leur rôle doit être très important pour la survie de toute cellule (Mesaros *et al.*, 2005).

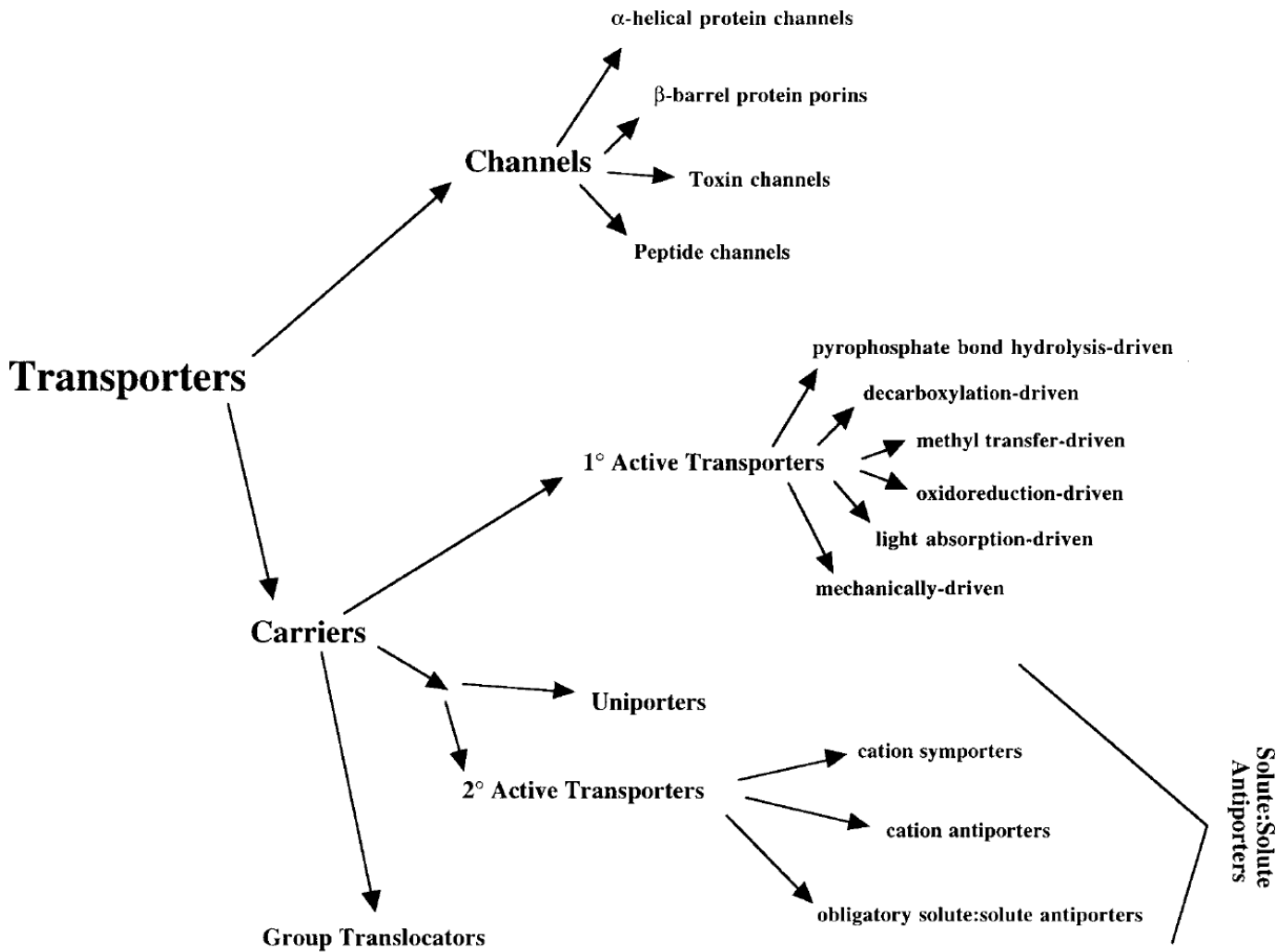
### 1.1. Classification

Il existe deux grandes catégories de protéines assurant la traversée de la membrane : des canaux et des transporteurs.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous intéresserons essentiellement aux protéines transmembranaires faisant partie de la seconde catégorie.

### 1.1.1. Premier modèle de classification (Saier, Jr., 2000)

Les transporteurs sont divisés en trois groupes : les transporteurs actifs primaires, les transporteurs actifs secondaires (incluant les uniporteurs) et les translocateurs.



**Figure 1.** Ce schéma illustre les principaux types de transporteurs actuellement reconnus dans la nature. Dans un premier temps, les protéines sont divisées en canaux et transporteurs. Ces canaux sont eux mêmes divisés en quatre branches. Les transporteurs regroupent trois catégories : les transporteurs actifs primaires, les transporteurs actifs secondaires et les translocateurs. Transporteurs actifs primaires et secondaires comprennent respectivement six et trois branches (Saier, Jr., 2000).

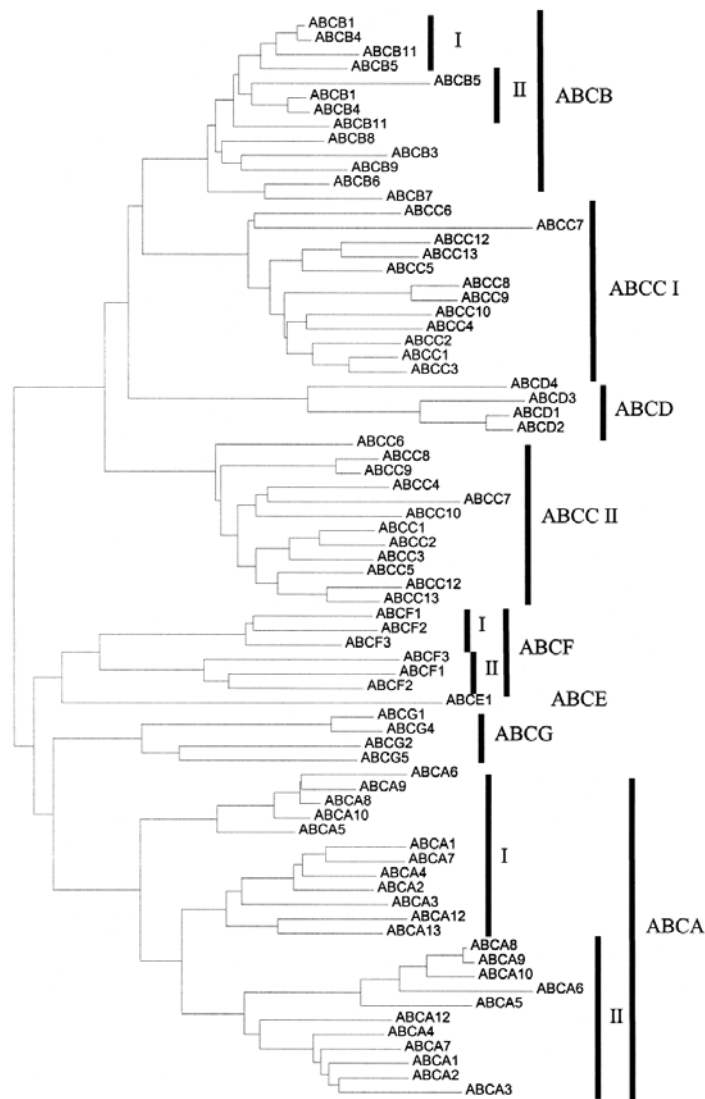
#### 1.1.1.1. Les transporteurs actifs primaires

Comme illustré dans la figure 1, les transporteurs actifs primaires comportent six branches. Ceux-ci utilisent différentes sources d'énergie de nature chimique, électrique et solaire pour le transport de substances contre leur gradient de concentration.

Parmi ces transporteurs, la famille des ABC (ATP Binding Cassette), appartenant à la première branche, est la plus connue et la plus caractérisée à ce jour.

#### 1.1.1.1.1. Classification

Ces transporteurs ABC constituent une famille de protéines membranaires codées par 49 gènes identifiés chez l'homme. Ces gènes, dispersés dans le génome humain, peuvent être divisés en sept familles distinctes, allant de ABCA à ABCG, en fonction de l'organisation de leurs domaines et de l'homologie entre les acides aminés (Dean *et al.*, 2001a; Dean *et al.*, 2001b).



**Figure 2.** Arbre phylogénétique des gènes ABC humains. Certaines protéines analysées contiennent deux domaines de liaison de l'ATP (noté II sur la figure) tandis que d'autres n'en contiennent qu'un seul (noté I) (Dean *et al.*, 2001b).

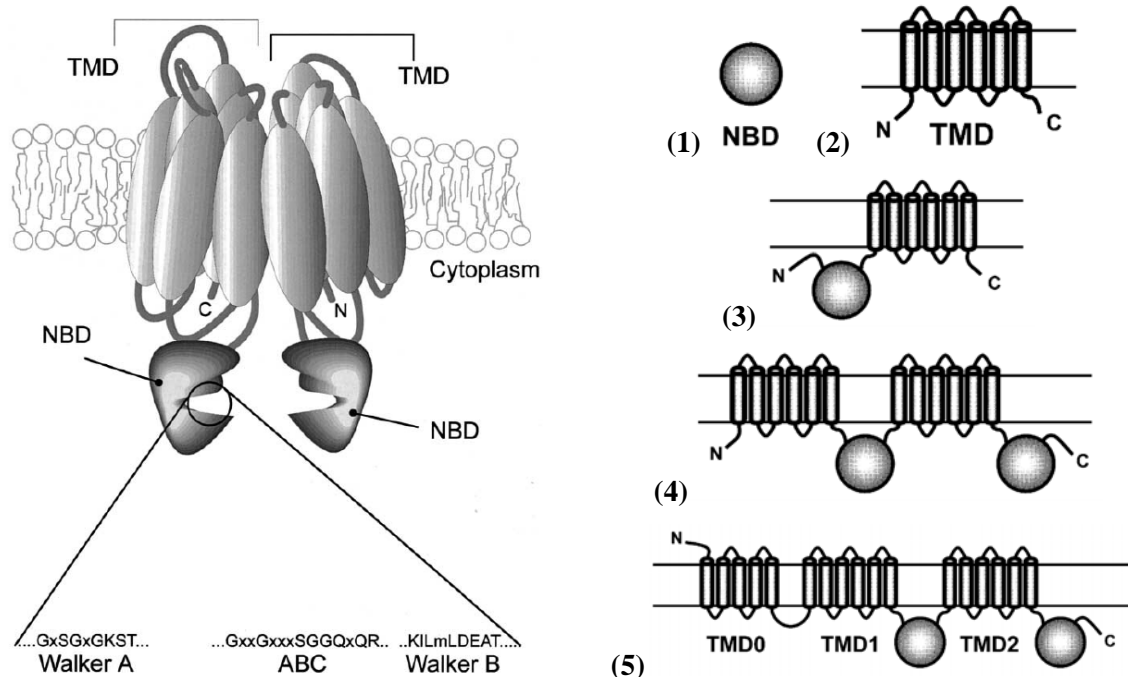
On retrouve des membres de cette famille dans toutes les espèces, allant des procaryotes aux eucaryotes. L'analyse de séquence et les éléments communs semblent indiquer que les différents transporteurs ABC proviennent d'une protéine ancestrale commune (Saurin *et al.*, 1999).

#### 1.1.1.1.2. Structure

Sur le plan structural, le transporteur ABC dispose d'un minimum de quatre domaines. La présence de deux domaines pouvant lier l'ATP, les domaines NBD (Nucleotide Binding Domains), est une caractéristique des membres de cette famille. On y retrouve trois séquences spécifiques très conservées :

- Les séquences Walker A (G/A-X4-G-K-T/S) et B (R/K-X3-G-X3-L-h4-D), qui sont les sites de liaison de l'ATP. Bien que caractéristiques, ces séquences ne sont pas spécifiques aux transporteurs ABC ; on les retrouve en effet dans beaucoup de protéines ATPases.
- Une séquence C (L-S-X-G-X-R) particulière aux transporteurs ABC, utilisée pour déterminer l'appartenance d'une protéine à cette superfamille. Cette signature très spécifique aux membres de cette famille est située entre les sites Walker.

Les transporteurs ABC contiennent en outre deux domaines transmembranaires MSD (Membrane Spanning Domains 1 et 2, appelés également TransMembrane Domains) contenant chacun six hélices alpha. Un troisième domaine transmembranaire (MSDo) composé de cinq hélices alpha, est attaché à l'extrémité N-terminale de MSD1 de certains transporteurs. Celui-ci ne semble pas être essentiel à la fonction de transport (Bakos *et al.*, 2000) mais est requis pour la rétention de la MRP1 à la surface cellulaire (Deeley and Cole, 2006) ainsi que pour la localisation de la MRP2 dans les cellules polarisées (Westlake *et al.*, 2005 ; Deeley *et al.*, 2006).



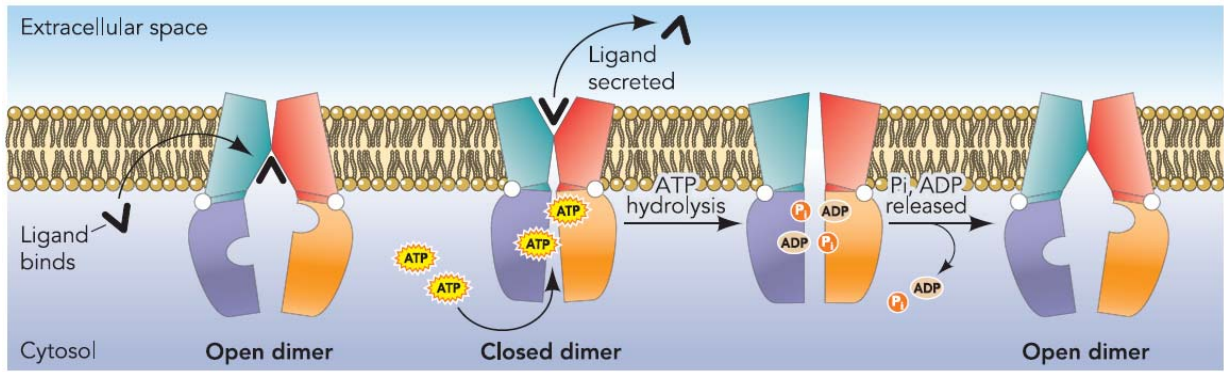
**Figure 3.** Organisation structurale et topologies des transporteurs ABC. Les domaines de fixation des nucléotides (NBD) sont situés du côté cytoplasmique de la membrane et contiennent les motifs conservés impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP (motifs Walker A et Walker B, motif Signature). Les deux domaines transmembranaires (TMD ou MSD) sont chacun constitué de 6 hélices  $\alpha$  membranaires (2). L'arrangement des domaines de ces transporteurs ABC détermine des modèles de prédiction caractérisés notamment par les configurations de BCRP (3), de MRP4, MRP5 ou MRP7 (4), et de MRP1, MRP2, MRP3 ou MRP6 (5) (Bolhuis *et al.*, 1997; Lage, 2003).

#### 1.1.1.1.3. Mécanisme d'action

Les protéines ABC utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP sur les domaines NBD pour transporter de nombreuses molécules à travers les membranes tant intracellulaires qu'extracellulaires. Le transport du substrat par les ABC se déroule en quatre étapes décrites ci-dessous :

- Lorsque les dimères NBDs sont ouverts, les MSDs ont une affinité plus grande pour le ligand. La liaison de ce ligand aux MSDs induit alors une augmentation de l'affinité des NBDs pour l'ATP.
- La fixation de l'ATP conduit dès lors à la fermeture des dimères NBDs, ce qui induit à son tour un changement de conformation des MSDs suffisant pour transloquer le ligand.
- L'hydrolyse de l'ATP initie l'ouverture des dimères NBDs.
- Le phosphate puis l'ADP sont relargués, terminant de cette manière le cycle de transport et restaurant à la protéine son état de grande affinité envers le ligand.





**Figure 4.** Les quatre étapes de la translocation du substrat par les transporteurs ABC (Linton, 2007)

#### 1.1.1.1.4. Substrats et fonctions

Les transporteurs ABC sont impliqués dans des voies physiologiques très diverses de la cellule. Ces protéines possèdent une très grande variété de substrats, endogènes et exogènes, tels que les acides aminés, les peptides, les protéines, les lipides, les ions métalliques lourds, les sucres ou les composés hydrophobes (Dean *et al.*, 2001a). Ceci fait de ces ABC des protecteurs de l'organisme. En effet, certains d'entre eux ont des fonctions physiologiques essentielles telles que l'excrétion de toxines par le foie, les reins ou le tractus gastro-intestinal, ou la limitation de la pénétration de molécules toxiques dans des organes vitaux comme le cerveau, les testicules ou le placenta.

Ces pompes ABC sont principalement unidirectionnelles. Chez les eucaryotes, la plupart des ABC transportent les composés du cytoplasme vers le milieu extracellulaire (alors appelés transporteurs d'efflux) ou vers un autre compartiment cellulaire (mitochondries, réticulum endoplasmique, peroxyosome). Lorsque les composés sont transportés en dehors de la cellule, les ABC ont une fonction de sécrétion ou de transport vers d'autres organes alors que, lorsqu'ils sont impliqués dans le transport à travers les membranes intracellulaires, ils ont une fonction métabolique (Dean *et al.*, 2001b).

Les transporteurs d'efflux ABC pompent donc leurs substrats dans une seule direction : du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. En pharmacologie, ces protéines jouent un rôle primordial dans l'absorption d'un médicament de l'espace intestinal à la circulation sanguine et dans sa biodisponibilité. En effet, les protéines d'efflux situées au pôle apical des cellules intestinales peuvent conduire un composé provenant de l'espace intracellulaire vers la lumière intestinale, empêchant de cette manière son absorption dans le sang. De plus, les métabolites

formés sous l'action d'enzymes intracellulaires peuvent eux aussi être substrats de ces transporteurs (Chan *et al.*, 2004).

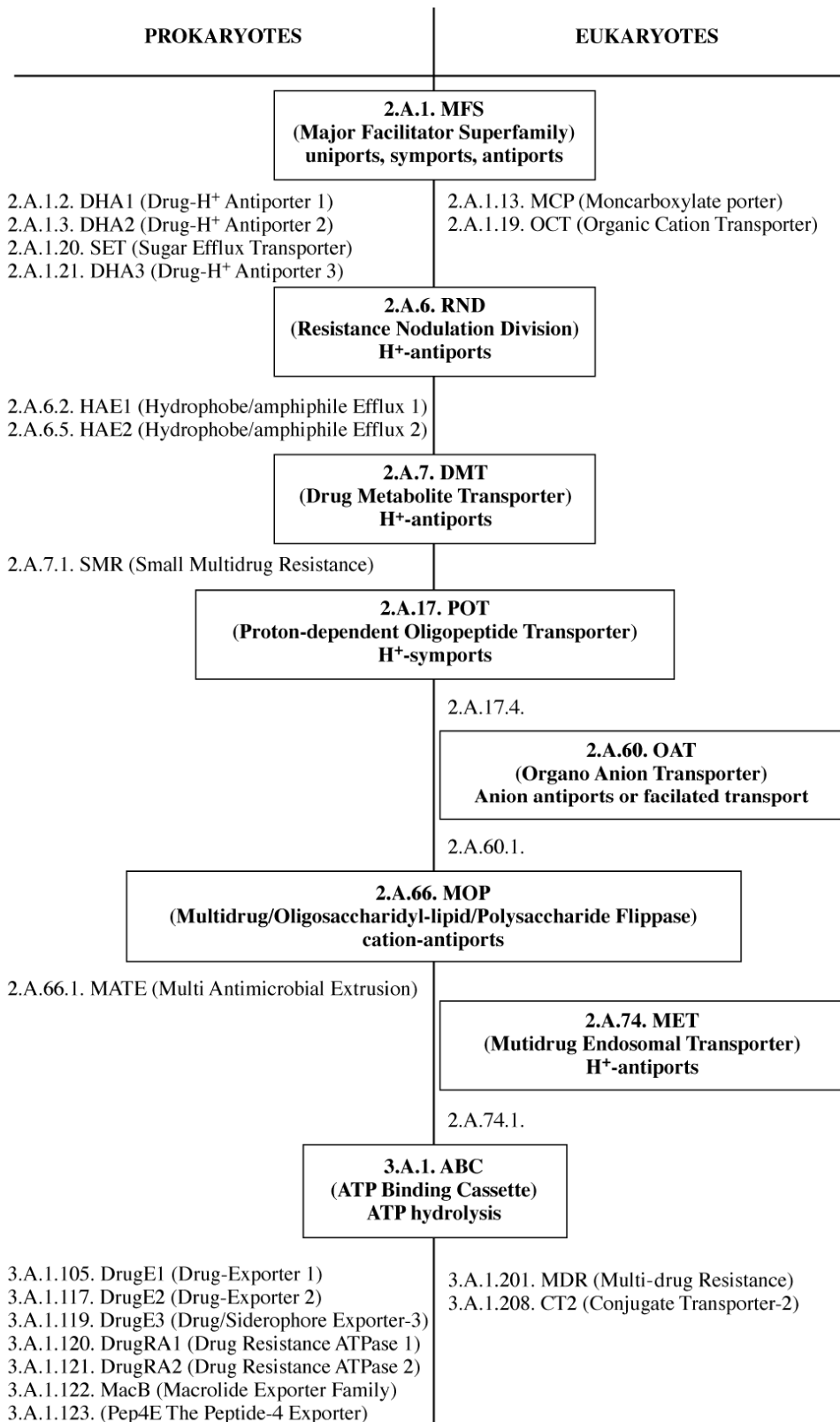
La famille des ABC ne comporte pas que des transporteurs, certains systèmes semblent participer à d'autres processus cellulaires tels que la traduction de l'ARNm ou la séparation de l'ADN (Saurin *et al.*, 1999). D'autres, en parallèle à leur rôle de transporteur, servent à maintenir l'intégrité de la bicouche lipidique ou à transporter les acides gras et stéroïdes dans l'organisme (Dean *et al.*, 2001b).

Le dysfonctionnement de ces transporteurs ubiquitaires est responsable d'un grand nombre de maladies génétiques.

#### *1.1.1.2. Les transporteurs actifs secondaires*

Les transporteurs d'efflux actifs secondaires, prédominants chez les bactéries, sont couplés à un transport d'ions dépendant du gradient de concentration ou à un gradient (électro)-chimique créé par le système de transport actif primaire. Ils transportent leurs substrats par uniport, symport ou antiport.

Ces transporteurs sont principalement impliqués dans le transport d'antibiotiques et sont divisés en familles de pompes à efflux. Cinq d'entre elles sont retrouvées tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes : les MFS (Major Facilitator Superfamily), les RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), les DMT (Drug/Metabolite Transporter), les POT (Proton-dependent Oligopeptide Transporter), les MOP (Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide). Les familles des OAT (Organo Anion Transporter) et des MET (Multidrug Endosomal Transporter) sont, quant à elles, propres aux eucaryotes. (Van Bambeke *et al.*, 2003a).



**Figure 5.** Distribution des transporteurs d'antibiotiques dans les cellules procaryotes et eucaryotes (Van Bambeke *et al.*, 2003a).

### 1.1.1.3. *Les translocateurs*

Les translocateurs modifient leurs substrats durant le transport. A l'heure actuelle, le seul translocateur retrouvé dans la nature est le Phosphoenolpyruvate : Sugar (PTS) bactérien qui phosphoryle ses substrats sucrés durant le transport.

### 1.1.2. *Second modèle de classification*

Les transporteurs peuvent également être classés sur base de leur activité d'import ou d'export de substrats (Saurin *et al.*, 1999).

#### 1.1.2.1. *Les protéines d'influx*

Les protéines d'influx de la famille des ABC sont exprimées uniquement chez les procaryotes (Saurin *et al.*, 1999). Il est supposé que les transporteurs d'influx sont apparus au cours de l'évolution afin de faciliter l'influx de nutriments ou vitamines et de réabsorber les composés endogènes générés tels que le glucose et autres petits glucides, les acides aminés et autres petits peptides, les nucléosides ou les acides biliaires (Cascorbi, 2006). La majorité des transporteurs d'influx utilisent un gradient électrochimique d'ions tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  comme force motrice pour transporter les substrats par symport ou antiport à travers des canaux ioniques.

La plupart des transporteurs d'influx sont les Transporteurs d'Anions Organiques (OAT), les Transporteurs de Cations Organiques (OCT), les Transporteurs de Nucléosides Concentratifs (CNT), les Transporteurs de diPEptides (PEPT) et les Transporteurs de MonoCarboxylates (MCT) (Ho and Kim, 2005).

#### 1.1.2.2. *Les protéines d'efflux*

Les protéines d'efflux sont présentes dans les membranes péricellulaires de tous les organismes, tant procaryotes qu'eucaryotes, et semblent être un moyen de protection basique contre les invasions par des agents toxiques (Saurin *et al.*, 1999 ; Van Bambeke *et al.*, 2000).

Ces protéines possèdent une large spécificité de substrats. La reconnaissance de ces derniers est basée sur leurs propriétés physico-chimiques telles que l'aromaticité, l'hydrophobicité, un caractère ionisable ou la capacité de former des ponts Hydrogènes.

## **1.2. Les pompes à efflux**

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes particulièrement intéressée aux MRPs appartenant à la famille ABCC.

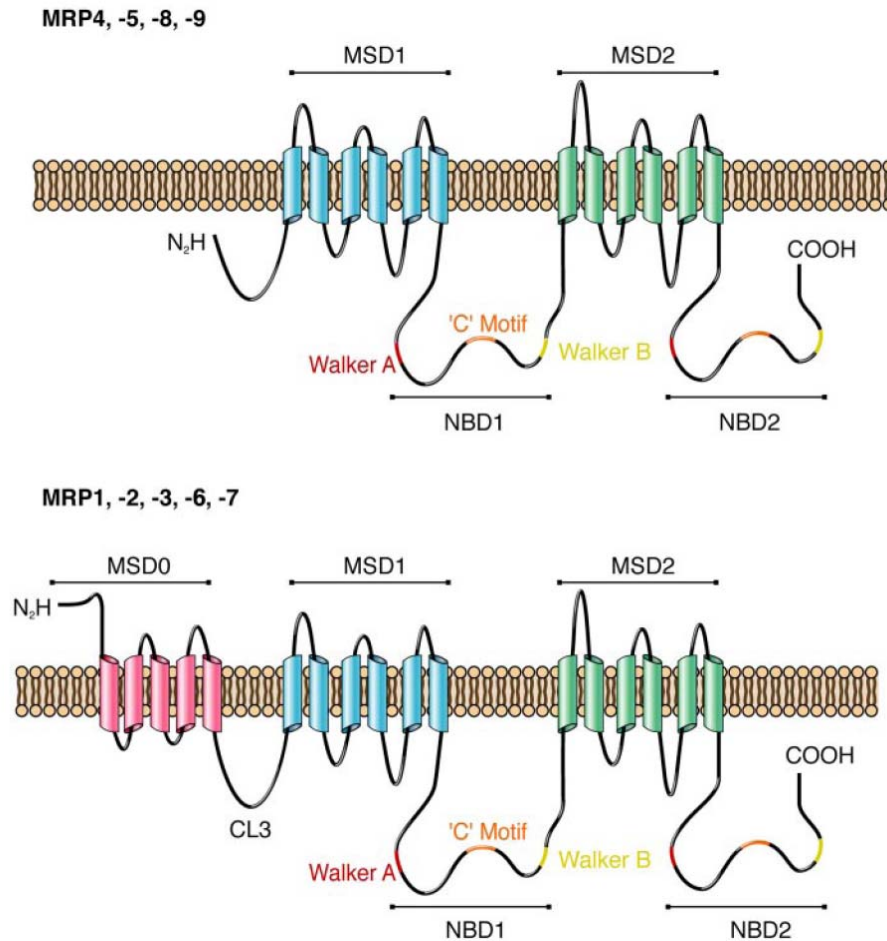
Cette famille contient douze transporteurs aux fonctions de transporteurs d'ions, de sécrétion de toxines et de transduction de signaux. Parmi les douze transporteurs, neuf sont des MRPs (Multidrug Resistance Proteins) classifiés de MRP1 à MRP9. Les trois autres transporteurs sont le Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) et les SulfonylUrea Receptor 1 et 2 (SUR1 et 2). Ces trois derniers transporteurs sont atypiques. En effet, le CFTR est un canal aux ions chlorures et les SUR sont des canaux potassiques couplés directement à un complexe hétéro-octamérique (Linton, 2007).

### ***1.2.1. Structure des MRPs***

Ces protéines d'origine multi-génique sont présentes chez de nombreuses espèces. Leur structure très conservée contient un domaine N-terminal hydrophobe et deux ensembles de six segments transmembranaires reliés chacun à un domaine NBD.

Les MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 et MRP7 possèdent le troisième domaine transmembranaire MSD0 relié par une région Linker Cytoplasmique (CL3) au MSD1 ainsi que la MSD2. Ils sont constitués de dix-sept hélices alpha transmembranaires. Lorsque leur domaine N-terminal se situe du côté intracellulaire de la membrane, on parle alors de MRPs longues.

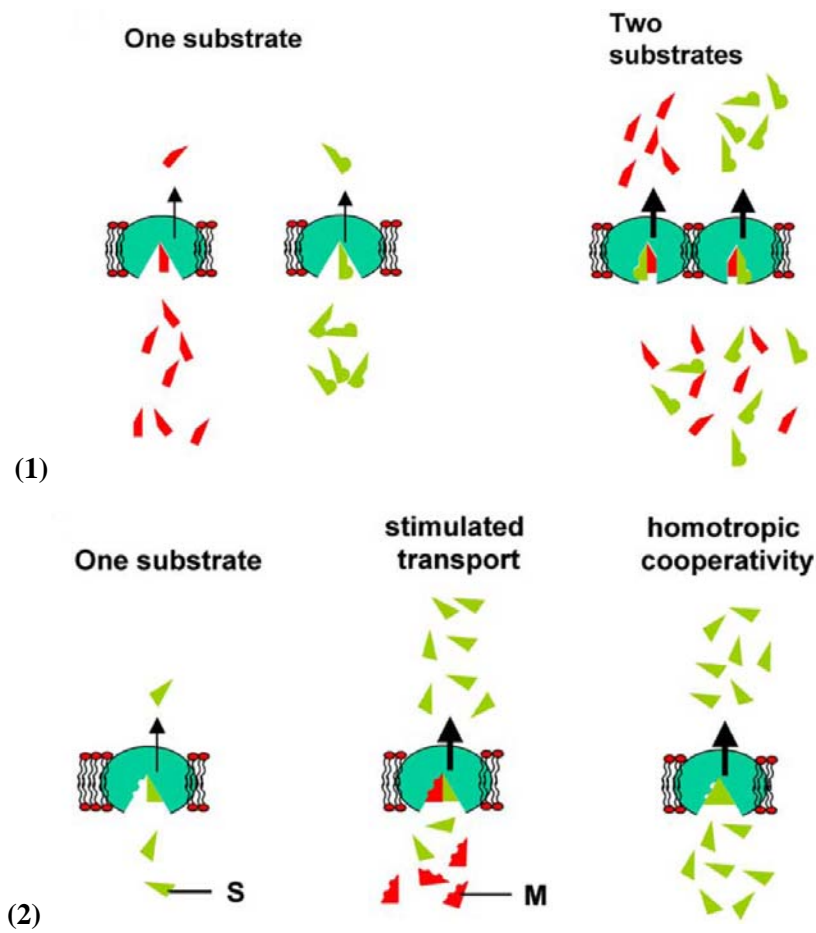
Les MRP4, MRP5, MRP8 et MRP9 ne comprennent que les MSD1 et MSD2 ainsi que la région Linker Cytoplasmique (CL3). Elles sont dès lors appelées MRPs courtes. Leur domaine N-terminal se situe du côté intracellulaire de la membrane.



**Figure 6.** Topologies membranaires des protéines MRPs. Les MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 et MRP7 contiennent le MSD0 relié par un Linker Cytoplasmique (CL3). Les MRP4, MRP5, MRP8 et certainement MRP9 contiennent uniquement les MSD1 et MSD2 ainsi que le CL3 (Deeley *et al.*, 2006).

### 1.2.2. Mécanisme d'action

De manière générale, les MRPs adoptent le même mécanisme d'action que les transporteurs ABC. En effet, ceux-ci effluent leurs substrats grâce à l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP. Le transport pourrait quant à lui s'effectuer selon deux modèles : par cotransport ou par costimulation. Le modèle de cotransport implique deux sites de transport ainsi que deux substrats qui stimulent chacun le transport de l'autre par un efflux conséquent des deux substrats simultanément. Le modèle de costimulation prévoit l'existence d'un site de modulation qui lie un modulateur dont le rôle est d'augmenter l'affinité du substrat pour le site transporteur, sans être transporté lui-même. Ceci induit un meilleur influx du substrat en présence du modulateur (Borst *et al.*, 2006b).



**Figure 7.** Représentation schématique des modèles de cotransport (1) et de costimulation propres aux MRPs. (Borst *et al.*, 2006b)

Cependant, le mécanisme de transport par les MRPs est très controversé. Trois autres modèles ont été proposés (Dallas *et al.*, 2006) :

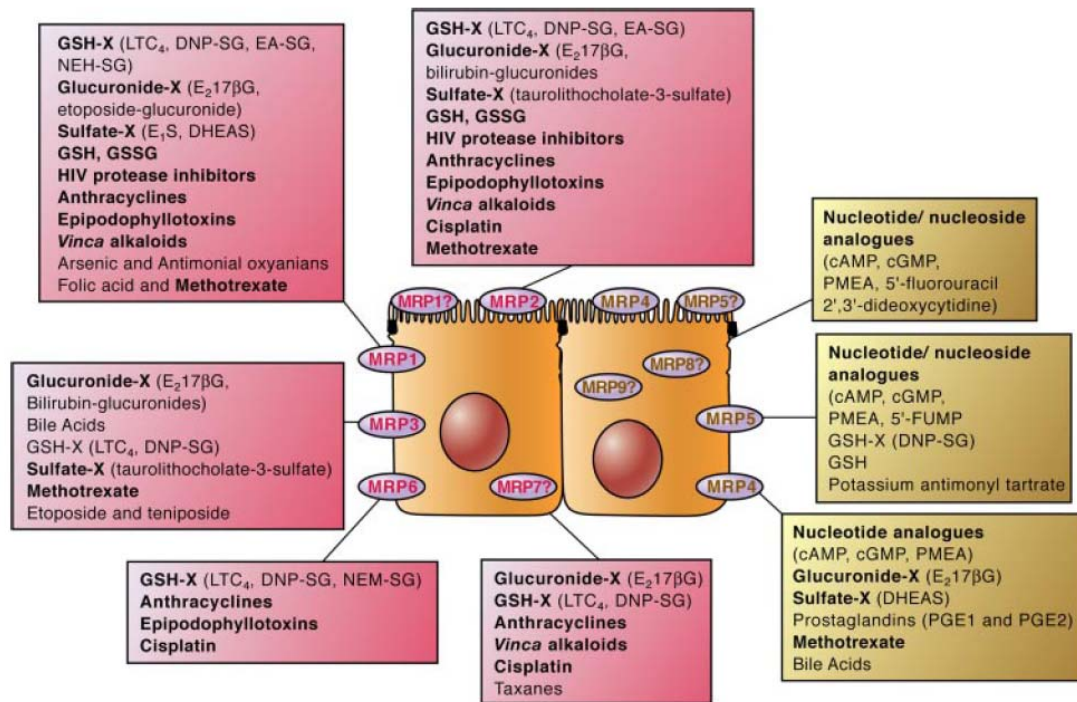
- Le modèle du pore aqueux est le moins probable ;
- Selon le modèle de la Flippase, la MRP fait « basculer » une molécule de substrat chargé du feuillet cytosolique vers le feuillet extra-cytoplasmique, une réaction énergétiquement défavorable permise par l'activité ATPasique couplée de la protéine;
- Le modèle de l'aspirateur hydrophobe suppose que la MRP collecte les substrats au sein de la membrane et les efflue vers le milieu extracellulaire.

(Varma *et al.*, 2003)

### 1.2.3. Substrats

De nombreux substrats propres à chaque MRP ont été identifiés.

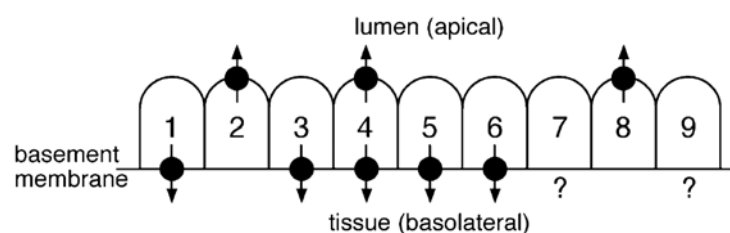
Les régions membranaires détermineraient le type de molécules transportées. En effet, il semblerait que toutes les MRPs longues soient capables de conférer une résistance à de nombreux médicaments dont certains agents naturels, alors que les MRPs courtes caractérisées jusqu'à présent soient capables de conférer une résistance aux nucléotides et de transporter des nucléotides cycliques.



**Figure 8.** Localisation subcellulaire et spécificité de substrats des MRPs dans les cellules polarisées (Deeley *et al.*, 2006).

#### 1.2.4. Localisation et fonction

Les MRPs sont exprimées à la membrane cellulaire des cellules polarisées au pôle apical, au pôle basolatéral ou aux deux simultanément.





**Figure 9.** Schéma indiquant la localisation subcellulaire des MRPs à la membrane des cellules polarisées (Kruh *et al.*, 2007).

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous intéressons plus particulièrement aux MRP2 et MRP4.

#### 1.2.4.1. La MRP2

Bien avant la découverte de MRP1, des études biochimiques et génétiques ont démontré la présence d'un Transporteur d'Anions Organiques au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes. A l'origine, ce transporteur était donc connu comme un Transporteur canaliculaire Multi-spécifique d'Anions Organiques (cMOAT), mais il est maintenant appelé MRP2 (Borst *et al.*, 2000). Chez l'homme, le gène codant pour MRP2 se situe au niveau du chromosome 10q24.

La MRP2 est principalement localisée au pôle apical des hépatocytes, des entérocytes et des cellules tubulaires rénales.

Au niveau des hépatocytes, des études ont démontré que la MRP2 joue un rôle important dans l'excrétion biliaire de divers substrats tels que les conjugués du glutathion, les glucuronides de bilirubine, un certain nombre de médicaments et de leurs métabolites conjugués. De plus, la MRP2 participe à la sécrétion des sels biliaires sulfatés. Il semble donc que MRP2 joue un rôle central dans le processus de détoxification en sécrétant ces métabolites dans la bile. L'importance de MRP2 dans le maintien de faibles concentrations intracellulaires et circulantes de tels composés est illustrée chez les patients atteints du syndrome Dubin-Johnson (Nies and Keppler, 2007).

Dans les entérocytes, MRP2 présente une fonction dans l'absorption intestinale. Son expression est maximale au sommet des villosités et diminue en allant vers les cryptes. Tout comme le cytochrome P450 3A4, l'expression de MRP2 est plus élevée dans le segment proximal du tractus intestinal et diminue dans la partie distale de l'iléon. Elle contribue à l'excrétion des métabolites endogènes, exogènes, des médicaments et de leurs conjugués. Elle permet également de limiter l'absorption de certains médicaments ou autres xénotoxines administrées par voie orale (Borst *et al.*, 2006a).

Au pôle apical des cellules épithéliales rénales, notamment dans le tube proximal rénal, MRP2 possède une fonction d'excrétion dans les urines.

De plus, le placenta humain est également une zone de grande expression de la MRP2, zone où elle a un effet protecteur contre les toxines.

Enfin, la MRP2 est exprimée dans les carcinomes ovariens, pulmonaires, gastriques, colorectaux et hépatiques, dans la leucémie, dans le cancer du sein et dans les mésothéliums (Suzuki and Sugiyama, 2002 ; Nies and Keppler, 2007). Elle confère une résistance à une grande variété d'anticancéreux.

#### 1.2.4.2. La MRP4

Le gène codant pour MRP4 humaine a été identifié en 1996 et est localisé sur le chromosome 13q32. Le transcrit MRP4 code une MRP courte de 1325 acides aminés ne possédant que 12 segments transmembranaires (Borst *et al.*, 2007).

La localisation membranaire de MRP4 est spécifique selon le type de cellules et de tissus. Elle est localisée au pôle apical des cellules rénales des tubes proximaux chez les rats et les humains mais au pôle basolatéral des cellules acineuses prostatiques, des hépatocytes humains et des cellules rénales de chien (MDCK) (Schinkel and Jonker, 2003 ; Nies and Keppler, 2007 ; Bartholome *et al.*, 2007). Cette caractéristique unique permet donc à ce transporteur d'être impliqué dans l'efflux de substrats vers le sang et les urines mais aussi à travers la matrice extracellulaire ou le stroma.

La MRP4 est fortement exprimée dans la prostate et modérément dans les poumons, les muscles squelettiques, le pancréas, la rate, le thymus, les testicules, les ovaires, les reins, la vessie, la vésicule biliaire et le petit intestin (Schinkel and Jonker, 2003).

Les substrats de la MRP4 incluent un large ensemble de composés anticancéreux, des antiviraux et des Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens. Ces derniers, en plus d'inhiber la synthèse des prostaglandines, pourraient également inhiber leur transport par MRP4 (Reid *et al.*, 2003b ; Borst *et al.*, 2007).

Parallèlement aux médicaments, des substrats physiologiques tels que les nucléotides cycliques, les conjugués stéroïdiens et le folate ont également été identifiés (Zelcer *et al.*, 2003).

## 2. Les Antibiotiques

Les antibiotiques se définissent comme des substances naturelles ou synthétiques capables d'inhiber la croissance ou même de tuer les bactéries, sans affecter leur hôte.

En effet, pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique aux germes visés et ce, sans perturber le fonctionnement des cellules eucaryotes. Idéalement, un antibiotique devra donc affecter une voie métabolique

absente ou peu active chez les eucaryotes mais essentielle aux procaryotes, ou encore atteindre une cible spécifique aux procaryotes.

A l'heure actuelle, les antibiotiques sont classés selon leurs principales cibles pharmacologiques. On distingue alors :

- Les Inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne (Bêta-Lactames, Glycopeptides) ;
- Les Inhibiteurs de la traduction (Tétracyclines, Macrolides, Lincosamides, Synergistines, Aminoglycosides, Oxazolidinones, Phénicolés) ;
- Les Inhibiteurs de la transcription (Rifamycines) ;
- Les Inhibiteurs métaboliques (Sulfamides, Diaminopyridines) ;
- Les Inhibiteurs d'enzymes impliqués dans le déroulement et le surenroulement de l'ADN (Fluoroquinolones) ou les antibiotiques causant des dommages à l'ADN (Nitroimidazoles, Nitrofuranes).

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes particulièrement intéressée à un antibiotique : la Ciprofloxacine, une Fluoroquinolone.

## **2.1. Pharmacocinétique cellulaire des antibiotiques**

La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un principe actif dans l'organisme. Elle prend en compte son absorption, sa distribution, son métabolisme et son élimination. La pharmacocinétique cellulaire est plus spécifiquement centrée sur l'évaluation de la pénétration, la distribution, la métabolisation et l'efflux des médicaments au niveau de la cellule (Van Bambeke *et al.*, 2006).

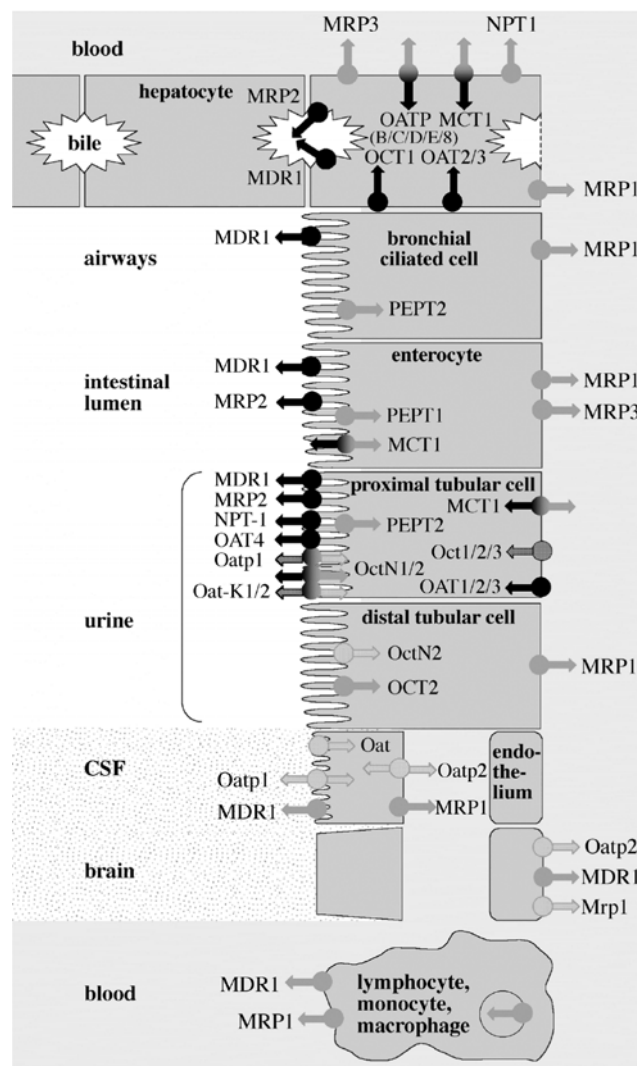
La pénétration au niveau cellulaire se fait par diffusion, endocytose ou au moyen de transporteurs ; la manière la plus courante étant la diffusion. Cependant, certaines caractéristiques physico-chimiques telles que la liposolubilité, une masse moléculaire inférieure à 700 Da et un état non-ionisé de la molécule sont requises. Le processus de diffusion dépend du pH, tant cellulaire qu'extracellulaire, les acides faibles diffusant plus rapidement en milieu acide et les bases faibles en milieu basique. La direction de la diffusion passive est déterminée par le gradient de concentration.

Dans la cellule, la molécule peut se distribuer dans différents compartiments cellulaires et peut être métabolisée et/ou accumulée.

La sortie de la molécule peut se faire par diffusion passive ou grâce à des transporteurs d'efflux présents à la surface des cellules eucaryotes. Ces transporteurs possèdent une large spécificité de substrats, reconnaissant les molécules notamment sur base de leur caractère

amphiphile et de la présence de fonctions ionisables (Van Bambeke *et al.*, 2000). La vitesse de l'efflux passif peut être différent de celle de l'influx suite à la liaison réversible ou irréversible de l'antibiotique à des constituants intracellulaires (Carryn *et al.*, 2003; Van Bambeke *et al.*, 2006).

Les pompes à efflux jouent un rôle important dans la pharmacocinétique de nombreux médicaments. Selon leur localisation tissulaire et cellulaire, elles auront des effets différents sur la biodisponibilité de ces médicaments. En effet, une localisation basolatérale au niveau des cellules polarisées permettra la rétention des substrats dans l'organisme et donc, une augmentation de leur biodisponibilité. Au contraire, une localisation apicale limitera cette biodisponibilité en accélérant leur clairance (Van Bambeke *et al.*, 2003b).



**Figure 10.** Représentation schématique des principaux transporteurs potentiellement impliqués dans le transport des antibiotiques dans les cellules épithéliales, la barrière hémato-encéphalique et dans les leucocytes. Les flèches noires correspondent aux transporteurs impliqués dans l'élimination de l'antibiotique de l'organisme. Les flèches grises correspondent aux transporteurs impliqués dans

l'accumulation de l'antibiotique dans les tissus ou au transport des cellules vers les liquides tels que le sang et le liquide céphalo-rachidien (Van Bambeke *et al.*, 2003b).

## 2.2. Pharmacodynamie cellulaire des antibiotiques

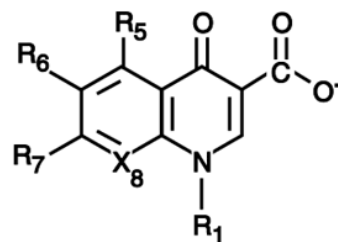
La concentration intracellulaire de l'antibiotique détermine son activité thérapeutique vis-à-vis d'infections intracellulaires. En effet, une accumulation trop importante de l'antibiotique pourrait avoir un effet toxique envers la cellule alors qu'une accumulation trop faible ne permettrait pas d'atteindre la concentration minimale inhibitrice d'une souche bactérienne, favorisant de cette manière l'apparition des résistances.

En plus des phénomènes d'accumulation et de distribution cellulaire des antibiotiques, les autres facteurs capables d'influencer leur activité intracellulaire sont la réponse bactérienne (le métabolisme bactérien peut être modifié dans les cellules), les conditions physico-chimiques du compartiment infecté (le pH acide des lysosomes affecte de nombreux antibiotiques) ou encore la coopération avec les défenses de l'hôte (production d'espèces oxydantes).

## 3. Les Fluoroquinolones

### 3.1. Généralités

Les Quinolones sont des médicaments d'origine synthétique dont il existe deux variétés : les Quinolones classiques et les Fluoroquinolones. De nombreux dérivés de ces substances ont été produits, tout en gardant la même structure de base :



La présence d'une fonction carboxylique en position 3, ainsi que d'un atome d'Oxygène exocyclique en position 4 est nécessaire à l'activité de l'antibiotique ; ces groupements ne sont jamais modifiés. Cependant, l'addition d'un Fluor en 6 et d'un cycle diaminé en 7 accroît très significativement l'activité des Fluoroquinolones par rapport aux dérivés originaux.

Ces Fluoroquinolones sont des antibiotiques bactéricides, concentration-dépendants, qui présentent un effet post-antibiotique traduit par le temps mis par la bactérie à recouvrer sa capacité de croissance après avoir été exposée à l'antibiotique.

### **3.1.1. Mécanisme d'action**

Les Fluoroquinolones inhibent la réplication de l'ADN bactérien en empêchant sélectivement l'action de deux enzymes de la classe des topoisomérases II : l'ADN-Gyrase (cible principale chez les GRAM-négatifs) et la topoisomérase IV (cible principale chez les GRAM-positifs).

Les enzymes topoisomérases sont responsables du déroulement-superenroulement de l'ADN : l'ADN-Gyrase enroule l'ADN pour permettre son stockage sous une forme compacte, alors que la topoisomérase IV le déroule lors de sa transcription en ARN messager ou de sa réplication.

La topoisomérase II humaine est différente de la topoisomérase bactérienne, notamment par le nombre de sous-unités. Cette caractéristique permet à l'antibiotique d'être actif sur la topoisomérase II bactérienne sans affecter l'humaine (Hooper, 1993 ; Hooper, 2000).

### **3.1.2. Résistance aux Fluoroquinolones**

Les Fluoroquinolones, dont l'usage s'est très répandu en peu de temps, se sont avérées une thérapie très précieuse et efficace dans le traitement de nombreuses infections. Bien sûr, la principale préoccupation liée à la très grande consommation de Fluoroquinolones est la résistance qu'elle entraîne.

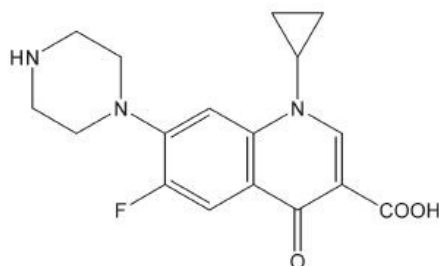
Cette résistance est le plus souvent de nature chromosomique. Trois grands mécanismes de résistance ont été mis en évidence (Pidcock, 1999):

- Mutation du gène codant la topoisomérase réduisant de cette manière l'affinité de l'antibiotique pour sa cible ;
- Acquisition ou surexpression de pompes à efflux ;
- Imperméabilisation de la paroi bactérienne, chez les GRAM-négatifs.

Deux mécanismes de résistance plasmidique ont également été décrits (Martinez-Martinez *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 2004) :

- Protection de la cible par production d'une protéine à motif penta-peptidique répété qui lie l'antibiotique (qnr) ;
- Inactivation de l'antibiotique par production d'une Acétylase.

### 3.2. La Ciprofloxacine



La Ciprofloxacine est une Fluoroquinolone de deuxième génération. Ces Fluoroquinolones sont très actives sur des bactéries GRAM-négatifs et sont donc principalement utilisées dans le traitement des infections urinaires, gastro-intestinales ou diverses infections nosocomiales. Elles agissent également sur des pathogènes atypiques mais ont une activité sur les bactéries à GRAM-positif très restreinte. La Ciprofloxacine reste la Quinolone la plus active contre le *Pseudomonas aeruginosa*, un agent fréquemment impliqué dans les pneumonies nosocomiales ou les infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose.

### 3.3. Pharmacocinétique et pharmacodynamie cellulaire

Les Fluoroquinolones sont des antibiotiques qui pénètrent probablement dans les cellules par simple diffusion passive (Michot *et al.*, 2004). A l'heure actuelle, ce modèle est quelque peu controversé. En effet, il a récemment été mis en exergue l'implication de certains transporteurs d'influx mais ce, uniquement dans des cellules épithéliales polarisées (Van Wert *et al.*, 2008).

Les Fluoroquinolones possèdent la capacité de s'accumuler dans les cellules phagocytaires telles que les macrophages et les leucocytes polymorphonucléaires mais aussi dans les cellules non-phagocytaires comme les fibroblastes. Cependant, elles ne s'accumulent pas dans les cellules anuclées telles que les érythrocytes (Carlier *et al.*, 1990). Cette accumulation des Fluoroquinolones dans les cellules leur confère un pouvoir thérapeutique vis-à-vis de diverses bactéries intracellulaires comme le *Staphylococcus aureus* ou le *Listeria monocytogenes* (Seral *et al.*, 2005).

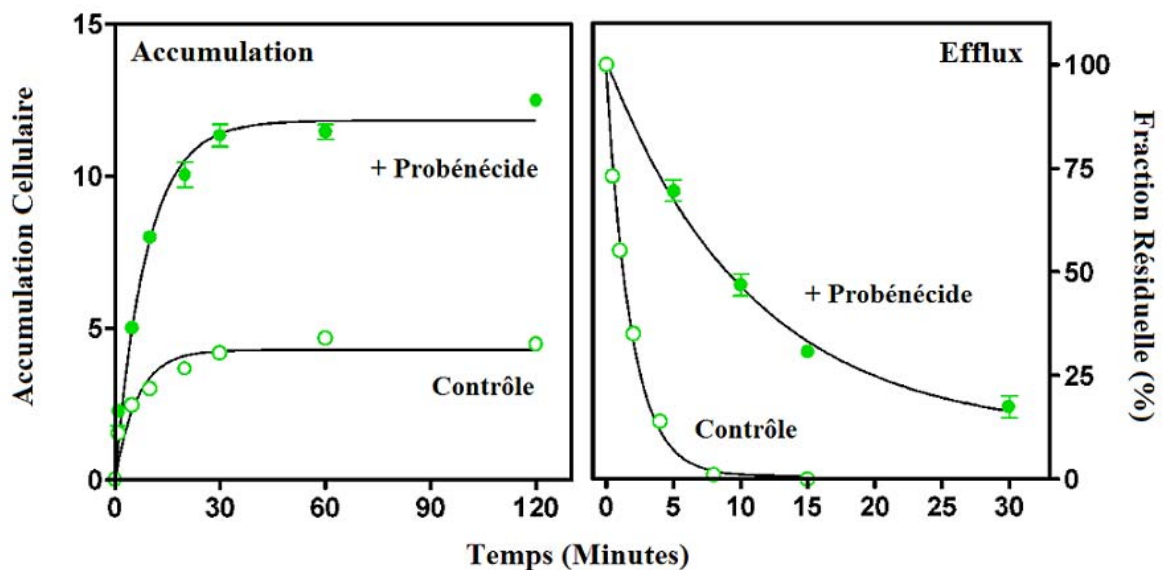
Des études ultérieures ont démontré que l'activité de la Ciprofloxacine contre les *Listeria* intracellulaires pouvait être renforcée en présence de Probenécide et de Gemfibrozil (Rudin *et*

*al.*, 1992 ; Seral *et al.*, 2003b). Ces effets ont été interprétés comme démontrant l'existence d'un mécanisme d'efflux de Fluoroquinolones (Michot *et al.*, 2004) similaire à celui responsable de l'expulsion des anions organiques observés dans les macrophages J774 (Steinberg *et al.*, 1987).

Récemment, il a été identifié au sein du laboratoire une interaction électrostatique entre la Ciprofloxacine chargée positivement à pH physiologique (7,4) et les têtes phosphatées des phospholipides chargées négativement. Cette interaction pourrait retenir la Ciprofloxacine au sein de la membrane, la rendant ainsi plus accessible aux transporteurs d'efflux (Bensikaddour *et al.*, 2008).

### 3.4. Les transporteurs d'efflux de la Ciprofloxacine

Les expériences précédemment réalisées au sein du laboratoire sur des macrophages J774 ont montré que la Ciprofloxacine est substrat d'une pompe à efflux appartenant aux Mrps (Michot *et al.*, 2004). En effet, son accumulation augmente en cas de déplétion d'ATP, en présence d'un inhibiteur de transporteurs d'anions organiques tel que le Probénécide ou le Gemfibrozil et en présence d'un inhibiteur spécifique des Mrps, le MK571.



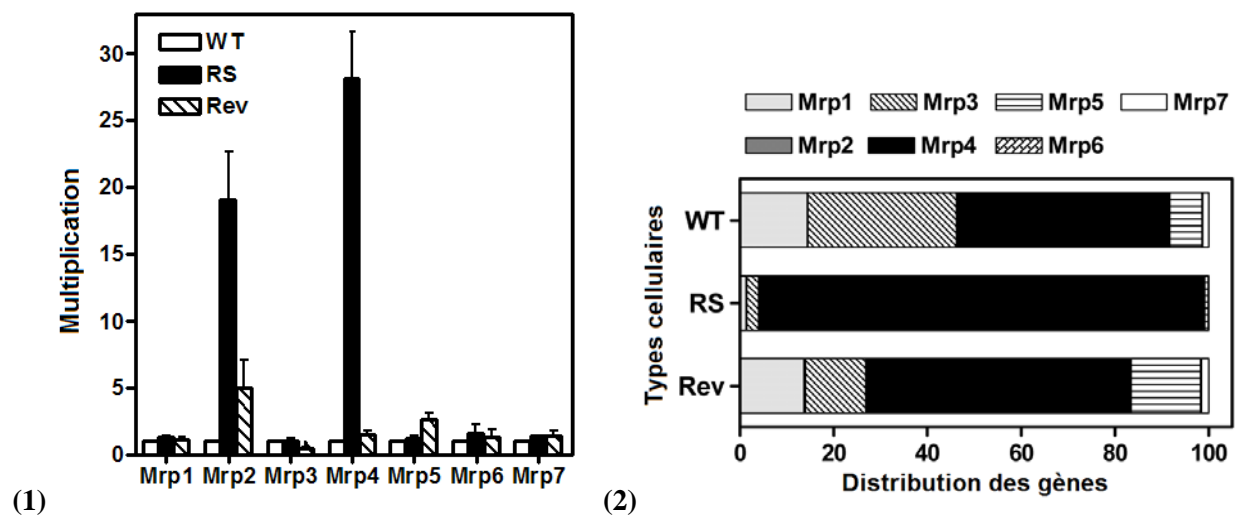
**Figure 11.** Les inhibiteurs des Mrps affectent considérablement l'accumulation et l'efflux de la Ciprofloxacine (Michot *et al.*, 2004)

Afin de déterminer quelle Mrp était impliquée dans l'efflux actif de la Ciprofloxacine, des macrophages J774 ont été rendus résistants à cette Fluoroquinolone par exposition chronique à des concentrations croissantes en Ciprofloxacine.



L'accumulation de Ciprofloxacine est fortement réduite dans les macrophages résistants ; elle est augmentée en présence de Probenécide ou de MK571, mais à des concentrations plus élevées que dans les macrophages sauvages. Ceci indique que la résistance est liée à une surexpression des pompes à efflux et/ou à une augmentation de leur activité (Michot *et al.*, 2006). Ce phénotype est réversible car des révertants, présentant le même phénotype que les cellules sauvages, ont pu être obtenus après quatre-vingt passages de culture en absence de Ciprofloxacine.

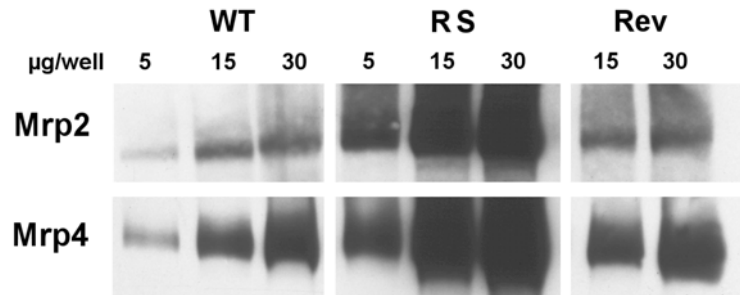
Afin d'identifier le ou les transporteur(s) responsables de l'efflux de la Ciprofloxacine dans les macrophages sauvages et résistants, des expériences de PCR en temps réel ont été réalisées au laboratoire. Les résultats montrent une augmentation des niveaux d'expression des ARN messagers des gènes codant pour Mrp2 et Mrp4 de 20 à 40 fois supérieure dans les cellules résistantes par rapport aux cellules sauvages (Marquez *et al.*, résultats soumis pour publication).



**Figure 12.** Quantification des transcrits d'ARN messagers des différents transporteurs *Mrps* dans les J774 sauvages, résistants à la Ciprofloxacine et les révertants. (1) Augmentation de l'expression dans les cellules résistantes ; les valeurs ont été normalisées en utilisant des gènes housekeeping tels que *Ywhaz* and *Rpl13A*. (2) Transcrits d'ARN messagers exprimés en pourcentage par rapport au nombre total de transcrits de *Mrp* détectés à partir de 1 µg d'ARN total purifié, pour chaque type cellulaire. Les données ont été obtenues à partir des valeurs moyennes du nombre de copies calculées pour chaque *Mrp* de chaque type cellulaire (Marquez *et al.*, résultats soumis pour publication).

En terme de nombre de copies, Mrp4 est nettement plus exprimée que Mrp2, à la fois dans les cellules sauvages et dans les résistants. Des expériences de Western-Blot ont permis de confirmer ceci en montrant une augmentation des niveaux d'expression des protéines

correspondantes (figure 13). De plus, le nombre de copies de Mrp2 dans les cellules résistantes est inférieur à celui de Mrp4 dans les cellules sauvages.



**Figure 13.** Western-Blot de protéines membranaires issues de macrophages sauvages (WT), résistants à la Ciprofloxacin (RS) et révertants (Rev) (Marquez *et al.*, résultats soumis pour publication).

Sur base de ces résultats et pour essayer d'identifier lequel de ces transporteurs est réellement impliqué dans l'efflux de la Ciprofloxacin, des ARN interférents ont été employés pour éteindre sélectivement l'expression de Mrp2 et Mrp4. En traitant les macrophages sauvages et résistants avec des siRNA anti-Mrp4, une augmentation de l'accumulation de Ciprofloxacin est constatée dans les deux types cellulaires. Dans le cas d'un traitement avec des siRNA anti-Mrp2, l'accumulation de Ciprofloxacin ne semble pas modifiée (Marquez *et al.*, résultats soumis pour publication).

Il semble donc que l'efflux de la Ciprofloxacin dans les macrophages J774 sauvages et résistants soit majoritairement dû à Mrp4.

#### **4. Antiviraux substrats des MRPs**

Dans le cadre de ce mémoire, les trois types de substrats que nous avons utilisés sont le PMEPA (Adefovir), le Saquinavir et le Ritonavir. Ces agents appartiennent à deux classes distinctes : les Inhibiteurs de la Transcriptase Inverse et les Inhibiteurs de Protéase.

##### **4.1. Les Inhibiteurs de la Transcriptase Inverse**

Ces Inhibiteurs de la Transcriptase Inverse peuvent être classés sous trois grandes catégories :

- Les Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse sont les premiers antirétroviraux développés ; ce sont des analogues de bases nucléiques. Pour être actifs, ils

nécessitent d'être phosphorylés dans le milieu intracellulaire. Ils entrent ensuite en compétition avec les substrats naturels de la Transcriptase Inverse et inhibent l'action de cette dernière, bloquant ainsi la synthèse d'ADN pro-viral. Cependant, des résistances sont observées, notamment en cas de mutations de la Transcriptase Inverse.

- Les Inhibiteurs Nucléotidiques de la Transcriptase Inverse sont des analogues de nucléotides qui possèdent déjà une phosphorylation. Leur demi-vie intracellulaire est beaucoup plus longue que celle des Inhibiteurs Nucléosidiques. Ces médicaments sont éliminés par voie rénale et ils peuvent être responsables de néphrotoxicité.
- On distingue également les Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse.

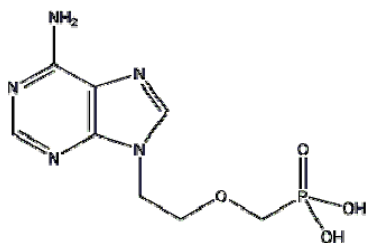
#### **4.2. Les Inhibiteurs des Protéase**

Les Inhibiteurs des Protéase sont des inhibiteurs spécifiques et réversibles de ces enzymes. Ceux-ci entraînent la production de particules virales immatures et non infectieuses. A la différence des Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse, ils ne nécessitent pas d'activation métabolique intracellulaire et sont donc actifs dans les cellules au repos.

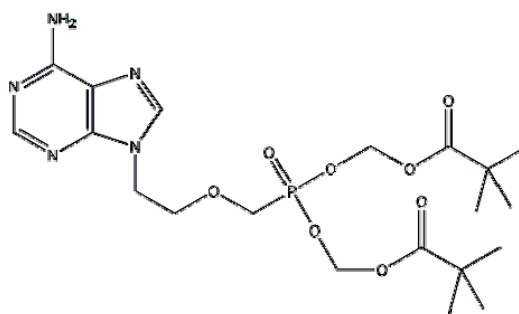
Les Inhibiteurs de Protéase sont tous fortement métabolisés et peuvent donc être responsables d'interactions médicamenteuses par inhibition des cytochromes P450. Par ailleurs, ils sont tous responsables d'effets indésirables propres caractérisés par des lipodystrophies (troubles de la répartition des graisses avec fonte du tissu adipeux sous-cutané du visage et des membres et augmentation de la graisse viscérale) et des troubles métaboliques lipidiques et glycémiques.

Une résistance aux inhibiteurs des Protéase se développe assez rapidement. Pour éviter ou retarder l'apparition de cette résistance, un inhibiteur de la Protéase virale n'est jamais utilisé seul mais est associé à un ou deux autres médicaments, généralement des Inhibiteurs de la Transcriptase Inverse. De fait, les thérapies combinant les Anti-Protéases et Inhibiteurs de la Transcriptase Inverse se sont avérées plus efficaces pour réduire la charge virale plasmatique, chez les patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (Collier, 1996).

#### **4.3. Le PMEPA, substrat préférentiel de MRP4**



**PMEA**



**Bis(POM)PMEA**

#### 4.3.1. Généralités

L'agent antiviral 9-(2-PhosphonylMethoxyEthyl)Adenine (PMEA ou Adefovir) est un analogue Nucléosidique Phosphonaté Acyclique présentant une activité antivirale à large spectre. Grâce à une interaction sélective entre son anabolite diphosphorylé, le PMEApp, et la Transcriptase Inverse ou l'ADN polymérase virale, le PME A a été reconnu comme étant un inhibiteur puissant de la réplication de rétrovirus (Human Immunodeficiency Virus de type 1 et 2), de virus Herpès (Herpes Simplex Virus de type 1 et 2) et de Hépadnavirus (Hépatitis B Virus) (Naesens *et al.*, 1996).

La présence d'un groupe phosphonaté dans ce composé offre un avantage certain aux analogues Nucléosidiques Phosphonatés Acycliques. En effet, ceux-ci sont capables de contourner la première étape de phosphorylation en un nucléoside-5'-monophosphate, catalysée par des kinases cellulaires telles que la Thymidine Kinase (Naesens *et al.*, 1997). En outre, les analogues Nucléosidiques Phosphonatés Acycliques sont relativement stables, grâce à la résistance du lien Carbone-Phosphore aux attaques des enzymes cataboliques. Toutefois, la charge négative associée à ce groupe phosphonaté au pH physiologique est responsable de la lente pénétration du PME A à travers les membranes biologiques, limitant de cette manière la biodisponibilité orale du PME A (Balzarini *et al.*, 1991 ; Cundy *et al.*, 1994). Dès lors, des esters lipophiles du PME A ont été synthétisés dans le but de masquer cette charge négative et ainsi obtenir une prodrogue perméable ; le Bis(PivaloylOxyMethyl)-PMEA est l'une de ces prodrogues. Celle-ci fut initialement sélectionnée par Shaw et Cundy, en 1993, en raison de son transport accru à travers les membranes des cellules Caco-2, qui sont généralement acceptées comme modèle dans les études *in vitro* de transport de médicaments.

### **4.3.2. Cibles et conséquences de l'activité du PME A**

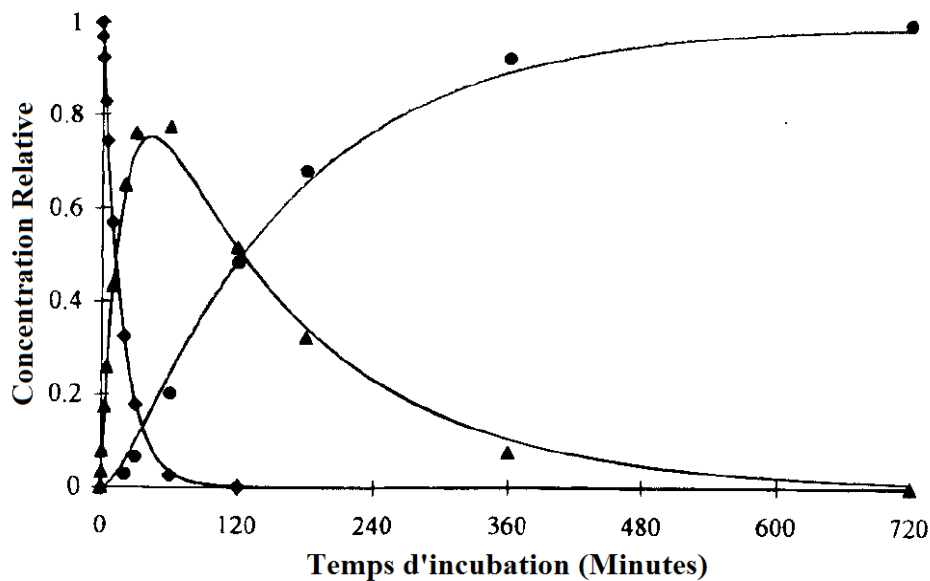
En plus de son activité inhibitrice envers l'ADN polymérase virale et la Transcriptase Inverse, le PME A, à des concentrations élevées, inhibe également les ADN polymérases alpha, delta et epsilon indispensables à la réplication cellulaire. Le PME A montre donc une activité antiproliférative nette envers un certain nombre de cellules tumorales à croissance rapide (Kramata *et al.*, 1996 ; Cihlar and Chen, 1997). En effet, après une exposition au PME A, les cellules tumorales sont arrêtées en phase S du cycle cellulaire. En fonction du type de cellules tumorales, deux mécanismes pourront être observés individuellement ou simultanément : un processus de différenciation et/ou l'enclenchement de la voie apoptotique (Hatse *et al.*, 1999).

En outre, il a récemment été démontré que le PME A réprime la prolifération des lymphocytes et, contrairement à un certain nombre d'autres analogues Nucléosidiques Phosphonaté Acycliques, n'augmente pas la production d'oxyde nitrique par les macrophages (Zidek *et al.*, 2003).

### **4.3.3. Métabolisation du PME A et de sa prodrogue**

La pénétration cellulaire du PME A se fait par un processus d'endocytose (Palu *et al.*, 1991). Dans le milieu intracellulaire, le PME A est métabolisé en ses formes mono- et diphosphorylées, respectivement dénommées PMEAp et PMEApp. Les enzymes responsables de la conversion du PME A en ses formes phosphorylées sont l'Adénylate Kinase (Robbins *et al.*, 1995) et la PhosphoRibosylPyroPhosphate Synthétase (Balzarini *et al.*, 1991). Le PMEApp correspond au métabolite actif responsable des activités biologiques du composé PME A (Balzarini *et al.*, 1991; Pisarev *et al.*, 1997). Il possède une demi-vie intracellulaire relativement longue (16-18 heures dans les cellules MT-4) et est dégradé par des enzymes cataboliques telles que l'ATPase, la Phosphodiesterase et la Nucléoside-Diphosphate Kinase (Balzarini *et al.*, 1991).

Contrairement au PME A, la prodrogue lipophile diffuse facilement à travers la membrane cellulaire. La conversion rapide du Bis(POM)PME A en PME A dans une série de différents types cellulaires fait de cette prodrogue un bon candidat pour étudier l'efflux du PME A. Celui-ci est en fait reformé à partir de Bis(POM)PME A après une hydrolyse en deux étapes. Le Mono(POM)PME A intermédiaire peut lui aussi être formé par une hydrolyse chimique en l'absence de cellules ou de sérum. Enfin, la conversion de ce Mono(POM)PME A en PME A requiert l'implication d'Estérases (Srinivas *et al.*, 1993).



**Figure 14.** Profil de dégradation du Bis(POM)PMEA (◆) en Mono(POM)PMEA (▲) et PME A (●) (Annaert *et al.*, 1998).

#### 4.3.4. Transport du PME A par MRP4

De nombreux auteurs ont décrit une implication des protéines MRP4 et MRP5 dans le transport d'analogues nucléosidiques (Scheffer *et al.*, 2000 ; Schuetz *et al.*, 1999 ; Wijnholds *et al.*, 2000). Par ailleurs, une induction cellulaire de la MRP4 est susceptible de créer une résistance cellulaire aux antiviraux ; ceci a notamment été observé avec le PME A, le 9-((2-PhosphonylMethoxy)Ethyl)Guanine (PMEG) ou l'Azidothymidine (AZT) (Schuetz *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2000).

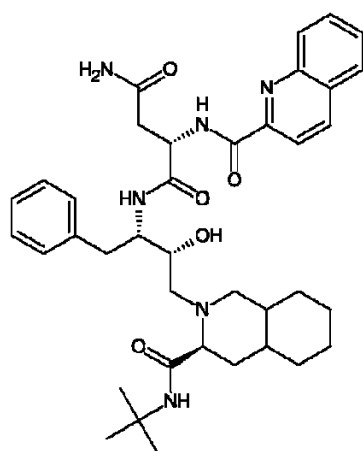
#### 4.3.5. Toxicité du PME A

En clinique, la toxicité du PME A est principalement rénale (Kahn *et al.*, 1999 ; Qaqish *et al.*, 2003). Cette néphrotoxicité est expliquée par la pénétration du PME A au niveau des cellules tubulaires proximales par les transporteurs hOAT1 (human renal Organic Anion Transporters 1) (Ho *et al.*, 2000). Cependant, l'excrétion rénale semble limiter cette néphrotoxicité (Miller, 2001). De plus, deux transporteurs, ABCG2 et MRP4, ont un rôle protecteur contre la cytotoxicité du PME A (Schuetz *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2000 ; Reid *et al.*, 2003a). Leur localisation au niveau du pôle apical des cellules tubulaires proximales peut en effet faciliter l'excrétion du PME A dans les urines. Cependant, il est nécessaire d'étudier comment MRP4 et

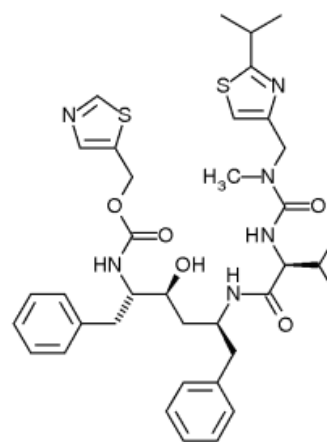
BCRP contribuent individuellement à protéger les cellules rénales contre la toxicité induite par les dérivés du PMEPA. Il a également été démontré qu'un autre transporteur rénal situé au pôle apical, MRP2, n'affecte pas l'élimination rénale du PMEPA (Takenaka *et al.*, 2007).

#### 4.4. Le Saquinavir et le Ritonavir, substrats préférentiels de MRP2

Dans un premier temps, l'agent antiviral que nous avons choisi pour représenter un substrat préférentiel de MRP2 fut le Saquinavir. Sur base de résultats quelque peu surprenants, nous avons également utilisé le Ritonavir, un autre inhibiteur des Protéase, à titre de contrôle.



**Saquinavir**



**Ritonavir**

##### 4.4.1. Généralités

Le Saquinavir est le premier inhibiteur de la Protéase du Virus de l'Immunodéficience Humaine à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché de la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis, le 6 décembre 1995. Son introduction en clinique a sensiblement amélioré la morbidité et la mortalité chez les patients infectés par le VIH. Le Saquinavir est bien toléré et a, *in vitro*, une puissance antirétrovirale élevée. Cependant, *in vivo*, son activité est limitée. En effet, le Saquinavir présente un certain nombre de limites biopharmaceutiques essentiellement liées à :

- Une mauvaise solubilité (Barry *et al.*, 1997) : Ce problème inhérent à la molécule a conduit au développement d'une nouvelle forme galénique améliorée ;
- Une forte liaison protéique : En effet, les IP se lient avidement à l'Alpha-1 Glycoprotéine Acide (AAG) réduisant de cette manière la fraction libre de médicament prête à traverser les membranes biologiques (Ford *et al.*, 2004) ;

- Un effet de premier passage important : Plusieurs études ont reporté qu'une combinaison de facteurs, incluant des enzymes hépatiques et intestinales, principalement le cytochrome P450 3A4, et les transporteurs membranaires d'efflux, comprenant la P-gp, les MRPs et la BCRP, affectent la biodisponibilité orale du Saquinavir, in vivo (Kim *et al.*, 1998 ; Williams *et al.*, 2002).

Il était donc nécessaire d'élaborer des stratégies pour améliorer la biodisponibilité orale du Saquinavir. En clinique, il a été constaté que la biodisponibilité orale du Saquinavir augmentait de manière significative lorsque les patients recevaient en complément du Ritonavir, un autre IP. Par la suite, il a été prouvé que le Ritonavir inhibe les isoenzymes du cytochrome P450 3A4 et, dans une bien moindre mesure, les transporteurs d'efflux.

#### **4.4.2. Transport du Saquinavir et du Ritonavir par MRP2**

Il a été démontré que la MRP2 humaine est un transporteur relativement efficace de Saquinavir, Ritonavir et Indinavir. Par ailleurs, ce transport peut être nettement amélioré en présence de Probenécide et Sulfinpyrazone (Huisman *et al.*, 2002). Ceci peut être expliqué par un mécanisme relativement simple. Il semblerait que MRP2 possède deux sites particuliers : l'un fixant des anions organiques tels que Probenécide et Sulfinpyrazone (GSH Binding Site), l'autre liant d'autres drogues telles que les inhibiteurs de Protéases (Drug Binding Site). L'occupation simultanée des deux sites pourrait dès lors activer l'exportation efficace de ces deux composés (Evers *et al.*, 2000).

#### **4.4.3. Toxicité du Saquinavir**

La tolérance du Saquinavir est plutôt correcte par rapport aux autres Inhibiteurs de Protéase. En effet, les effets secondaires digestifs sont relativement moins importants qu'avec d'autres molécules, les effets secondaires cutanés quasi inexistant. Cependant, une toxicité hépatique non négligeable peut être observée. Celle-ci pourrait dès lors aggraver des hépatites virales ou alcooliques préexistantes. Une adaptation de posologie doit donc être envisagée en cas d'insuffisance hépatique modérée, une contre-indication respectée en cas d'insuffisance hépatique sévère.

Le Saquinavir, seul, est l'inhibiteur de Protéase le moins hépatotoxique. Cependant, la combinaison de ce dernier au Ritonavir augmente considérablement les risques de dommages hépatiques.



## **OBJECTIFS DU TRAVAIL**

Les cellules eucaryotes expriment des pompes à efflux capables d'expulser un grand nombre de médicaments. Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que la Ciprofloxacine, une Fluoroquinolone, était substrat d'un transporteur MRP dans les macrophages J774 et que l'exposition chronique de ces cellules à la Ciprofloxacine sélectionnait des cellules résistantes surexprimant la Mrp2 et la Mrp4.

Le but de notre travail est d'examiner dans les macrophages sauvages ou résistants la compétition potentielle entre la Ciprofloxacine et des substrats préférentiels de Mrp2 et Mrp4, afin de compléter la caractérisation du transporteur de cette Fluoroquinolone.

Pour ce faire, nous avons :

- Caractérisé l'accumulation cellulaire de la Ciprofloxacine, du PMEA, du Saquinavir et du Ritonavir dans les macrophages J774 sauvages et résistants à la Ciprofloxacine ;
- Étudié l'effet d'un inhibiteur de pompes à efflux sur l'accumulation des antiviraux ;
- Effectué des expériences de compétition entre la Ciprofloxacine et les différents antiviraux, dans les deux types cellulaires.

# MATERIEL ET METHODES

## 1. Culture cellulaire

Toutes les expériences ont été réalisées sur des macrophages J774. Ceux-ci constituent une lignée cellulaire continue dérivée d'un réticulosarcome de souris BALB/c. Ces cellules adhérentes sont cultivés en monocouches dans du milieu RPMI 1640 (Gibco Biocult, Invitrogen Corporation, Paisley, Royaume-Uni) auquel est ajouté 10% de sérum de veau fœtal (Gibco Biocult, Invitrogen Corporation, Paisley, Royaume-Uni), à une température de 37°C et dans une atmosphère contenant de 5% de CO<sub>2</sub> (Snyderman *et al.*, 1977).

### 1.1. Les macrophages J774 sauvages

Les macrophages J774 murins sont subcultivés lorsqu'ils atteignent la confluence. Le milieu est alors éliminé, les cellules rincées au PBS et décollées de leur support à l'aide d'une solution de Trypsine-EDTA. Ces cellules détachées vont être reprises dans 10 mL de milieu RPMI 1640 (Gibco Biocult, Invitrogen Corporation, Paisley, Royaume-Uni) auquel est ajouté 10% de sérum de veau fœtal (Gibco Biocult, Invitrogen Corporation, Paisley, Royaume-Uni) et ensuite centrifugées à 900 rpm (Eppendorf 5810 C Centrifuge, Gerätbau Eppendorf GmbH, Mannheim, Allemagne), pendant 10 minutes. Après centrifugation, les cellules sont reprises dans 20 mL de milieu de culture et sont comptées à la cellule de Burkert. Les macrophages J774 sont alors incubés à une concentration de  $5 \cdot 10^4$  cellules par cm<sup>2</sup> pour les plaques à 6 puits et sont utilisés après deux jours d'incubation, au moment où ils atteignent la confluence, ce qui correspond à un nombre théorique de  $2 \cdot 10^6$  cellules par puits.

### 1.2. Les macrophages J774 résistants à la Ciprofloxacine

Les macrophages J774 ont été rendus résistants à la Ciprofloxacine par incubation chronique avec des concentrations croissantes de cet antibiotique sur une période de six mois (Michot *et al.*, 2006). Pour ce faire, après évaluation de la cytotoxicité de la Ciprofloxacine sur les macrophages sauvages, les cellules ont été sélectionnées par une incubation en présence de Ciprofloxacine à une concentration de 34 mg/L. Près de 99% de la population a été tuée, les 1% restants ont alors été exposés à des concentrations croissantes de cet antibiotique (34, 51 et 68 mg/L). Six passages à une concentration en Ciprofloxacine de 34 mg/L, sept à neuf passages à

51 mg/L et jusqu'à trente passages à 68 mg/L ont été nécessaires pour que les cellules récupèrent une vitesse de croissance semblable à celle des macrophages sauvages. Les macrophages résistants à la Ciprofloxacine sont continuellement cultivés en présence d'une concentration de 68 mg/L de Ciprofloxacine pour éviter la perte de leur caractère résistant.

Cette méthode de sélection a l'avantage de mener à l'obtention de cellules résistantes aux caractéristiques proches des cellules devenues résistantes *in vivo*, lors de traitement chronique par un médicament cytotoxique.

Les cellules résistantes ont la propriété de surexprimer les protéines d'efflux de la famille des MRPs. Les ARN messagers des Mrp2 et Mrp4 des cellules résistantes sont exprimées une trentaine de fois plus que dans les cellules sauvages (Marquez *et al.* ; résultats soumis pour publication).

## **2. Protocole des manipulations d'accumulation**

### **2.1. Incubation des macrophages J774**

Lorsque les macrophages J774 sont arrivés à confluence, le milieu de culture est remplacé par 3 mL de milieu de substitution auquel est ajouté le médicament d'intérêt et/ou un inhibiteur des pompes à efflux. Pour les cellules sauvages, aucune manipulation préliminaire n'est nécessaire. Cependant, pour les cellules résistantes, trois lavages au PBS seront indispensables pour éliminer la Ciprofloxacine extracellulaire ou absorbée à la surface de la cellule.

Dans le cadre d'une accumulation de Ciprofloxacine, le milieu de substitution utilisé est un milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal. Lors d'une accumulation de PMEPA de Saquinavir ou de Ritonavir, ce milieu est un tampon Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) à pH 7,4 contenant 25 mM de Glucose et 10 mM d'HEPES.

### **2.2. Récupération des cellules**

Après une incubation à 37°C, sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules sont lavées trois fois au PBS froid et récupérées sur glace ; le froid permettant de rigidifier les membranes et d'éviter la diffusion des médicaments.

Selon que l'on soit en présence de Ciprofloxacine ou de PMEPA, de Saquinavir et de Ritonavir, les cellules sont récupérées respectivement dans 1 mL de tampon Glycine-HCl 0,1 M à pH 3,0 ou 500 µL de Méthanol 70% glacé.

### **3. Hydrolyse de la prodrogue du PME A**

Le PME A est une molécule très polaire qui pénètre difficilement les membranes biologiques ; c'est pourquoi les premiers essais d'accumulation de cet antiviral se sont montrés peu concluants. Les expériences ont dès lors été réalisées en utilisant la prodrogue du PME A : le Bis(POM)PME A.

La dégradation des esters de PME A a été étudiée dans des lysats cellulaires, en suivant le protocole décrit par Annaert *et al.*, 1998.

Un lysat cellulaire de macrophages J774 a été préparé à partir d'une grande boîte de Pétri de 60 cm<sup>2</sup>. Après avoir remplacé le milieu de culture par 8 mL de tampon HBSS, les cellules ont été grattées sur un lit de glace. Celles-ci ont ensuite été soniquées pendant quelques secondes et enfin centrifugées à 13000 g (\*), pendant 5 minutes. Le surnageant a alors été récolté et conservé à 4°C. Le profil de dégradation a été déterminé en triplicat, à 37°C, en ajoutant à l'homogénat le Bis(POM)PME A de manière à obtenir des concentrations finales de 10 µM et 50 µM. A des temps prédéterminés, 100 µL d'échantillon ont été prélevés et ajoutés à un volume égal de Méthanol 70% glacé. Après une agitation et une centrifugation de 5 minutes à 3000 g de cet échantillon, celui-ci a été analysé par la méthode HPLC décrite *infra*.

### **4. Compétitions**

Afin de déterminer l'effet de la Ciprofloxacine sur l'accumulation des antiviraux, et inversement, des expériences de compétition entre ces médicaments ont été réalisées sur des macrophages J774 sauvages et résistants, surexprimant les transporteurs à efflux d'intérêt. Le médicament dont on cherche à déterminer l'accumulation est incubé à une concentration constante en présence de la concentration maximale de l'autre médicament, à savoir sa limite de solubilité, ou encore de concentrations croissantes.

### **5. Dosages**

#### **5.1. Dosage des protéines**

La méthode de Lowry, développée en 1951, est une méthode quantitative de dosage des protéines qui combine une réaction au Biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. La première étape de cette réaction est caractérisée par la complexation pourpre d'ions cuivriques avec les atomes d'Azote des liens peptidiques de la protéine, dans des conditions de pH alcalin. L'ion cuivrique est ainsi réduit en ion cuivreux. Ensuite, ces ions cuivreux et les radicaux du

Tryptophane, de la Tyrosine et la Cystéine des protéines réduisent le complexe Acide Phosphotungstique/Acide Phosphomolybdique contenu dans le réactif Folin-Ciocalteu, produisant ainsi une couleur bleue qui s'ajoute à celle du Biuret. La concentration en protéines totales est déterminée par rapport à un étalon d'Albumine bovine de concentration connue (BSA, 100 mg/L) et la lecture de la densité optique est réalisée à 660 nm, au moyen d'un photomètre.

Après avoir soniqué les lysats cellulaires durant 15 secondes, les échantillons sont dilués dans de l'eau de manière à obtenir une concentration se situant dans l'intervalle de linéarité de la méthode. Durant 30 minutes à 2 heures, ces échantillons sont mis au contact d'Hydroxyde de Sodium 1 N. Ensuite, 5 mL de réactif de Biuret préparé préalablement y sont ajoutés. Après 10 à 20 minutes, 500 µL de réactif de Folin dilué deux fois dans de l'eau sont additionnés. Enfin, après 30 minutes d'incubation, la mesure de la densité optique est effectuée.

La concentration en protéines de chaque échantillon est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Concentration en protéines (mg/mL)} = \frac{(\text{DO}_{\text{Echantillon}} - \text{DO}_{\text{Blanc}}) \times \text{Dilution} \times 100 \text{ } \mu\text{g/mL}}{(\text{DO}_{\text{Etalon}} - \text{DO}_{\text{Blanc}}) \times 1000}$$

Où les « 100 µg/mL » correspondent à la concentration de l'étalon utilisé et le facteur « 1000 » correspond au facteur de conversion de µg/mL en mg/mL.

## **5.2. Dosage de la Ciprofloxacine**

Le dosage de la Ciprofloxacine se base sur la fluorescence naturelle du noyau Quinolone de la molécule.

Les cellules contenues dans chacun des 6 puits d'une plaque sont récupérées sur glace, dans 1 mL de tampon Glycine-HCl 0,1 M à pH 3,0. Les lysats cellulaires seront alors placés en chambre froide durant une nuit ou laissés à température ambiante pendant deux heures, à l'abri de la lumière, de manière à faciliter la libération de l'antibiotique en dehors des cellules.

Après une centrifugation de 10 minutes à 14000 rpm (5810R Centrifuge, Gerâteban Eppendorf, GmbH, Engeldorf, Allemagne), l'antibiotique sera dosé dans le surnageant par fluorescence au moyen d'un fluorimètre (Perkin Elmer, LS 30, Royaume-Uni), à une longueur d'onde d'excitation de 275 nm et une longueur d'émission de 450 nm (Chapman and Georgopapadakou, 1989 ; Mortimer and Piddock, 1991).

La concentration cellulaire en Ciprofloxacine est déterminée par fluorescence, au moyen d'une droite d'étalonnage allant de 0 à 120 ng/mL, et est systématiquement exprimée par rapport au contenu des protéines cellulaires. Un facteur de conversion est utilisé : le volume cellulaire des macrophages J774 étant de 3,08  $\mu$ L pour 1 mg de protéines (Michot *et al.*, 2004). Celui-ci permet l'expression d'un facteur d'accumulation correspondant au rapport entre la Concentration Cellulaire ( $C_C$ ) et la Concentration Extracellulaire ( $C_E$ ), à savoir la concentration d'antibiotique mise en présence des cellules.

### **5.3. Dosage du PME A**

Dans un premier temps, nous avons tenté de doser cet antiviral par fluorimétrie, après dérivatisation du PME A avec le chloroacétaldéhyde (Sparidans *et al.*, 1999). Cependant, ces essais se sont montrés peu convaincants. Ensuite, le dosage a été réalisé par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance et ce, en suivant le protocole de Annaert *et al.*, 1997.

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

#### **5.3.1. Conditions d'utilisation**

Les cellules incubées en présence de PME A ont été lavées dans du PBS à 4°C et récupérées dans 500  $\mu$ L de méthanol 70%. En parallèle, une droite d'étalonnage allant de 0 à 100  $\mu$ M a été réalisée dans l'eau et dans les cellules.

La chromatographie a été effectuée à 4°C, sur une colonne Agilent C8 (4,6x250mm) avec un flux de 1 mL/min et un volume d'injection de 25  $\mu$ L. La phase mobile A est constituée d'Acétonitrile tandis que la phase mobile B est composée d'un mélange de 900 mL de tampon contenant du Potassium Dihydrogenophosphate 10 mM et du Tetrabutylammonium Hydrogensulfate 2 mM et de 50 mL d'Acétonitrile. Le mélange eau, Potassium Dihydrogenophosphate 10 mM et Tetrabutylammonium Hydrogensulfate 2 mM a été ajusté à pH 6,0 à l'aide de NaOH. Avant d'être utilisée, cette phase mobile a été filtrée et dégazée par sonication.

La séparation a été effectuée avec un gradient linéaire allant de 0 à 35% d'Acétonitrile durant les 10 premières minutes, suivi d'un plateau isocratique de 7,5 minutes et un retour aux conditions initiales, soit 100% de la phase mobile B, en 30 secondes. La ré-équilibration de la colonne sous la phase mobile B prend 17 minutes. Au total, les runs ont donc été lancés sur une période de 35 minutes.

Avant l'analyse, le pH des échantillons a été ajusté à 3,3 en ajoutant de l'HCl 0,05 N.

Le PMEa a été détecté à une longueur d'ondes de 260 nm, après un temps de rétention de 7 à 8 minutes.

### 5.3.2. *Validations de cette méthode de dosage*

#### 5.3.2.1. *Linéarité*

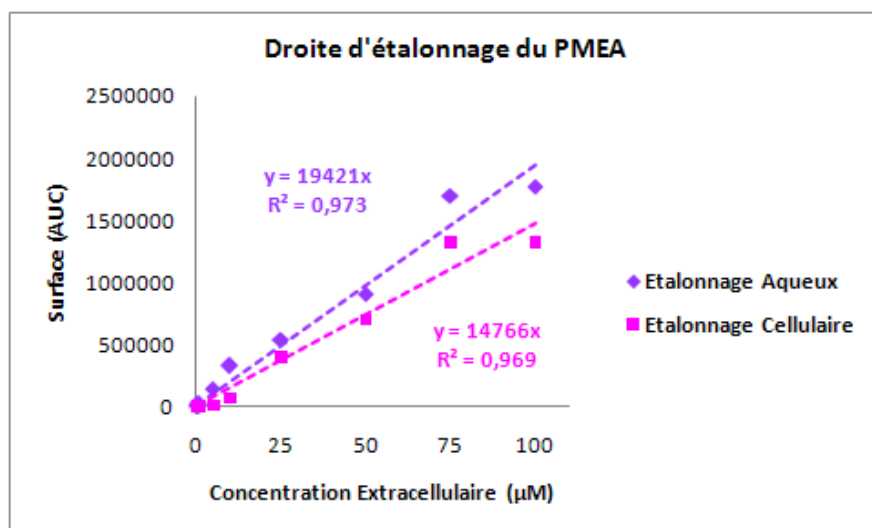
En statistiques, il arrive que deux grandeurs  $X$  et  $Y$  apparaissent liées par relation affine :  $Y = aX + b$ . La régression linéaire consiste à déterminer une estimation des valeurs  $a$  et  $b$  et à quantifier la validité de cette relation grâce au coefficient de corrélation linéaire.

Etudier la corrélation entre deux ou plusieurs variables aléatoires ou statistiques, c'est étudier l'intensité de la liaison affine qui peut exister entre ces variables. La mesure de cette corrélation est obtenue par le calcul du coefficient de corrélation linéaire :

$$r_p = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}}$$

Plus le coefficient est proche des valeurs extrêmes  $\pm 1$ , plus la corrélation entre les variables est forte.

Dans le cas présent, la droite d'étalonnage s'est avérée linéaire dans une gamme de concentrations allant de 0 à 75  $\mu\text{M}$ .



**Figure 15.** Etalonnages aqueux et cellulaire du PME A dans une gamme de concentrations allant de 0 à 75 µM.

La pente de l'étalonnage aqueux est légèrement supérieure à celle de l'étalonnage cellulaire suggérant dès lors une certaine quantité de médicament reste adsorbée aux cellules. Par conséquent, nous nous référerons à l'étalonnage cellulaire pour le calcul des concentrations cellulaires.

### 5.3.2.2. *Reproductibilité*

La reproductibilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats des mesures d'une même grandeur dans le cas où les mesures individuelles sont effectuées au moyen de différents instruments, suivant diverses méthodes, par des opérateurs distincts en des temps et des lieux différents.

Le coefficient de variation permet d'apprécier, en pourcentage, la reproductibilité d'une méthode analytique. Celui-ci correspond au rapport entre l'écart-type et la moyenne :

$$C_v = \frac{\sigma}{\mu}$$

Pour valider cette méthode de dosage, nous avons réalisé trois droites d'étalonnage réparties sur trois jours. Ceci nous a permis de calculer un coefficient de variation « interday » de 4,42%.



### 5.3.2.3. *Zone de sensibilité*

La zone de sensibilité d'une méthode analytique peut être définie à partir des limites de détection et de quantification de la méthode.

La limite de détection est la plus basse concentration pour un composé analysé dans une matrice réelle qui, lorsqu'il subit toutes les étapes d'une méthode complète, incluant les extractions chimiques et le prétraitement, produit un signal détectable avec une fiabilité définie statistiquement différent de celui produit par un « blanc » dans les mêmes conditions. La limite de quantification est, quant à elle, la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

Dans le cas présent, la limite de sensibilité se situe à 2,5  $\mu\text{M}$  ; la limite de quantification, à 1  $\mu\text{M}$ .

### 5.3.3. *Adaptation du gradient*

Après avoir analysé une première série d'échantillons cellulaires, nous avons constaté que les protéines cellulaires interféraient avec le pic correspondant à notre antiviral. Le gradient a donc été adapté tout en conservant des runs d'une durée de 35 minutes. La séparation a donc été effectuée avec un gradient linéaire allant de 0 à 35% d'Acétonitrile durant les 20 premières minutes, suivi d'un plateau isocratique de 3 minutes et un retour aux conditions initiales, soit 100% de la phase mobile B, en une minute. La ré-équilibration de la colonne sous la phase mobile B prend maintenant 9 minutes.

## 5.4. **Dosage du Saquinavir et du Ritonavir**

Après consultation de la littérature, il apparaît que l'HPLC est la technique chromatographique la plus fréquemment utilisée pour doser le Saquinavir et le Ritonavir. Le protocole utilisé est celui décrit par Ucpinar and Stavchansky, 2003.

### 5.4.1. *Conditions d'utilisation*

Les cellules incubées en présence de Saquinavir ou de Ritonavir ont été lavées dans du PBS à 4°C et récupérées dans 500  $\mu\text{L}$  de méthanol 70%. En parallèle, une droite d'étalonnage allant de 0 à 100  $\mu\text{M}$  a été réalisée dans l'eau et dans les cellules.

La phase mobile est constituée d'un mélange d'Acétonitrile et de tampon phosphate (contenant 3,042 g de Potassium Dihydrogen Phosphate et 0,6 mL de Triéthylamine par litre,

ajusté à un pH 3,1), dans les proportions 45/55. Avant d'être utilisé, la phase mobile a été filtrée et dégazée par sonication. La séparation chromatographique est achevée isocraquement en 14 minutes, à 25°C, sur une colonne Agilent C8 (4,6x250mm), avec un flux de 1 mL/min.

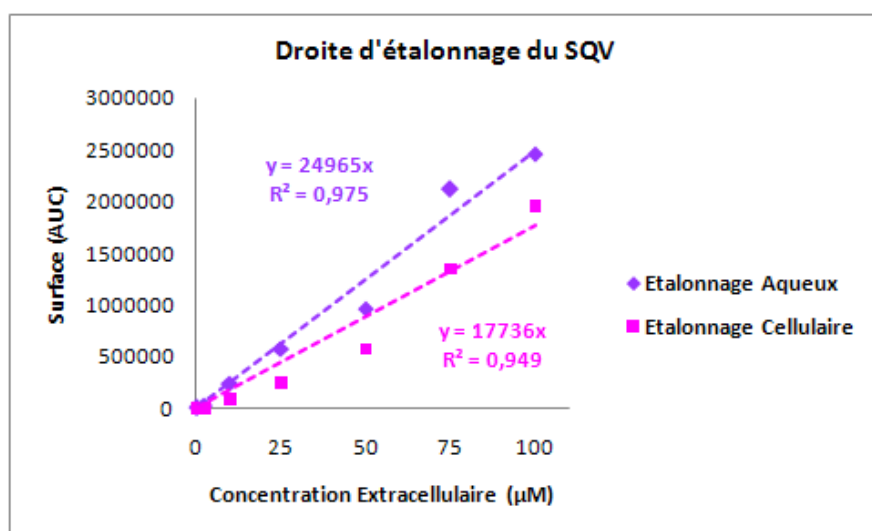
Le Saquinavir a été détecté à une longueur d'ondes de 239 nm, après un temps de rétention de 7 à 8 minutes ; le Ritonavir, après un temps de rétention de 10 minutes.

#### 5.4.2. Validations de cette méthode de dosage

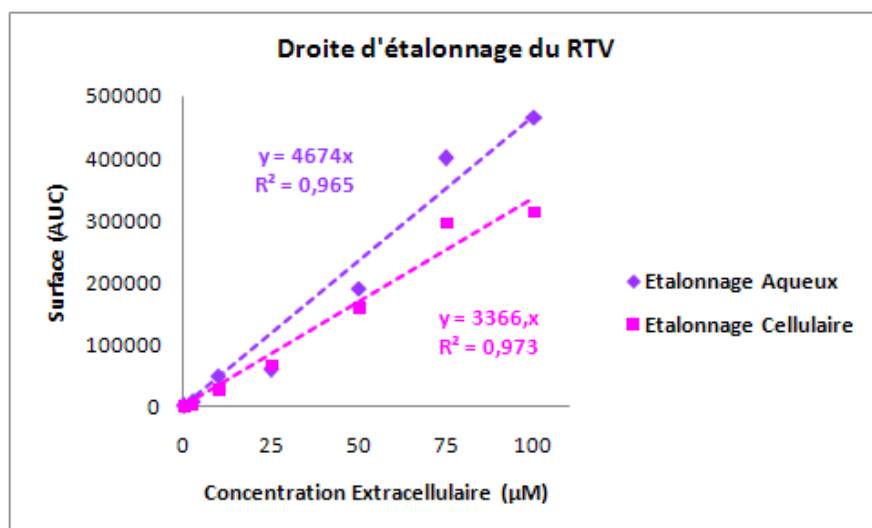
##### 5.4.2.1. Linéarité

Comme décrit précédemment, le coefficient de corrélation mesure la qualité de la relation linéaire entre deux variables aléatoires X et Y.

Ici encore, les coefficients de corrélation nous permettent d'apprécier la linéarité de cette droite ainsi que la qualité de la gamme d'étalonnage.



**Figure 16.** Etalonnages aqueux et cellulaire du SQV dans une gamme de concentrations allant de 0 à 100 µM.



**Figure 17.** Etalonnages aqueux et cellulaire du RTV dans une gamme de concentrations allant de 0 à 100 µM.

Pour les mêmes raisons que celles invoquées précédemment, l'étalonnage cellulaire servira de référence au calcul de concentrations cellulaires.

#### 5.4.2.2. *Reproductibilité*

La reproductibilité de cette méthode de dosage peut être appréciée par le calcul des coefficients de variation « interday » propres à chaque antiviral, à savoir 3,02% pour le Saquinavir et 5,38% pour le Ritonavir.

#### 5.4.2.3. *Zone de sensibilité*

Dans le cas présent, la limite de sensibilité propre à cette gamme de concentrations est de 2,5 µM pour le Saquinavir et le Ritonavir. Sa limite de quantification est de 1 µM.

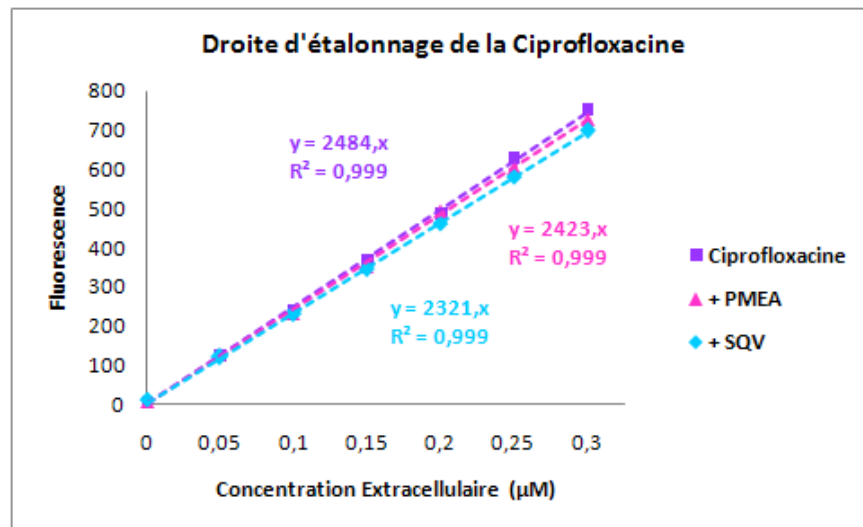
### 5.5. **Vérification de l'absence d'interférence**

Au cours de ce mémoire, nous avons été amenée à doser la concentration en Ciprofloxacin dans les cellules incubées en présence d'autres molécules. Il était donc important de vérifier si ces molécules n'interféraient pas dans le dosage cette Fluoroquinolone.

Pour ce faire, nous avons dosé la Ciprofloxacin seule ou en présence de chacune de ces molécules. Trois droites d'étalonnage ont donc été réalisées en parallèle. La première correspond à une droite d'étalonnage classique de Ciprofloxacin, dont les concentrations varient entre 0 et 120 ng/mL, préparée dans du tampon Glycine-HCl 0,1 M à pH 3,0. Les deux suivantes ont été

réalisées avec ces mêmes concentrations mais en y ajoutant une concentration en PME A ou Saquinavir équivalente à la concentration maximale de Ciprofloxacine utilisée pour cet étalonnage, à savoir 120 ng/mL.

Nous avons obtenu des droites d'étalonnage dont la pente vaut 94% de celle obtenue pour la Ciprofloxacine seule. Ceci indique donc une influence mineure du PME A et du Saquinavir sur le dosage de la Fluoroquinolone.



**Figure 18.** Non-interférence du PME A ou du SQV dans le dosage de la Ciprofloxacine par fluorimétrie. L'analyse statistique (ANOVA) ne démontre aucune différence significative entre ces différentes droites d'étalonnage.

### 5.6. Dosage de la Lactate Déhydrogénase

La mesure de la viabilité cellulaire se fait par le dosage de la libération de la Déhydrogénase (LDH).

La Lactate Déhydrogénase est un enzyme cytosolique qui se retrouve en milieu extracellulaire lorsque l'intégrité de la membrane plasmique est altérée. La viabilité cellulaire se mesure donc par le dosage enzymatique de la quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture cellulaire.

Son dosage s'effectue, grâce à sa grande stabilité en milieu extérieur, sur base de la mesure de consommation du NADH lors de la réaction de transformation du Pyruvate en Lactate.

La Lactate Déhydrogénase catalyse l'interconversion du Pyruvate et du Lactate selon la réaction suivante :  $\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Lactate} + \text{NAD}^+$  où une unité de LDH oxyde le NADH au rythme de 1 µmol/min.

L'activité de la LDH est mesurée tant dans les cellules que dans leur milieu d'incubation (Bergmeyer et al, 1974). L'enzyme est stable pendant 48 heures. Après congélation, l'activité diminue de 10 à 20% par 48 heures. En fin d'expérience, les milieux de culture et les cellules sont donc collectés. Les suspensions cellulaires sont soniquées.

Dans des cuvettes de 3 mL, 2,5 mL de solution NADH à 0,244 mM (Sigma), 20 µl de lysat cellulaire ou 50 µL de milieu d'incubation et 0,5 mL de Pyruvate à 9,76 mM (Sigma) sont mélangés rapidement. La lecture de l'absorbance se fait au moyen du photospectromètre (Genesys 2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) à 339 nm, toutes les minutes, pendant 5 minutes. La différence entre l'absorbance de départ et l'absorbance après 5 minutes est utilisée.

Le rapport entre l'activité de l'enzyme dans le milieu de culture et l'activité enzymatique totale se calcule comme suit :

$$\frac{[(DO_{\text{Milieu au } t0} - DO_{\text{Milieu au } t5}) - (DO_{\text{Blanc milieu au } t0} - DO_{\text{Blanc milieu au } t5})] \times \text{Volume du milieu } (\mu\text{l})}{\text{Volume test } (\mu\text{l})} \times 100$$


---


$$\frac{\text{Numérateur} + [(DO_{\text{Cellules au } t0} - DO_{\text{Cellules au } t5}) \times \text{Volume de lysat cellulaire } (\mu\text{l})]}{\text{Volume test } (\mu\text{l})}$$

### 5.7. Analyse statistique

Les résultats sont analysés par un test de comparaison multiple (Anova ; post-hoc test de Tukey) qui permet de mettre en évidence une différence significative entre les points sur base de la p-value obtenue. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives lorsque la p-value est inférieure à 0,05. Ces analyses statistiques ont été réalisées sur le programme informatique GraphPad InStat (San Diego, CA).

# RESULTATS

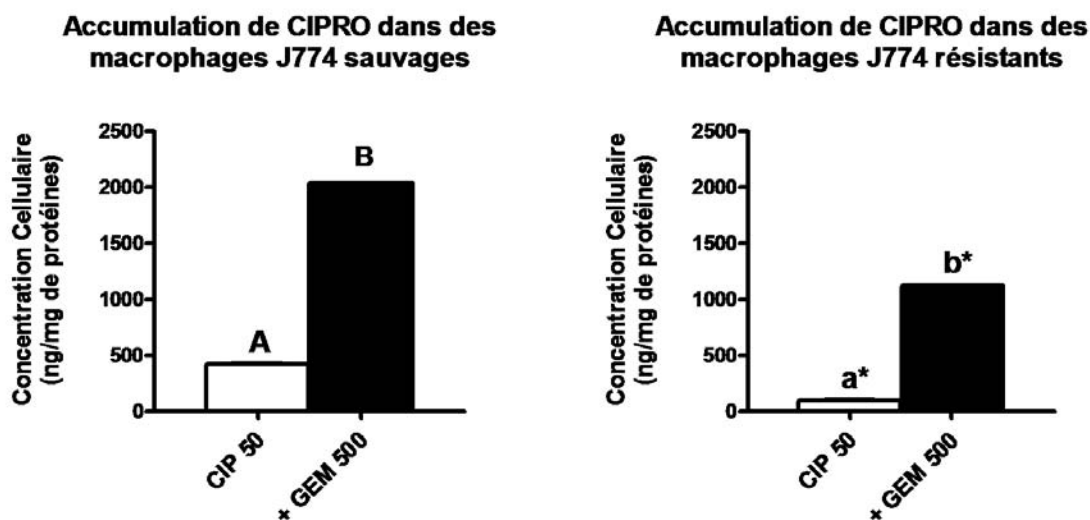
## 1. La Ciprofloxacine

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'accumulation de la Ciprofloxacine en présence ou non d'un inhibiteur des transporteurs d'anions, le Gemfibrozil.

Les expériences réalisées préalablement au laboratoire (Michot *et al.*, 2004; Michot *et al.*, 2006) ont permis de démontrer que :

- L'accumulation de Ciprofloxacine atteint son maximum en deux heures, dans les macrophages J774 ;
- Cette accumulation est fortement réduite dans les macrophages J774 rendus résistants à la Ciprofloxacine ;
- Le Probénécide, un autre inhibiteur des transporteurs anioniques, augmente cette accumulation dans les deux types cellulaires.

Nos propres résultats, présentés à la figure 19, corroborent les conclusions avancées par Michot *et al.*



**Figure 19.** Influence du Gemfibrozil 500  $\mu$ M sur l'accumulation de la Ciprofloxacine dans les deux types de macrophages. Ces cellules ont été incubées durant 2 heures, en présence d'une concentration extracellulaire de Ciprofloxacine de 50  $\mu$ M combinée ou non à l'inhibiteur (n=3).

Analyse statistique (ANOVA): Une différence significative entre conditions expérimentales est indiquée dans les macrophages sauvages par des lettres majuscules et dans les résistants par des lettres minuscules. Un astérisque (\*) désigne une différence significative pour une même condition, dans les deux types cellulaires ( $p < 0,05$ ).

En effet, dans les conditions contrôles, l'accumulation de Ciprofloxacine est nettement supérieure dans les cellules sauvages à celle des cellules résistantes, où elle est pratiquement nulle. Par ailleurs, l'accumulation de Ciprofloxacine est fortement augmentée dans les deux types cellulaires en présence de l'inhibiteur. En effet, le Gemfibrozil quadruple l'accumulation de cette Fluoroquinolone dans les macrophages sauvages et la décuple dans les macrophages résistants.

## **2. Le PMEa et sa prodrogue, le Bis(POM)PMEa**

### **2.1. Introduction**

Le PMEa est porteur d'un groupe phosphonaté qui, lorsqu'il est chargé négativement au pH physiologique, est responsable de la lente pénétration du PMEa à travers les membranes biologiques. Dans le but de masquer cette charge négative et ainsi obtenir une prodrogue perméable, des esters lipophiles du PMEa ont été synthétisés. Le Bis(PivalOxyloxyMéthyl)-PMEa est l'une de ces prodrogues.

Dans toute une série de types cellulaires, le Bis(POM)PMEa est rapidement converti en PMEa, après une hydrolyse en deux étapes :

- La première conduit à la formation de Mono(POM)PMEa à partir de Bis(POM)PMEa;
- La seconde entraîne la conversion de ce Mono(POM)PMEa intermédiaire en PMEa, sous l'action d'Estérases (Srinivas *et al.*, 1993).

### **2.2. Caractérisation in vitro**

#### **2.2.1. Stabilité**

Le PMEa dont nous disposons se présente sous la forme d'acide libre. Ce composé est donc dissous dans de l'eau milliQ à laquelle est ajoutée une quantité équimolaire de NaOH 10 N. Après dissolution, le PMEa est très stable en solution. Les stocks peuvent être conservés plusieurs mois, voire plusieurs années à 4°C.

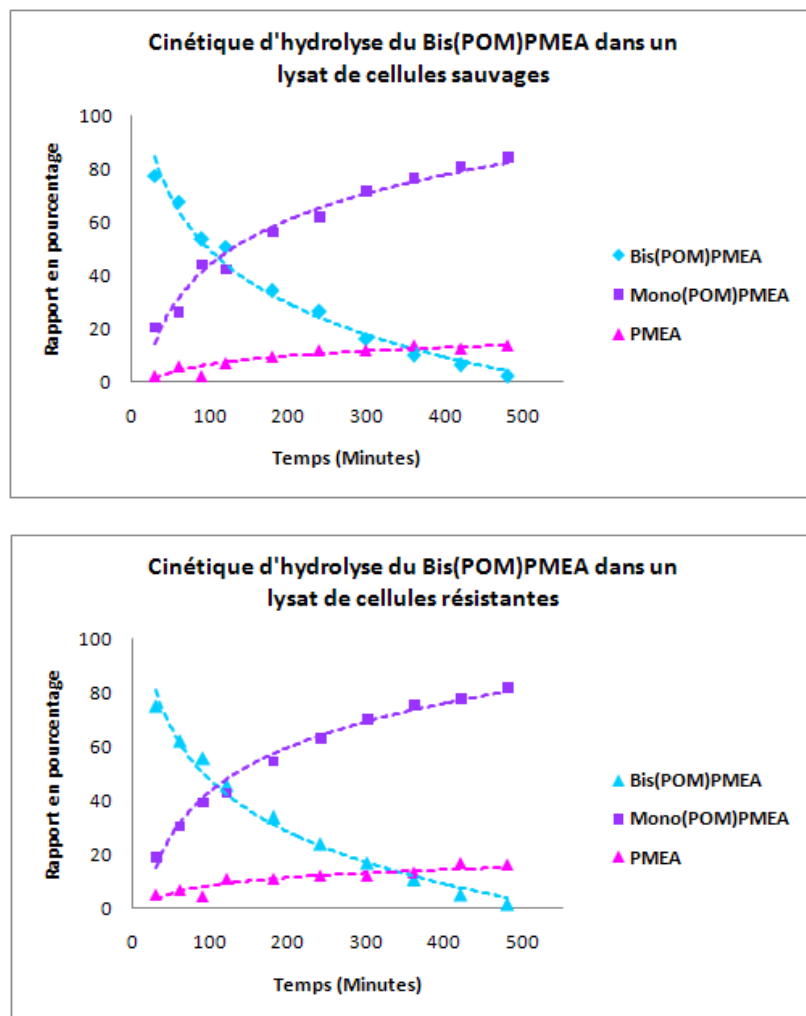
Contrairement au PMEa, le Bis(POM)PMEa est un ester sujet aux hydrolyses en solution. Avant chaque expérience, une solution stock de 25 mM est préparée en diluant le Bis(POM)PMEa dans du DiMéthylSulfOxyde. Cette solution stock sera elle-même diluée dans du tampon HBSS en veillant à ce que la concentration finale en DMSO soit inférieure à 0,4%.

### 2.2.2. Hydrolyse

Après des essais infructueux en milieu RPMI, la consultation de la littérature (Annaert *et al.*, 1997; Annaert *et al.*, 1998) nous a guidée vers l'utilisation du tampon HBSS limitant ainsi les hydrolyses extracellulaires du PME A ou de sa prodrogue.

### 2.3. Hydrolyse dans un lysat cellulaire

Le profil caractéristique de dégradation du Bis(POM)PME A dans des homogénats de cellules J774 sauvages et résistantes est décrit ci-dessous (figure 20). Celui-ci illustre clairement la dégradation rapide du Bis(POM)PME A mais aussi la formation progressive de Mono(POM)PME A et de PME A à partir de la prodrogue. En outre, ces profils sont similaires dans les lysats préparés à partir des deux types cellules.



**Figure 20.** Profil de dégradation du Bis(POM)PME A en Mono(POM)PME A et PME A, après une incubation de 50  $\mu$ M de Bis(POM)PME A dans un lysat de macrophages sauvages ou résistants (n=3).



## **2.4. Accumulations**

La cinétique d'accumulation est réalisée dans le but de déterminer le temps nécessaire pour atteindre un plateau d'accumulation. Le temps d'incubation qui permet l'accumulation maximale sera le temps d'incubation utilisé dans d'autres types d'expériences tels que les relations « dose-effet » et les compétitions, ainsi que les cinétiques d'efflux.

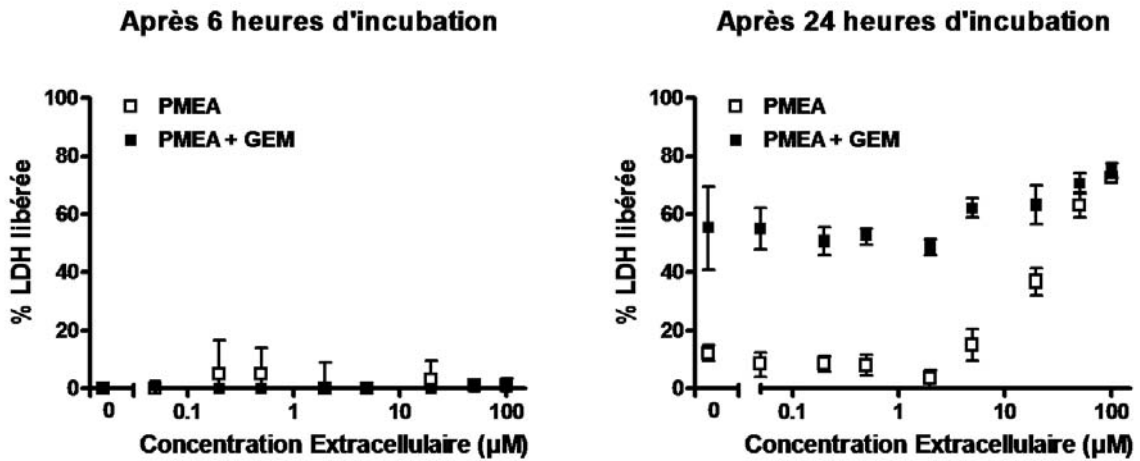
L'expérience « dose-effet » est réalisée pour déterminer l'effet de la concentration en antiviral sur son accumulation dans les cellules. Les concentrations en antiviral varient entre la concentration minimale qui permet de détecter un signal dans les lysats cellulaires et la concentration maximale correspondant à la limite de solubilité de l'antiviral.

### **2.4.1. Accumulation de PME A**

Pendant deux, six et vingt-quatre heures, les cellules sauvages et résistantes ont été incubées en présence de concentrations extracellulaires de PME A comprises entre 0 et 100  $\mu\text{M}$ . Après analyse, ces résultats se sont avérés non-quantifiables. Ceci nous permet de conclure que la concentration cellulaire en PME A doit être inférieure à 1 ng/mg de protéines.

### **2.4.2. Viabilité cellulaire**

Au cours des expériences d'accumulation du PME A, nous avons observé une perte protéique importante pour les cellules incubées en présence de Gemfibrozil, suggérant une toxicité cellulaire. Nous avons donc estimé la viabilité cellulaire en mesurant la libération de la LDH, une enzyme cytosolique, dans le milieu de culture (figure 21). Ceci a mis en évidence une perte de viabilité cellulaire importante dans les cellules sauvages incubées en présence de Gemfibrozil 500  $\mu\text{M}$ , pendant vingt-quatre heures. Pour la suite des expériences, nous nous sommes donc limitée à une durée d'incubation de six heures.



**Figure 21.** Mesure de la viabilité cellulaire après 6 et 24 heures d'incubation en présence de concentrations croissantes de PME A, avec ou sans inhibiteur (n=3).

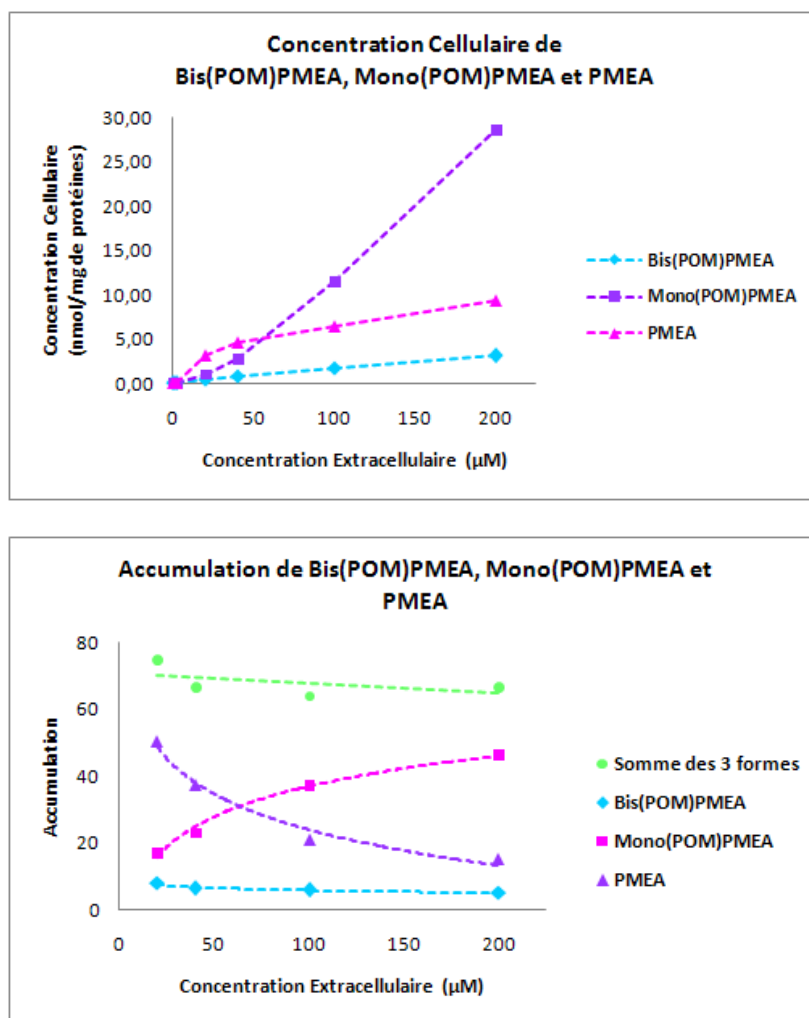
### 2.4.3. Accumulation de Bis(POM)PME A

Suite à l'observation d'une absence de pénétration cellulaire du PME A en milieu RPMI, nous avons décidé d'utiliser la prodrogue du PME A, qui pénètre plus facilement les membranes biologiques, et de remplacer le milieu RPMI par du tampon HBSS afin de minimiser le risque d'hydrolyse extracellulaire.

Les macrophages sauvages ont été incubés, pendant deux heures, en présence de différentes concentrations de Bis(POM)PME A allant de 0 à 200 µM (figure 22). L'analyse HPLC a révélé :

- Une rapide dégradation du Bis(POM)PME A ;
- Une importante formation de Mono(POM)PME A ;
- Une faible production de PME A.

Ces résultats décrivent donc parfaitement ce qui a été rapporté dans la littérature au sujet de la métabolisation de la prodrogue du PME A (Annaert *et al.*, 1998).



**Figure 22.** Cinétique d'accumulation du Bis(POM)PMEA, Mono(POM)PMEA et PMEa dans des macrophages sauvages incubés durant 6 heures, avec des concentrations extracellulaires croissantes de la prodrogue, allant de 2 à 200 µM (n=3).

L'accumulation de chacune des formes est calculé à partir d'un facteur de conversion de 3,08 µL pour 1 mg de protéines (Michot *et al.*, 2004). L'addition des trois formes met en évidence une accumulation élevée et constante, de près de 70, et ce dans les cellules sauvages.

## 2.5. Compétitions

Les expériences suivantes sont destinées à étudier la compétition entre la Ciprofloxacine et le PMEa ou sa prodrogue pour un même transporteur à efflux, dans les macrophages J774 sauvages et résistants.

Pour cela, nous avons incubé les deux types de macrophages pendant deux et quatre heures en présence de Ciprofloxacine 50 µM, seule ou additionnée soit de Gemfibrozil 500 µM, soit de concentrations croissantes de PMEa ou Bis(POM)PMEA, allant de 10 à 1000 µM. Enfin, la concentration cellulaire de Ciprofloxacine est déterminée par fluorimétrie.

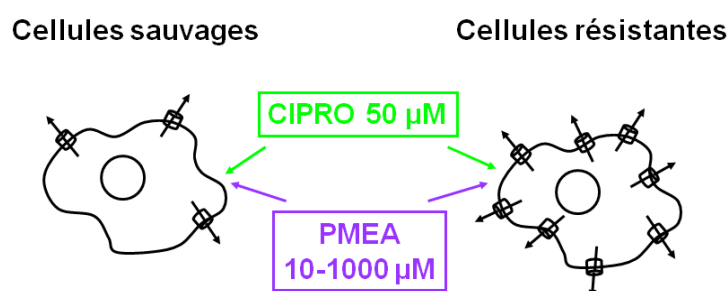
En parallèle, nous avons réalisé une expérience réciproque en incubant les cellules avec du Bis(POM)PMEA 50  $\mu\text{M}$ , seul ou additionné soit de Gemfibrozil 500  $\mu\text{M}$ , soit d'une concentration de Ciprofloxacine correspondant à sa limite de solubilité, à savoir 500  $\mu\text{M}$ . La concentration cellulaire de Bis(POM)PMEA, Mono(POM)PMEA et PMEAE est quant à elle dosée par HPLC.

### 2.5.1. Viabilité cellulaire

Après chacune des expériences de compétition, la viabilité des cellules a été mesurée par le dosage de la libération de la LDH dans le milieu de culture. De manière générale, aucune toxicité cellulaire n'est apparue excepté dans le cas de l'accumulation de Bis(POM)PMEA. En effet, après huit heures d'incubation, la présence de Gemfibrozil 500  $\mu\text{M}$  s'est avérée néfaste pour la viabilité de nos cellules.

Ceci justifie donc le fait que les expériences de compétition suivantes ont été réalisées sur des périodes d'incubation de deux et quatre heures.

### 2.5.2. Compétition entre la Ciprofloxacine et le PMEAE

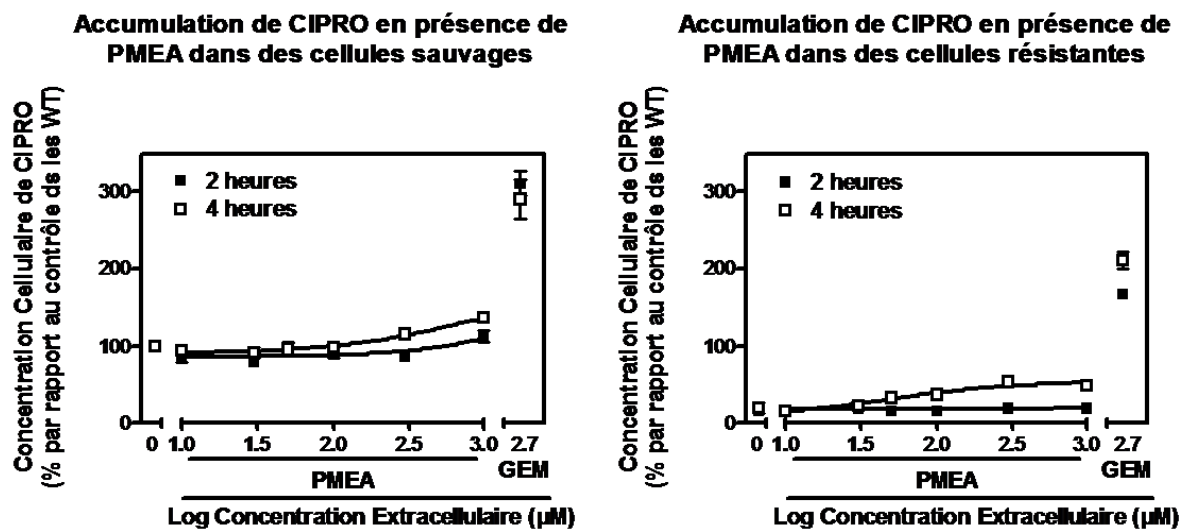


La figure 23 montre la concentration cellulaire en Ciprofloxacine dans les conditions contrôles (0  $\mu\text{M}$  en PMEAE), en présence de concentrations croissantes en PMEAE et en présence de 500  $\mu\text{M}$  de Gemfibrozil, à titre de contrôle positif. Cette concentration cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle dans les cellules sauvages et ce, afin de faciliter les comparaisons.

Comme décrit précédemment, la Ciprofloxacine s'accumule nettement moins dans les macrophages J774 résistants que dans les sauvages. De plus, son accumulation est fortement augmentée en présence de Gemfibrozil 500 $\mu\text{M}$ , un inhibiteur de pompes à anions organiques, tant dans les macrophages sauvages que résistants.

En présence de PME A à une concentration de 1000  $\mu\text{M}$ , l'accumulation de Ciprofloxacine est plus importante dans les macrophages sauvages que dans les conditions contrôles mais reste tout de même moindre qu'en présence de Gemfibrozil. Dans les cellules résistantes, l'accumulation de Ciprofloxacine est décuplée en présence de Gemfibrozil, mais le PME A n'a pas d'effet.

Le PME A est donc capable d'augmenter l'accumulation de Ciprofloxacine d'une façon moins efficace que le Gemfibrozil et ce, plus particulièrement dans les cellules résistantes.

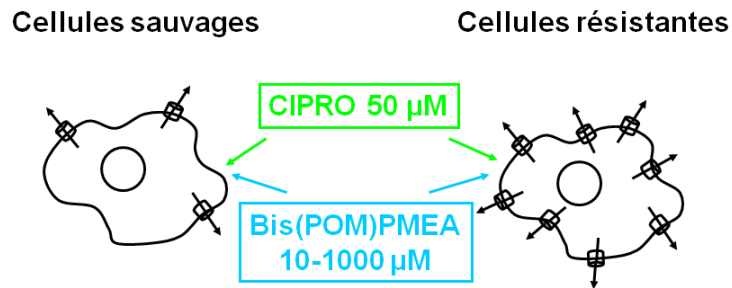


**Figure 23.** Influence de la concentration extracellulaire du PME A sur l'accumulation de Ciprofloxacine dans les macrophages J774 sauvages et résistants. Les cellules ont été incubées pendant 2 et 4 heures en présence de Ciprofloxacine 50  $\mu\text{M}$  seule ou additionnée de concentrations croissantes de PME A, allant de 10 à 1000  $\mu\text{M}$ , ou de Gemfibrozil 500  $\mu\text{M}$  (n=3).

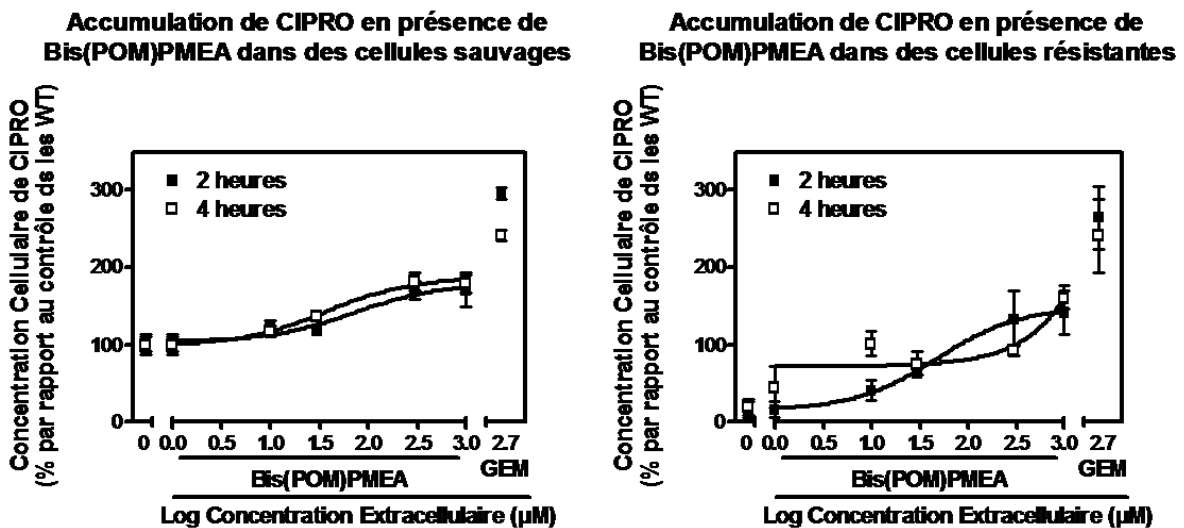
Ces résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'accumulation mesurée dans les conditions contrôles des cellules sauvages (soit 496,96 ng/mg de protéines); les concentrations en PME A sont présentées en échelle logarithmique. Cette représentation permet d'estimer la concentration en PME A nécessaire pour obtenir 50% de l'effet maximal ; dans le cas présent, cet effet n'est pas atteint.

### 2.5.3. Compétition entre la Ciprofloxacine et le Bis(POM)PMEA

#### 2.5.2.1. Accumulation de la Ciprofloxacine



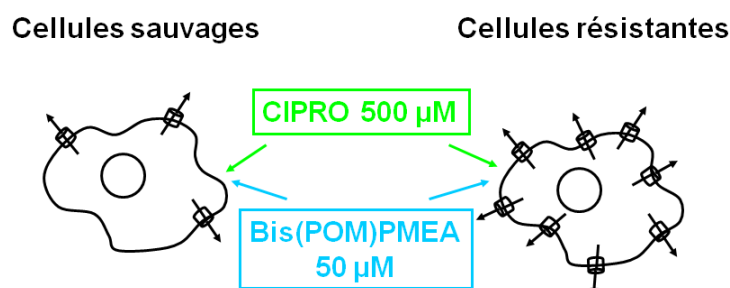
Lorsque les cellules sont mises en présence de la prodrogue de PME A comme compétiteur, on observe une augmentation concentration-dépendante de l'accumulation de Ciprofloxacine (figure 24). L'effet maximal obtenu est toutefois inférieur à celui du Gemfibrozil.



**Figure 24.** Influence de la concentration extracellulaire du Bis(POM)PMEA sur l'accumulation de Ciprofloxacine dans les macrophages J774 sauvages et résistants. Les cellules ont été incubées pendant 2 et 4 heures en présence de Ciprofloxacine 50 µM seule ou additionnée de concentrations croissantes de Bis(POM)PMEA, allant de 10 à 1000 µM, de Gemfibrozil 500 µM (n=3).

Ces résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'accumulation mesurée dans les conditions contrôles des cellules sauvages (soit 438,23 ng/mg de protéines) ; les concentrations en Bis(POM)PMEA sont présentées en échelle logarithmique. Cette représentation permet d'estimer la concentration en Bis(POM)PMEA nécessaire pour obtenir 50% de l'effet maximal. Pour une incubation de 2 et 4 heures, ces concentrations sont respectivement de 72,25 et 36,67 µM dans les cellules sauvages. Dans les résistantes, elle est de 47,67 µM pour une incubation de 2 heures. L'allure de la courbe ne permet pas le calcul de l'EC<sub>50</sub> à pour les 4 heures d'incubation.

### 2.5.2.2. Accumulation de Bis(POM)PMEA



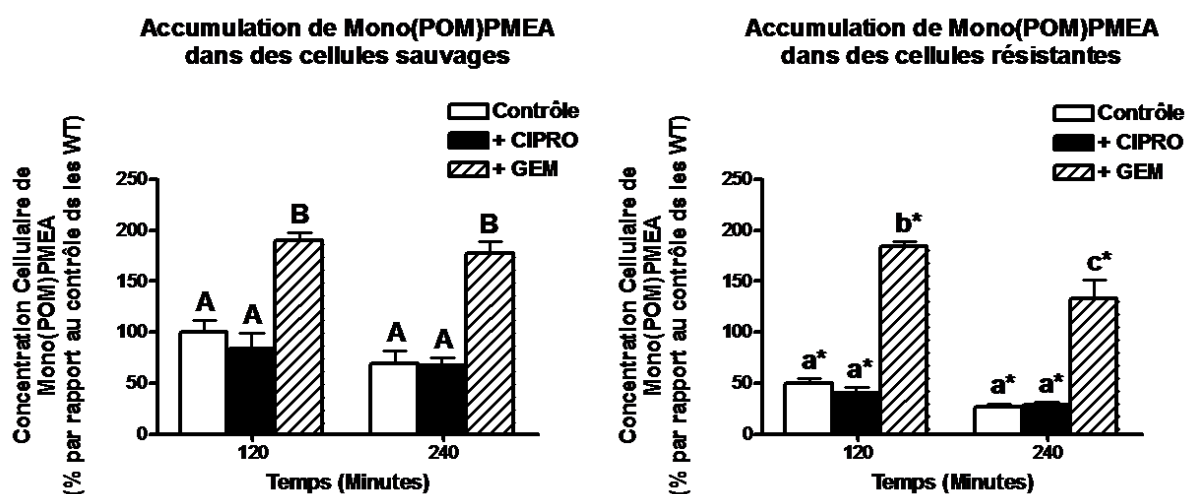
Les deux types cellulaires ont été incubés pendant deux et quatre heures en présence de Bis(POM)PMEA 50 µM, seul ou additionné soit de Gemfibrozil 500 µM, soit d'une forte dose de Ciprofloxacine correspondant à sa limite de solubilité, c'est-à-dire 500 µM (figure 25).

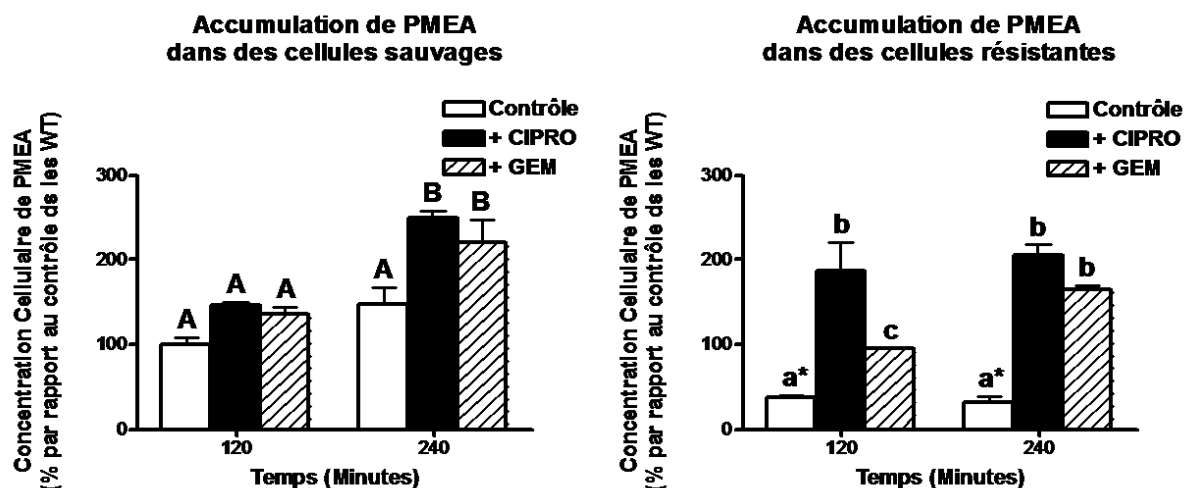
Après deux heures d'incubation, le Bis(POM)PMEA intracellulaire n'est plus détecté.

De manière générale, l'accumulation de Mono(POM)PMEA et de PMEAA ne semble pas fluctuer en fonction du temps d'incubation. De plus, leur accumulation est fortement réduite dans les macrophages J774 résistants, par rapport à celle mesurée dans les cellules sauvages.

La présence de Gemfibrozil augmente considérablement l'accumulation de Mono(POM)PMEA et dans une moindre mesure celle de PMEAA ; l'effet sur le PMEAA n'est de fait significatif que dans les cellules résistantes ou après quatre heures d'incubation dans les cellules sauvages.

La présence de Ciprofloxacine présente un effet comparable à celui du Gemfibrozil sur l'accumulation de PMEAA et ce, dans les deux types de cellules. Cependant, cette Fluoroquinolone ne semble pas influencer l'accumulation de Mono(POM)PMEA.





**Figure 25.** Influence du Gemfibrozil 500  $\mu\text{M}$  et de la Ciprofloxacine 500  $\mu\text{M}$  sur l'accumulation du Bis(POM)PMEA, du Mono(POM)PMEA et du PMEa dans les macrophages J774 sauvages et résistants. Les cellules ont été incubées pendant 2 et 4 heures avec une concentration de 50  $\mu\text{M}$  de Bis(POM)PMEA seul ou combiné aux autres médicaments.

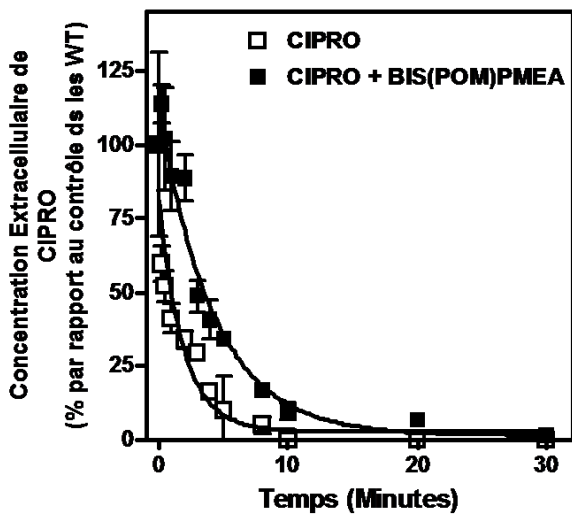
Analyse statistique (ANOVA): Une différence significative entre conditions expérimentales est indiquée dans les macrophages sauvages par des lettres majuscules et dans les résistants par des lettres minuscules. Un astérisque (\*) désigne une différence significative pour une même condition, dans les deux types cellulaires ( $p < 0,05$ ).

## 2.6. Cinétique d'efflux

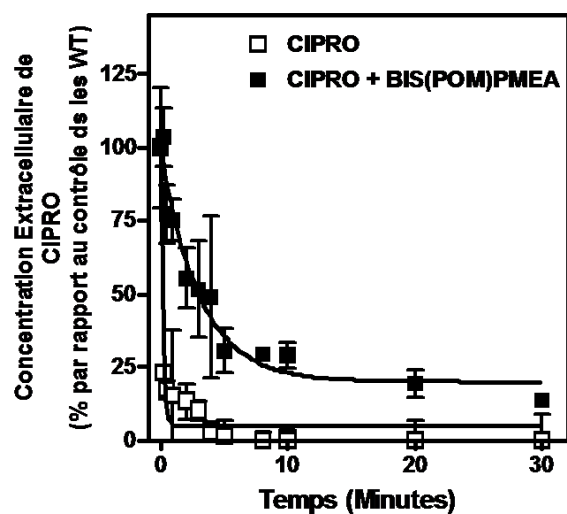
Afin de vérifier si le PMEa est bien un inhibiteur du transporteur de la Ciprofloxacine, nous avons étudié son influence sur l'efflux de cette même Fluoroquinolone (figure 26). Durant deux heures, les cellules sauvages ont été incubées en présence de Ciprofloxacine 50  $\mu\text{M}$ . Pour les cellules résistantes, 300  $\mu\text{M}$  de Bis(POM)PMEA ont été ajoutés au milieu d'incubation, et ce dans le but d'obtenir une concentration en Ciprofloxacine suffisante que pour pouvoir suivre son efflux. Ensuite, l'efflux a été réalisé en présence ou non d'une concentration de 1000  $\mu\text{M}$  de Bis(POM)PMEA, durant des temps allant de 0,25 à 30 minutes et ce, pour les deux types cellulaires.



**Efflux de la CIPRO en présence ou non de Bis(POM)PMEA dans des cellules sauvages**



**Efflux de la CIPRO en présence ou non de Bis(POM)PMEA dans des cellules résistantes**



**Figure 26.** Efflux de la Ciprofloxacine dans les cellules sauvages et résistantes. Durant 2 heures, les cellules ont été incubées en présence de la Ciprofloxacine seule (cellules sauvages) ou additionnée de 300  $\mu\text{M}$  de Bis(POM)PMEA (cellules résistantes). Ensuite, ce milieu a été remplacé par un milieu sans agent pharmacologique (contrôle) ou un milieu auquel était additionné de 1000  $\mu\text{M}$  de Bis(POM)PMEA. Ces résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'accumulation mesurée dans les conditions contrôles des cellules sauvages et résistantes (soit 352,43 et 257,45 ng/mg de protéines). Sur base de la régression exponentielle décroissante, les temps de demi-vie d'élimination peuvent être calculés. Dans les cellules sauvages, la  $t_{1/2}$  d'élimination de la Ciprofloxacine passe de 1,30 à 2,94 minutes en présence de Bis(POM)PMEA ; dans les résistantes, elle passe de 0,12 à 2,14 minutes.

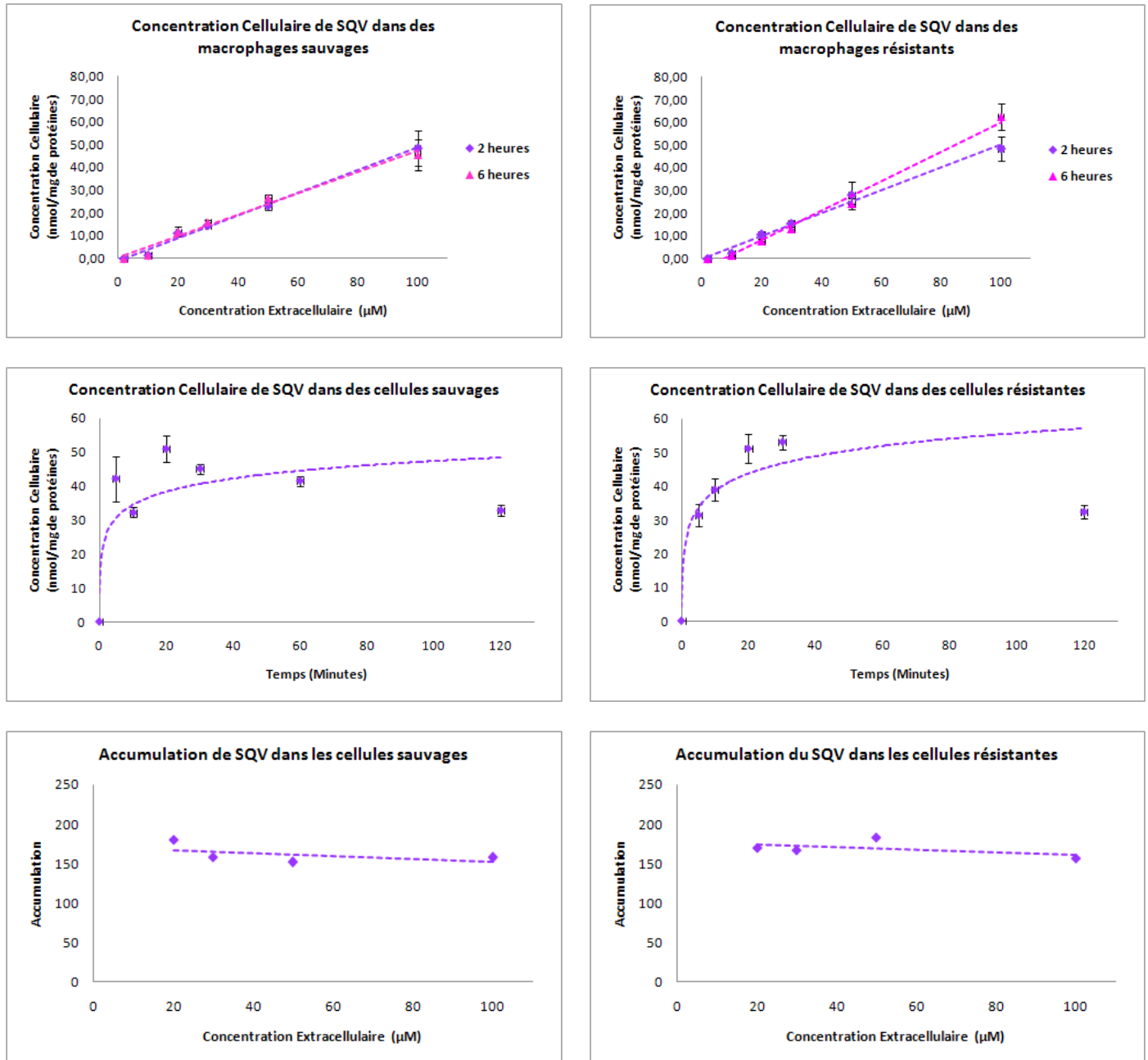
En l'absence de compétiteur, l'efflux de la Ciprofloxacine est rapide. En effet, l'antibiotique est complètement efflué en moins de dix minutes. Le temps de demi-vie d'élimination de cette Fluoroquinolone est de plus d'une minute dans les cellules sauvages et de cinq secondes dans les résistantes. En présence de Bis(POM)PMEA, cet efflux est efficacement ralenti. En effet, le temps de demi-vie passe alors à près de trois minutes pour les macrophages sauvages et à plus de deux minutes dans les résistants. Sur base de ces résultats, il apparaît donc que le PMEa (ou ses formes estérifiées) n'est pas que le simple substrat d'un transporteur de la classe des MRPs mais qu'il en est également un puissant inhibiteur.

### 3. Le Saquinavir

#### 3.1. Accumulation du Saquinavir

La concentration cellulaire du SQV est suivie en fonction du temps et de la concentration dans les deux types cellulaires (figure 27). Nous observons un même profil quel que soit le temps

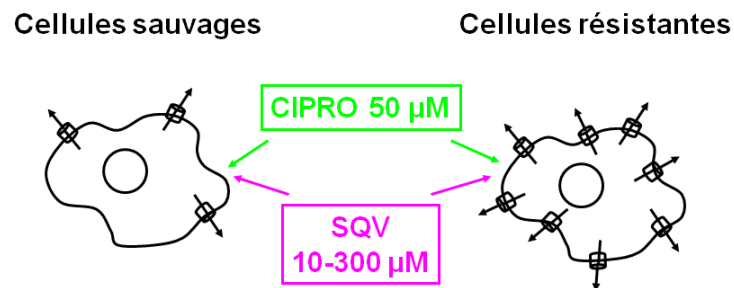
d'incubation. Par ailleurs, le facteur d'accumulation (panneau de droite) est constant et proche de 150 dans les deux types de cellules. Pour la suite de nos expériences, le temps d'incubation choisi sera donc de deux heures ou quatre heures.



**Figure 27.** Effet du temps et de la concentration extracellulaire sur la concentration cellulaire et l'accumulation du SQV dans des macrophages J774 sauvages et résistants. Les cellules ont été incubées pendant 2 et 6 heures, en présence de concentrations croissantes de SQV, allant de 2 à 100 μM (n=3). L'accumulation du SQV est calculé à partir d'un facteur de conversion de 3,08 μL pour 1 mg de protéines (Michot *et al.*, 2004). Celle-ci apparaît élevée et constante, de près de 150, et ce dans les deux types cellulaires.

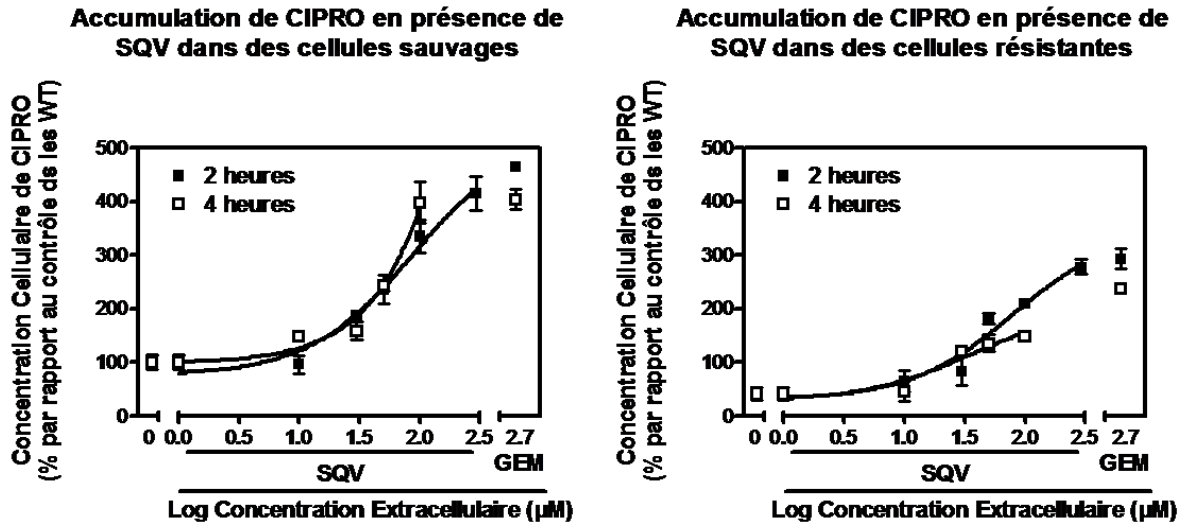
### 3.2. Compétitions entre la Ciprofloxacine et le Saquinavir

#### 3.2.1. Accumulation de Ciprofloxacine



En présence de Saquinavir, l'accumulation de Ciprofloxacine augmente de façon concentration-dépendante (figure 28). Dans les cellules sauvages, avec une concentration de 100 µM, cette augmentation est pratiquement semblable à celle observée en présence de Gemfibrozil. Dans les macrophages résistants, l'accumulation de Ciprofloxacine est sextuplée pour la plus forte concentration de Saquinavir étudiée mais atteint une valeur similaire à celle mesurée en présence de Gemfibrozil, après deux heures d'incubation.

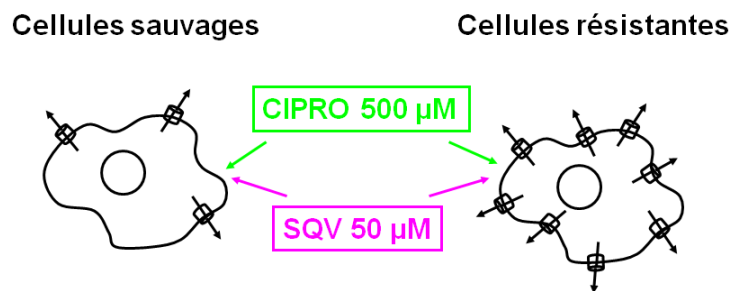
Il apparaît donc que le Saquinavir est aussi efficace que le Gemfibrozil dans les macrophages sauvages mais qu'il l'est légèrement moins dans les résistants.



**Figure 28.** Influence de la concentration extracellulaire du SQV sur l'accumulation de Ciprofloxacine dans les macrophages J774 sauvages et résistants. Les cellules ont été incubées pendant 2 et 4 heures en présence de Ciprofloxacine  $50 \mu\text{M}$  et de concentrations croissantes de SQV, allant de  $10$  à  $300 \mu\text{M}$ , ou de  $500 \mu\text{M}$  de Gemfibrozil ( $n=3$ ).

Ces résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'accumulation mesurée dans les conditions contrôles des cellules sauvages (soit  $475,54 \text{ ng/ml}$  de protéines); les concentrations en SQV sont présentées en échelle logarithmique. Cette représentation permet d'estimer la concentration en SQV nécessaire pour obtenir 50% de l'effet maximal. Pour une incubation de 2 heures, cette concentration est de  $87,34 \mu\text{M}$  dans les cellules sauvages et  $34,03 \mu\text{M}$  dans les cellules résistantes. L'allure de la courbe ne permet pas le calcul de l' $\text{EC}_{50}$  à pour les 4 heures d'incubation.

### 3.2.2. Accumulation de Saquinavir

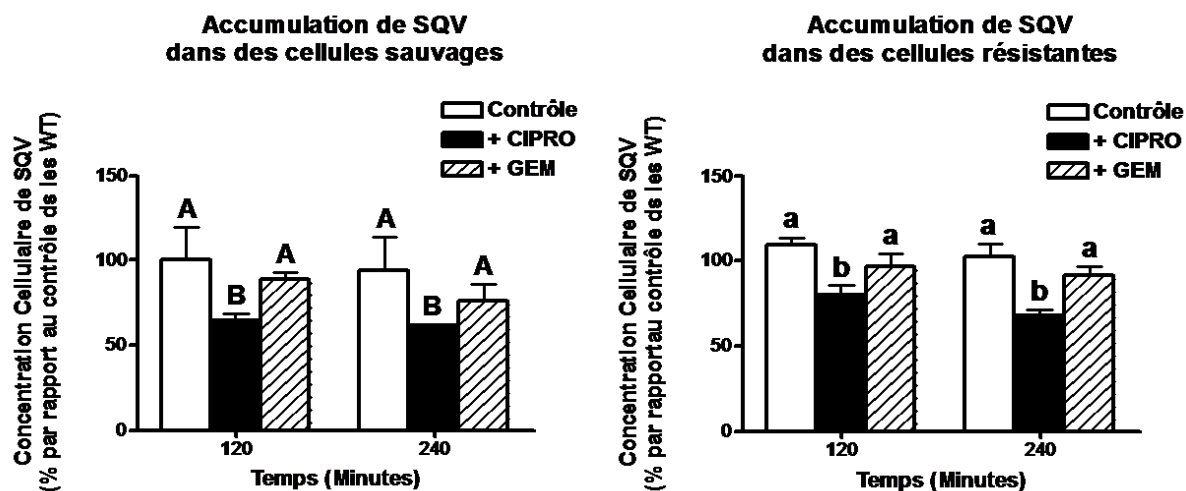


Les deux types cellulaires ont été incubés pendant deux et quatre avec du Saquinavir  $50 \mu\text{M}$ , seul ou additionné soit de Gemfibrozil  $500 \mu\text{M}$ , soit d'une forte concentration de Ciprofloxacine correspondant à sa limite de solubilité, à savoir  $500 \mu\text{M}$  (figure 29).

De manière générale, et comme décrit précédemment à la figure 27, la concentration de Saquinavir mesurée ne semble pas fluctuer au cours du temps. En effet, l'accumulation de Saquinavir est quasiment identique, que ce soit après deux ou quatre heures d'incubation.

La présence de Gemfibrozil ne semble pas modifier l'accumulation de Saquinavir dans les macrophages sauvages, ni même dans les résistants.

De même, la Ciprofloxacine ne semble pas non plus augmenter l'accumulation de Saquinavir dans deux types cellulaires.



**Figure 29.** Influence du Gemfibrozil 500 µM et de la Ciprofloxacine 500 µM sur l'accumulation du SQV dans les macrophages J774 sauvages et résistants. Pendant 2 et 4 heures, les cellules ont été incubées en présence de 50 µM de SQV seul ou combiné aux autres médicaments.

Analyse statistique (ANOVA): Une différence significative entre conditions expérimentales est indiquée dans les macrophages sauvages par des lettres majuscules et dans les résistants par des lettres minuscules. Dans les deux types cellulaires, pour une même condition, aucune différence significative n'a été observée.

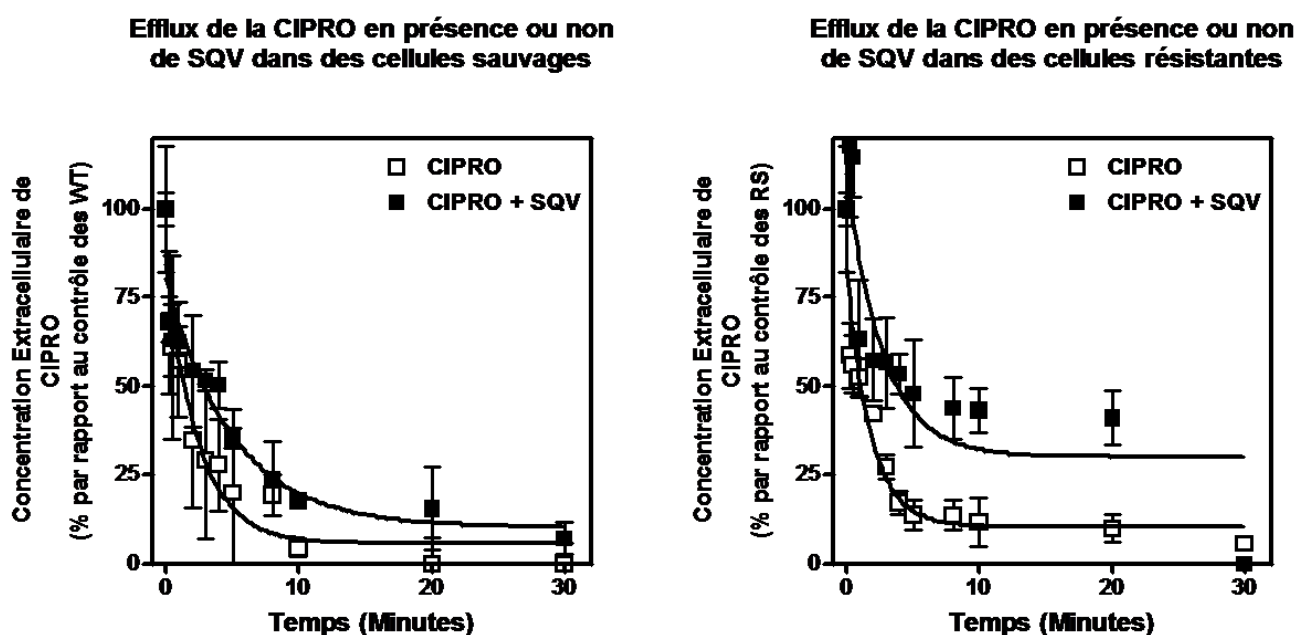
Ces résultats suggèrent donc que le Gemfibrozil et la Ciprofloxacine n'ont pas d'influence sur l'accumulation de Saquinavir au sein des macrophages J774 sauvages et résistants. Il apparaît donc clairement que le Saquinavir n'est pas substrat du transporteur d'efflux propre à la Ciprofloxacine mais qu'il n'en est qu'un « simple » inhibiteur.

### 3.2.3. Viabilité

Notons qu'après chacune des expériences de compétition, la viabilité des cellules a été mesurée par le dosage de la libération de la LDH dans le milieu de culture. De manière générale, aucune toxicité cellulaire n'est apparue.

### 3.3. Cinétique d'efflux

Afin de vérifier si le Saquinavir est bel et bien un inhibiteur du transport de la Ciprofloxacine, nous avons également étudié son influence sur l'efflux de cette même Fluoroquinolone. Durant deux heures, les cellules sauvages ont été incubées en présence de Ciprofloxacine 50  $\mu\text{M}$  ; concentration à laquelle était ajoutée 30  $\mu\text{M}$  de Saquinavir pour les cellules résistantes de manière à atteindre une concentration cellulaire initiale suffisante pour mesurer un efflux. Ensuite, l'efflux a été réalisé en présence ou non d'une concentration de 300  $\mu\text{M}$  de Saquinavir, durant des temps allant de 0,25 à 30 minutes (figure 30).



**Figure 30.** Efflux de la Ciprofloxacine dans les cellules sauvages et résistantes. Durant 2 heures, les cellules ont été incubées en présence de la Ciprofloxacine seule ou additionnée de 30  $\mu\text{M}$  de SQV. Ensuite, ce milieu a été remplacé par un milieu dépourvu d'agent pharmacologique (contrôle) ou auquel était additionné de 300  $\mu\text{M}$  de SQV.

Ces résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'accumulation mesurée dans les conditions contrôles des cellules sauvages et résistantes (soit 376,01 et 289,31 ng/mg de protéines). Sur base de la régression exponentielle décroissante, les temps de demi-vie d'élimination peuvent être calculés. Dans les cellules sauvages, le  $t_{1/2}$  d'élimination de la Ciprofloxacine passe de 2,19 à 3,50 minutes en présence de SQV ; dans les résistantes, il passe de 1,25 à 2,27 minutes.

Tout comme il a été décrit dans la figure 26, la Ciprofloxacine est effluée rapidement en l'absence de Saquinavir. Le temps de demi-vie d'élimination de cette Fluoroquinolone est supérieur à deux minutes dans les cellules sauvages et de plus d'une minute dans les résistantes. En présence de Saquinavir, cet efflux est également fortement ralenti. En effet, le temps de demi-

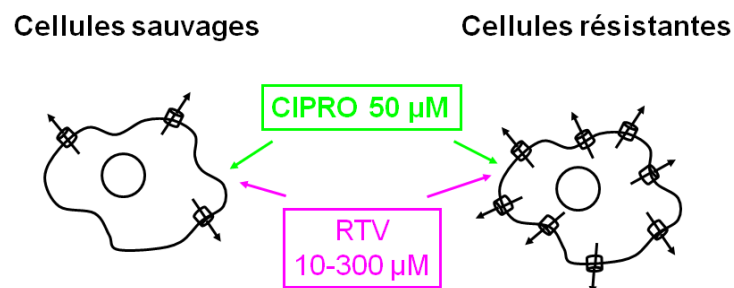
vie passe alors à plus de trois minutes pour les macrophages sauvages et à plus de deux minutes dans les résistants. Par conséquent, il apparaît maintenant évident que le Saquinavir est un puissant inhibiteur du transporteur d'efflux propre à la Ciprofloxacine.

#### 4. Le Ritonavir

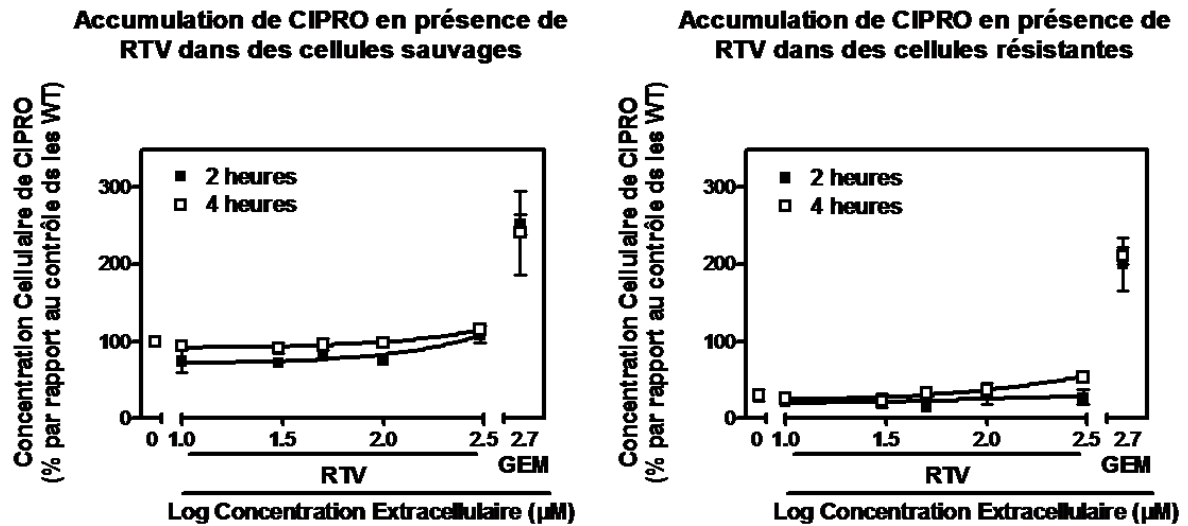
A titre de contrôle, des expériences de compétition ont été réalisées avec un autre antiviral appartenant à la classe des Inhibiteurs de Protéase, le Ritonavir.

##### 4.1. Compétitions entre la Ciprofloxacine et le Ritonavir

##### 4.2.1. Accumulation de Ciprofloxacine



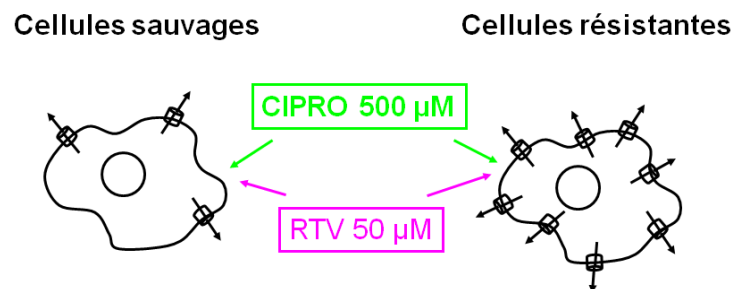
Contrairement à ce qui a été observé avec le Saquinavir, le Ritonavir ne semble avoir aucun effet sur avec l'accumulation de la Ciprofloxacine dans les macrophages J774 sauvages et résistants (figure 31).



**Figure 31.** Influence de la concentration extracellulaire du RTV sur l'accumulation de Ciprofloxacine dans les macrophages J774 sauvages et résistants. Les cellules ont été incubées pendant 2 et 4 heures en présence de Ciprofloxacine 50 µM seule ou additionnée de concentrations croissantes de RTV, allant de 10 à 300 µM, ou de Gemfibrozil 500 µM (n=3).

Ces résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'accumulation mesurée dans les conditions contrôles des cellules sauvages (soit 464,44 ng/mg de protéines) ; les concentrations en RTV sont présentées en échelle logarithmique. Cette représentation permet d'estimer la concentration en RTV nécessaire pour obtenir 50% de l'effet maximal ; dans le cas présent, cet effet n'est pas atteint.

#### 4.2.2. Accumulation de Ritonavir

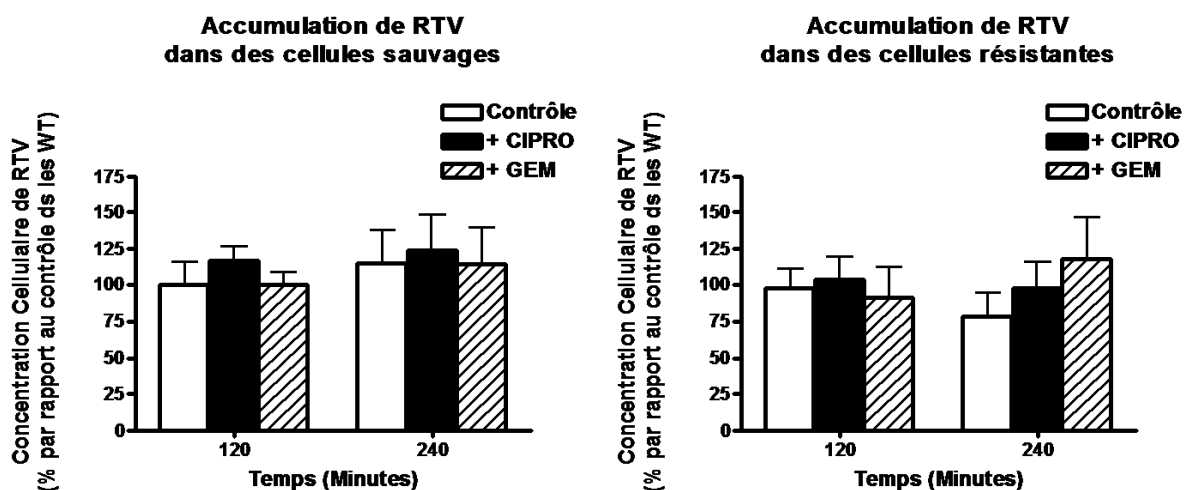


Les deux types cellulaires ont été incubés pendant deux et quatre heures avec du Ritonavir 50 µM, seul ou additionné soit de Gemfibrozil 500 µM, soit d'une forte concentration de Ciprofloxacine correspondant à sa limite de solubilité, c'est-à-dire 500 µM (figure 32).

De manière générale, la concentration de Ritonavir mesurée ne semble pas fluctuer au cours du temps. En effet, l'accumulation de Ritonavir est presque identique d'un temps d'incubation à l'autre.

Par ailleurs, tout comme pour le Saquinavir, nous observons que ni le Gemfibrozil, ni la Ciprofloxacine n'ont d'effet sur l'accumulation du Ritonavir au sein des macrophages J774 sauvages et résistants.





**Figure 32.** Influence du Gemfibrozil 500  $\mu\text{M}$  et de la Ciprofloxacine 500  $\mu\text{M}$  sur l'accumulation du RTV dans les macrophages J774 sauvages et résistants. Les cellules ont été incubées pendant 2 et 4 heures avec 50  $\mu\text{M}$  de RTV seul ou combiné aux autres médicaments.

Analyse statistique (ANOVA): Que cela soit pour une même condition dans les deux types cellulaires ou pour les différentes conditions expérimentales au sein d'un seul type de cellules, aucune différence significative n'a été mesurée.

Il semble dès lors que le Ritonavir ne soit ni le substrat, ni l'inhibiteur du transporteur propre à la Ciprofloxacine, Mrp4.

## DISCUSSION

Dans le cadre ce mémoire, nous avons étudié une éventuelle compétition pour un même transporteur entre deux classes de médicaments, les Fluoroquinolones et des antiviraux. Nous avons pour objectif de mieux caractériser le transporteur de la Ciprofloxacine au niveau pharmacologique et, éventuellement, de mettre en évidence un nouveau mécanisme d'interactions médicamenteuses de nature pharmacocinétique.

Ces expériences ont été réalisées sur des macrophages J774, des cellules phagocytaires impliquées dans la défense de l'organisme contre les agents infectieux. Cette lignée cellulaire est couramment utilisée au laboratoire pour étudier la pharmacocinétique des antibiotiques (Carlier *et al.*, 1990 ; Carlier *et al.*, 1994 ; Chanteux *et al.*, 2003 ; Michot *et al.*, 2004 ; Van Bambeke *et al.*, 2004).

Dans ce travail, nous avons utilisé en parallèle des macrophages sauvages et des macrophages résistants, obtenus suite à l'exposition chronique de cellules sauvages à la Ciprofloxacine (Michot *et al.*, 2006). Par rapport aux cellules sauvages qui expriment plusieurs transporteurs à un niveau basique, les cellules résistantes surexpriment spécifiquement la Mrp2 et la Mrp4. Par ailleurs, de récentes études non publiées suggèrent une abondance plus importante de la Mrp4 par rapport à la Mrp2 ainsi qu'une implication prépondérante de la Mrp4 dans l'efflux de la Ciprofloxacine (Marquez *et al.*, résultats soumis pour publication).

Conformément aux résultats obtenus précédemment au laboratoire (Michot *et al.*, 2004 ; Michot *et al.*, 2006), nous montrons ici que l'accumulation cellulaire de la Ciprofloxacine est fortement réduite et son efflux accéléré dans les cellules résistantes, par rapport aux cellules sauvages et que cette accumulation est augmentée en présence d'un inhibiteur des transporteurs d'anions, le Gemfibrozil.

Sur ces bases, notre travail a consisté à étudier, dans ces mêmes modèles, la pharmacocinétique cellulaire de deux classes d'antiviraux pour lesquelles la littérature suggère une interaction avec les MRPs et à examiner une compétition potentielle au niveau du transport avec la Ciprofloxacine.

Les expériences que nous avons réalisées ont permis de mettre en évidence plusieurs éléments importants et novateurs :

### **1. Les antiviraux comme inhibiteurs du transporteur de la Ciprofloxacine**

Notre travail a permis de mettre en évidence que deux des trois antiviraux étudiés peuvent accroître, à divers degrés, l'accumulation de Ciprofloxacine dans les macrophages J774 sauvages et résistants. En effet, nous observons que le PMEAs, administré sous la forme de sa prodrogue, et le Saquinavir augmentent l'accumulation de Ciprofloxacine dans les cellules sauvages et résistantes à un niveau légèrement inférieur ou comparable à celui obtenu en présence d'une concentration élevée en Gemfibrozil.

L'augmentation de l'accumulation de la Ciprofloxacine induite par ces antiviraux pourrait s'expliquer par deux mécanismes. D'une part, les antiviraux pourraient agir en augmentant l'accumulation proprement dite de la Ciprofloxacine, c'est-à-dire en influant l'entrée de cette Fluoroquinolone dans les cellules. D'autre part, ils pourraient diminuer l'efflux de la Ciprofloxacine par un mécanisme d'inhibition des pompes d'efflux.

La première hypothèse semble peu probable dans la mesure où aucun mécanisme spécifique à l'entrée de la Ciprofloxacine dans les macrophages n'a pu être mis en évidence ; il est en effet communément admis qu'elle entrerait dans ces cellules par diffusion passive (Tulkens, 1990 ; Rispal *et al.*, 1996 ; Van Bambeke *et al.*, 2006).

En revanche, la deuxième hypothèse est soutenue par nos résultats. En effet, nous avons démontré une certaine similitude entre l'effet des antiviraux et celui du Gemfibrozil : ces deux types de médicaments augmentent l'accumulation de la Ciprofloxacine de façon concentration-dépendante, en ralentissant son efflux.

Cet effet est obtenu pour des concentrations en Saquinavir inférieures à celles en Gemfibrozil et similaires dans les deux types cellulaires. Ceci nous permet donc suggérer qu'il s'agit d'un inhibiteur de l'efflux de la Ciprofloxacine plus puissant que l'inhibiteur de référence, le Gemfibrozil. Or, la littérature actuelle décrit le Saquinavir comme substrat préférentiel de MRP1 et MRP2 (Meaden *et al.*, 2002 ; Huisman *et al.*, 2002) ; nos données suggèrent donc qu'il pourrait également interagir avec le transporteur de la Ciprofloxacine, Mrp4.

Le PMEAs, quant à lui, n'a qu'un effet marginal sur l'accumulation de Ciprofloxacine et détectable uniquement dans les cellules sauvages. Par contre, en présence de concentrations élevées en Bis(POM)PMEAs, la prodrogue du PMEAs, un effet d'augmentation de l'accumulation et d'inhibition de l'efflux concentration-dépendant est bien observé. Par ailleurs, cet effet est du

même ordre de grandeur que celui obtenu en présence de Gemfibrozil. Dans la littérature, le PMEa est décrit comme substrat préférentiel de la MRP4 et la MRP5 (Reid *et al.*, 2003a). Ceci corrobore donc l'idée d'une réelle compétition entre la Ciprofloxacine et le PMEa pour un même transporteur, la MRP4. Le fait que l'augmentation de l'accumulation de la Ciprofloxacine est beaucoup plus marqué dans les cellules incubées en présence de la prodrogue par rapport à celles mises en présence du PMEa suggère en outre que l'effet d'inhibition du transport s'opère depuis l'intérieur de la cellule plutôt que depuis l'extérieur. En effet, nous avons montré que le PMEa lui-même ne s'accumulait pas dans les cellules. Cette observation est compatible avec les mécanismes de transport proposés pour les pompes à efflux précédemment décrits dans l'introduction. L'utilisation de Bis(POM)PMEa pour permettre l'entrée du PMEa dans la cellule ne nous permet par contre pas de savoir si c'est le PMEa lui-même, le Mono(POM)PMEa ou le Bis(POM)PMEa qui joue un rôle d'inhibiteur du transport de Ciprofloxacine.

Enfin, le Ritonavir ne semble pas affecter l'accumulation de Ciprofloxacine dans les macrophages J774 sauvages et résistants. Comme le Saquinavir, le Ritonavir est connu comme substrat préférentiel de la MRP1 et le MRP2 (Meaden *et al.*, 2002 ; Huisman *et al.*, 2002). Nos données semblent exclure, pour cette molécule en particulier, une interaction avec Mrp4.

## **2. Les antiviraux comme substrats des pompes MRPs**

Dans ce travail, il est apparu que les deux types d'antiviraux utilisés présentent un comportement très différent. En effet, contrairement au Saquinavir, le PMEa voit son accumulation cellulaire augmenter en présence de Gemfibrozil. Ceci laisse donc suggérer que seul le PMEa pourrait être substrat de pompes à anions organiques.

### **2.1. Le PMEa**

Grâce aux expériences réalisées, nous avons observé que l'accumulation du PMEa présente :

- Une forte diminution dans les macrophages résistants, par rapport à celle mesurée dans les macrophages sauvages;
- Une augmentation conséquente en présence de Gemfibrozil mais aussi en présence d'une concentration élevée en Ciprofloxacine et ce, dans les deux types cellulaires.

En outre, l'accumulation de toutes les espèces du PMEAs (formes estérifiées ou non) est constante et ce, quelle que soit la concentration extracellulaire en prodrogue. Ce comportement contraste dès lors avec celui de la Ciprofloxacine (Michot *et al.*, 2004).

Dans le cas du PMEAs, cette absence d'effet pourrait être liée au fait que la concentration extracellulaire maximale utilisée est inférieure à celle nécessaire pour augmenter l'accumulation de Ciprofloxacine dans les expériences de compétition.

En effet, la Ciprofloxacine montrait un accroissement de l'accumulation cellulaire en fonction de sa concentration extracellulaire qui avait été interprétée comme démontrant une capacité de cette Fluoroquinolone à inhiber son propre efflux.

Par ailleurs, le fait que le PMEAs s'accumule moins dans les macrophages résistants et voit son accumulation augmentée en présence de Ciprofloxacine dans ces mêmes cellules suggère fortement que ces deux médicaments sont substrats et inhibiteurs d'un transporteur commun, la Mrp4.

Nous montrons également que le Mono(POM)PMEAs s'accumule moins dans les cellules résistantes que les cellules sauvages. En outre, il voit son accumulation augmentée en présence de Gemfibrozil dans les deux types cellulaires, mais n'est pas influencé par la Ciprofloxacine. Ceci pourrait indiquer que le Mono(POM)PMEAs est substrat d'un autre transporteur inhibé par le Gemfibrozil et surexprimé dans les cellules résistantes, c'est-à-dire Mrp2.

## **2.2. Saquinavir et Ritonavir**

Bien que la littérature suggère que les inhibiteurs de Protéase sont substrats de MRP1 et MRP2 (Huisman *et al.*, 2002 ; Williams *et al.*, 2002), notre travail n'a pas permis de démontrer un tel transport. En effet, nous montrons que les accumulations de Saquinavir et Ritonavir sont:

- Elevées et constantes, sur la gamme de concentrations extracellulaires étudiée ;
- Non affectées par la présence de Gemfibrozil ou de Ciprofloxacine et ce, dans les deux types cellulaires ;
- Identiques dans les macrophages J774 sauvages et résistants.

### **2.2.1. Le Saquinavir, substrat ou inhibiteur ?**

A plusieurs égards, les résultats obtenus avec le Saquinavir contrastent avec ceux observés pour la Ciprofloxacine. D'une part, l'accumulation cellulaire du Saquinavir est importante et ce, quelle que soit sa concentration extracellulaire. D'autre part, elle n'est pas influencée par l'addition de Gemfibrozil dans les deux types cellulaires. Ceci pourrait suggérer que le

Saquinavir n'est pas sujet à un transport d'efflux actif dans ces cellules. Cependant, il est bien décrit dans la littérature que le Saquinavir est substrat de MRP1 et MRP2.

Une première hypothèse pour expliquer nos résultats serait de rapprocher le comportement du Saquinavir de celui de la Moxifloxacin, dans les macrophages J774 sauvages. Cette Fluoroquinolone montre en effet une accumulation élevée et rapide dans les macrophages sauvages indépendamment de sa concentration extracellulaire et ce, sans subir d'influence de la part des inhibiteurs de MRPs (Michot *et al.*, 2005). On pourrait penser que la Moxifloxacin n'interagit avec aucun transporteur d'efflux mais diffuse simplement à travers la membrane cellulaire, grâce à sa grande lipophilie. Cependant, ceci est incompatible avec le fait que la Moxifloxacin inhibe le transport de la Ciprofloxacine (Michot *et al.*, 2005). De plus, tout comme le Saquinavir, la Moxifloxacin s'accumule autant dans les macrophages résistants que dans les macrophages sauvages (Michot *et al.*, 2006). Il a donc été proposé que la Moxifloxacin puisse se comporter comme un inhibiteur des pompes agissant selon le modèle du « cycle futile », sans subir de quelconques perturbations au niveau de sa propre accumulation ou de son efflux.

Ce modèle fut proposé pour la P-glycoprotéine par Eytan *et al.*, 1996. Celui-ci a comparé la cinétique de pénétration de divers substrats à travers la bicouche lipidique, avec ou sans inhibiteur. Il est apparu que les molécules présentant un temps de demi-vie cellulaire suffisamment long ( $\geq 3$  minutes) sont transportées par la pompe. Par contre, celles dont le temps de demi-vie est nettement plus court vont pouvoir, en raison d'une grande diffusibilité, pénétrer de nouveau dans la cellule et ce, plus rapidement qu'elles ne sont effluées par la pompe. Un transport actif ne peut dès lors pas être mis en évidence alors que ces composés ont bel et bien la capacité d'occuper la pompe et, par conséquent, de ralentir l'efflux des autres substrats. Dans nos expériences, le Saquinavir semble effectivement s'accumuler rapidement puisque nous obtenons un maximum d'accumulation dès cinq minutes d'accumulation.

Une deuxième hypothèse peut être avancée. En effet, l'accumulation constante du Saquinavir quelle que soit la concentration extracellulaire associée au fait que cet antiviral augmente l'accumulation de Ciprofloxacine à de faibles concentrations laissent suggérer que le Saquinavir pourrait être un inhibiteur puissant. Si puissant qu'il agirait également sur son propre transport dans les cellules sauvages et résistantes et ce, dès la plus faible concentration testée. Cette hypothèse demande à être vérifiée en étudiant l'accumulation du Saquinavir dans des cellules exposées à de moindres concentrations.

Une troisième hypothèse repose sur le fait que nous utilisons ici un modèle de cellules murines. On ne peut pas exclure une différence dans la spécificité de substrat de MRP1 et MRP2 avec les cellules humaines où le transport de Saquinavir a été démontré.

### **2.2.2. *Le Ritonavir, ni substrat, ni inhibiteur ?***

Nos résultats ne montrent pas d'effet du Gemfibrozil sur l'accumulation du Ritonavir et pas de différence entre les deux types cellulaires étudiés. De plus, le Ritonavir n'influence pas l'accumulation de Ciprofloxacine.

On ne peut pas exclure une saturation de transporteur dès les faibles concentrations ou une différence de spécificité de substrat par rapport aux transporteurs humains comme suggéré précédemment pour le Saquinavir. Par contre, on peut exclure une interaction avec le transporteur de Ciprofloxacine dans les modèles étudiés.

## **3. Implications pharmacologiques et toxicologiques**

Dans un contexte plus large, notre travail suscite quelques réflexions dans le domaine de la pharmacologie et de la toxicologie.

### **3.1. Implications pharmacologiques**

Notre mémoire a permis de progresser dans la caractérisation phénotypique du transporteur de la Ciprofloxacine.

Tout d'abord, il a permis de mieux caractériser le transporteur de la Ciprofloxacine en termes de sélectivité de substrats. En effet, nous avons montré que, contrairement au Saquinavir, le PMEa est substrat du transporteur de la Ciprofloxacine. Ceci conforte l'hypothèse de la Mrp4 comme transporteur de Ciprofloxacine dans les macrophages J774 ; la démonstration n'en ayant pas encore été faite au moment où nous avons commencé ce travail. Par ailleurs, cela démontre également que le PMEa est également substrat de Mrp4 dans les cellules murines.

Par cette observation, notre travail a donc aussi contribué à illustrer le caractère « MDR » des pompes de type MRP tout en mettant en évidence que des molécules au sein d'une même classe pharmacologique peuvent avoir un comportement très différent.

Les travaux antérieurs du laboratoire avaient déjà mis en exergue la différence majeure du rôle des transporteurs d'efflux dans la pharmacocinétique cellulaire de la Ciprofloxacine et de la Moxifloxacine (Michot *et al.*, 2005). Nous montrons ici une différence tout aussi importante entre le PMEa, comme puissant inhibiteur et substrat du transporteur de la Ciprofloxacine, et le

Saquinavir, comme simple inhibiteur du transport de cette même Fluoroquinolone. A cet égard, nous suggérons pour la première fois une interaction possible entre Saquinavir et Mrp4 qui demande à être confirmée.

### **3.2. Implications toxicologiques**

Nos résultats expérimentaux indiquent une interaction de nature pharmacocinétique entre la Ciprofloxacine et ces antiviraux. Cette interaction conduit à une augmentation de concentration cellulaire de la Ciprofloxacine et potentiellement de l'antiviral. Cette observation pose la question des risques de toxicité liés à cette interaction.

In vivo, les transporteurs sont localisés à la surface des cellules, en ce comprises de nombreuses cellules polarisées qui jouent un rôle de barrière physiologique (Van Bambeke *et al.*, 2003b). Outre les changements de concentration cellulaires, une interaction médicamenteuse pourrait entraîner une modification de la distribution des médicaments dans l'organisme.

Nos travaux indiquent en effet que cette interaction est possible in vivo, dans la mesure où les concentrations sériques en antiviral sont du même ordre de grandeur que les concentrations nécessaires pour inhiber le transport de Ciprofloxacine dans notre modèle. Des études in vivo seraient donc utiles pour vérifier cette hypothèse.



## PERSPECTIVES

Afin de confirmer les résultats obtenus et de mieux caractériser la compétition entre la Ciprofloxacine et les antiviraux, nous pourrions envisager différentes expériences à réaliser à court ou long terme.

### 1. Etudes à court terme

#### 1.1. Accumulation du Saquinavir à de plus faibles concentrations

Les études d'accumulation du Saquinavir ont été réalisées, dans les macrophages J774 sauvages et résistants, pour des concentrations supérieures ou égales à 2  $\mu\text{M}$ . Selon les hypothèses avancées *supra*, il semblerait que le Saquinavir puisse inhiber son propre transport dans les deux types cellulaires et ce, dès les concentrations les plus faibles que nous avons testées. Des études d'accumulation du Saquinavir devraient donc être envisagées dans des cellules exposées à des concentrations moindres afin de vérifier si cette accumulation est, ou non, concentration-dépendante. Néanmoins, ceci demanderait la mise au point d'une technique d'analyse plus sensible.

#### 1.2. Etudes de la capture et de l'efflux du Saquinavir

Les études d'accumulation du Saquinavir ont été réalisées pour des temps d'incubations allant de cinq minutes à deux heures. Cette accumulation s'est avérée élevée et constante, dans les deux types cellulaires, quel que soit le temps d'incubation. Cette expérience pourrait donc être répétée sur de plus courtes périodes d'incubation afin de déterminer le temps nécessaire pour atteindre un plateau d'accumulation. Si la pénétration cellulaire du Saquinavir s'avérait très rapide, son élimination pourrait l'être tout autant ; c'est pourquoi, il serait intéressant de réaliser une expérience d'efflux. Nous pourrions de ce fait mieux caractériser la pharmacocinétique propre au Saquinavir et, dans le cas échéant, rapprocher son comportement de celui de la Moxifloxacine (voir discussion, 2.2.1.).

### **1.3. Compétition entre le Bis(POM)PMEA et le Saquinavir**

Notre travail a montré que le PMEA est à la fois substrat et inhibiteur du transporteur de la Ciprofloxacine, tandis que le Saquinavir est un puissant inhibiteur capable d'augmenter considérablement l'accumulation de cette Fluoroquinolone.

Une interaction du Saquinavir avec Mrp4 n'étant pas démontrée à ce jour. Nous pourrions dès lors confirmer cette hypothèse en examinant si le Saquinavir est capable d'augmenter l'accumulation et de réduire l'efflux du PMEA, comme il le fait pour la Ciprofloxacine. Ceci permettrait au moins de confirmer l'hypothèse d'une interaction de ces trois médicaments avec un même transporteur.

### **1.4. Etude de l'accumulation des antiviraux et de leur pouvoir inhibiteur sur le transport de Ciprofloxacine dans des cellules surexprimant spécifiquement Mrp2 ou Mrp4**

Les cellules sélectionnées par exposition chronique à la Ciprofloxacine surexpriment Mrp4 et dans une moindre mesure Mrp2. Les données actuelles désignent cependant MRP4 comme le transporteur responsable de l'efflux de la Ciprofloxacine. Il pourrait être utile de conforter nos résultats en utilisant des cellules surexprimant sélectivement un de ces transporteurs. Ceci pourrait être obtenu soit en transfectant sélectivement les cellules sauvages, soit en éteignant sélectivement l'expression d'un des transporteurs dans les cellules résistantes à l'aide de siRNA, par exemple.

## **2. Etudes à long terme**

### **2.1. Etudes pharmacocinétiques**

Puisque les antiviraux augmentent l'accumulation de Ciprofloxacine à divers degrés, il serait intéressant de déterminer les implications toxicologiques qui pourraient résulter de telles interactions dans des modèles in vivo.

Des interactions médicamenteuses au niveau d'un transporteur peuvent provoquer des changements de concentration du substrat, dans un tissu particulier, sans nécessairement en affecter la concentration plasmatique ou sanguine. Les interactions médicamenteuses au niveau d'un transporteur pourraient donc s'accompagner d'effets physiologiques ou toxiques dans un tissu ou, au contraire, ne pas affecter ces effets si les tissus cibles de l'accumulation ne sont pas les tissus concernés par l'activité ou la toxicité (Endres *et al.*, 2006). Il arrive même que certaines

interactions puissent délibérément produire un effet bénéfique. Ainsi, l'inhibition d'un transporteur du Cidofovir par le Probenécide, par exemple, peut mener à une diminution de la néphrotoxicité propre à cet agent antiviral (Cundy *et al.*, 1995).

Selon la localisation de la MRP4, l'inhibition de cette pompe à efflux par les antiviraux peut avoir des conséquences différentes sur la pharmacocinétique de la Ciprofloxacine. Etant située au niveau de la bordure en brosse du tubule proximal rénal, l'inhibition de la MRP4 par un antiviral pourrait se caractériser par une diminution de l'élimination de la Ciprofloxacine dans les urines. Ceci pourrait dès lors réduire son activité vis-à-vis d'infections urinaires. La MRP4 peut également être retrouvée dans la membrane basolatérale des plexus choroïdes ainsi qu'au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux où elle assurerait un rôle protecteur. Si cette MRP4 était inhibée, le cerveau et le liquide céphalo-rachidien pourraient donc être mis au contact de concentrations plus élevées en Ciprofloxacine, ce qui pourrait favoriser la survenue d'effets secondaires centraux tels que des crises d'épilepsie.

Des études sur des modèles *in vivo* pourraient donc être envisagées afin de déterminer les concentrations en Ciprofloxacine en présence ou non de ces antiviraux inhibiteurs dans des milieux biologiques tels que le liquide céphalo-rachidien ou encore les urines.

Ce même type d'études pourrait être réalisé afin de démontrer un quelconque effet de la Ciprofloxacine sur la pharmacocinétique du PMEAs. Dès lors, on pourrait également déterminer les concentrations en PMEAs en présence ou non de Ciprofloxacine et ce, dans divers milieux biologiques, notamment les urines.

## **2.2. Etudes pharmacologiques**

Nous pourrions également étudier les conséquences des modifications des concentrations cellulaires des médicaments sur leur activité.

La Ciprofloxacine est un antibiotique efficace contre les bactéries intracellulaires, notamment le *Staphylococcus aureus* et le *Listeria monocytogenes* (Seral *et al.*, 2003b ; Seral *et al.*, 2005 ; Michot *et al.*, 2006). L'augmentation de la concentration cellulaire en Ciprofloxacine en cas de coadministration avec du PMEAs ou du Saquinavir pourrait donc avoir un effet sur son activité intracellulaire. Nous pourrions envisager d'étudier l'influence des antiviraux sur l'activité intracellulaire de la Ciprofloxacine dans les macrophages J774 infectés par le *Staphylococcus aureus* ou le *Listeria monocytogenes*, en suivant les modèles développés au laboratoire pour démontrer l'effet du Gemfibrozil ou du Probenécide sur l'activité intracellulaire de la Ciprofloxacine (Seral *et al.*, 2003a ; Michot *et al.*, 2006).

Le PME A est un agent antiviral présentant une activité large spectre. Il est reconnu comme étant un puissant inhibiteur de la réplication de rétrovirus, de virus Herpès et de Hépadnavirus. L'augmentation de la concentration cellulaire en PME A lors de son administration simultanée à de la Ciprofloxacine pourrait donc avoir un effet sur son activité antivirale. Nous pourrions dès lors étudier l'influence de la Ciprofloxacine sur l'activité intracellulaire du PME A en infectant des fibroblastes par le CytoMegalovirus, un Herpèsvirus, de la même manière que l'ont fait Cinatl, Jr. *et al.*, 2000 ou encore in vivo, en utilisant un modèle de souris SCID chez qui du tissu de rétine humaine fœtale pourrait être implanté dans la chambre antérieure de l'œil, puis être inoculé du CytoMegalovirus humain, en suivant le protocole décrit par Bidanset *et al.*, 2001.

# ANNEXES

## 1. Dosage des protéines

### 1.1. Réactif de Biuret

Mélanger dans l'ordre,

- 100 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2% : dissoudre 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhydre dans un litre ;
- 1 ml de tartrate sodico-potassique à 2% : dissoudre 6,712 g dans 250 ml d'eau bidistillée ;
- 1 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à 1% : dissoudre 2,5 g de  $\text{Cu}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans 250 ml d'eau bidistillée.

Ce mélange doit être préparé extemporanément.

### 1.2. Réactif de Folin-Ciocalteu

Solution commerciale 2 N (Merck) à diluer 2 fois avant l'emploi.

### 1.3. Solution de NaOH 1N

Utiliser une ampoule Titrisol Merck.

### 1.4. Etalon : Solution d'Albumine Bovine à 100 $\mu\text{g/ml}$

Sécher l'albumine bovine au dessiccateur ;

Dissoudre 1 g d'albumine bovine dans 100 ml d'eau et conserver au congélateur ;

Diluer 100 fois pour obtenir un étalon à 100  $\mu\text{g/ml}$  ;

Répartir dans des tubes et conserver au congélateur.

## 2. Dosage de la Lactate Déhydrogénase

### 2.1. Tampon Tris 81,3 mM/NaCl 203,3 mM

Dissoudre 9,84 g de Tris et 5,95 g de NaCl dans 800 ml d'eau ;

Ajuster à pH 7,2 avec de l'HCl ;

Porter à 1000 ml avec de l'eau ;

Cette solution est stable à 4°C.

## **2.2. NADH 0,244 mM**

Dissoudre 85 mg de NADH dans 500 ml de tampon Tris /NaCl ;

Solution stable à -20°C pendant un mois, entourée d'un papier aluminium.

## **2.3. Pyruvate 9,76 mM**

Dissoudre 107 mg de pyruvate dans 100 ml de tampon Tris ;

Solution stable à -20°C pendant deux mois, au maximum.

## **3. Préparation du tampon PBS 10x, à pH 7,4**

Dissoudre dans 1,8 litres :

NaCl	160,3 g
KCl	4,003 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	28,406 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,006 g

Ajuster à pH 7,4 et porter à 2 litres ;

Un litre sera conservé à 4°C, l'autre à température ambiante.

## **4. Préparation du milieu HBSS 5x**

Pour 1 litre, peser :

KCl	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,300 g
NaCl	40,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,302 g
Glucose	5,0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,925 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,0 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,75 g

Ajuster à pH 7,4 et diluer 5 fois ;

Ajouter 2,38 g de HEPES pour 1 litre de HBSS 1x ;

A conserver à 4°C, à l'abri de la lumière.

## BIBLIOGRAPHIE

- Annaert P, Gosselin G, Pompon A, Benzaria S, Valette G, Imbach J L, Naesens L, Hatse S, De Clercq E, Van den M G, Kinget R and Augustijns P (1998) Comparison of the disposition of ester prodrugs of the antiviral agent 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine [PMEA] in Caco-2 monolayers. *Pharm Res* **15**: 239-245.
- Annaert P, Kinget R, Naesens L, De Clercq E and Augustijns P (1997) Transport, uptake, and metabolism of the bis(pivaloyloxymethyl)-ester prodrug of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine in an in vitro cell culture system of the intestinal mucosa (Caco-2). *Pharm Res* **14**: 492-496.
- Bakos E, Evers R, Calenda G, Tusnady G E, Szakacs G, Varadi A and Sarkadi B (2000) Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci* **113 Pt 24**: 4451-4461.
- Balzarini J, Hao Z, Herdewijn P, Johns D G and De Clercq E (1991) Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1499-1503.
- Barry M, Gibbons S, Back D and Mulcahy F (1997) Protease inhibitors in patients with HIV disease. Clinically important pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* **32**: 194-209.
- Bartholome K, Rius M, Letschert K, Keller D, Timmer J and Keppler D (2007) Data-based mathematical modeling of vectorial transport across double-transfected polarized cells. *Drug Metab Dispos* **35**: 1476-1481.
- Bensikaddour H, Fa N, Burton I, Deleu M, Lins L, Schanck A, Brasseur R, Dufrene Y F, Goormaghtigh E and Mingeot-Leclercq M P (2008) Characterization of the interactions between fluoroquinolone antibiotics and lipids: a multitechnique approach. *Biophys J* **94**: 3035-3046.
- Bidanset DJ, Rybak R J, Hartline C B and Kern E R (2001) Replication of human cytomegalovirus in severe combined immunodeficient mice implanted with human retinal tissue. *J Infect Dis* **184**: 192-195.
- Bolhuis H, van Veen H W, Poolman B, Driessen A J and Konings W N (1997) Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 55-84.
- Borst P, de Wolf C and van de W K (2007) Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch* **453**: 661-673.
- Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**: 1295-1302.
- Borst P, Zelcer N and van de W K (2006a) MRP2 and 3 in health and disease. *Cancer Lett* **234**: 51-61.

- Borst P, Zelcer N, van de W K and Poolman B (2006b) On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins. *FEBS Lett* **580**: 1085-1093.
- Carlier MB, Garcia-Luque I, Montenez J P, Tulkens P M and Piret J (1994) Accumulation, release and subcellular localization of azithromycin in phagocytic and non-phagocytic cells in culture. *Int J Tissue React* **16**: 211-220.
- Carlier MB, Scorneaux B, Zenebergh A, Desnottes J F and Tulkens P M (1990) Cellular uptake, localization and activity of fluoroquinolones in uninfected and infected macrophages. *J Antimicrob Chemother* **26 Suppl B**: 27-39.
- Carryn S, Chanteux H, Seral C, Mingeot-Leclercq M P, Van Bambeke F and Tulkens P M (2003) Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infect Dis Clin North Am* **17**: 615-634.
- Cascorbi I (2006) Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* **112**: 457-473.
- Chan LM, Lowes S and Hirst B H (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* **21**: 25-51.
- Chanteux H, Mingeot-Leclercq M P, Sonveaux E, Van Bambeke F and Tulkens P M (2003) Intracellular accumulation and activity of ampicillin used as free drug and as its phthalimidomethyl or pivaloyloxymethyl ester (pivampicillin) against *Listeria monocytogenes* in J774 macrophages. *J Antimicrob Chemother* **52**: 610-615.
- Chapman JS and Georgopapadakou N H (1989) Fluorometric assay for fleroxacin uptake by bacterial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 27-29.
- Cihlar T and Chen M S (1997) Incorporation of selected nucleoside phosphonates and anti-human immunodeficiency virus nucleotide analogues into DNA by human DNA polymerases alpha, beta and gamma. *Antivir Chem Chemother* **8**: 187-195.
- Cinatl J, Jr., Kotchetkov R, Weimer E, Blaheta R A, Scholz M, Vogel J U, Gumbel H O and Doerr H W (2000) The antisense oligonucleotide ISIS 2922 prevents cytomegalovirus-induced upregulation of IL-8 and ICAM-1 in cultured human fibroblasts. *J Med Virol* **60**: 313-323.
- Collier AC (1996) Efficacy of combination antiretroviral therapy. *Adv Exp Med Biol* **394**: 355-372.
- Cundy KC, Fishback J A, Shaw J P, Lee M L, Soike K F, Visor G C and Lee W A (1994) Oral bioavailability of the antiretroviral agent 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) from three formulations of the prodrug bis(pivaloyloxymethyl)-PMEA in fasted male cynomolgus monkeys. *Pharm Res* **11**: 839-843.
- Cundy KC, Petty B G, Flaherty J, Fisher P E, Polis M A, Wachsman M, Lietman P S, Lalezari J P, Hitchcock M J and Jaffe H S (1995) Clinical pharmacokinetics of cidofovir in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1247-1252.
- Dallas S, Miller D S and Bendayan R (2006) Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev* **58**: 140-161.



- Dean M, Hamon Y and Chimini G (2001a) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**: 1007-1017.
- Dean M, Rzhetsky A and Allikmets R (2001b) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**: 1156-1166.
- Deeley RG and Cole S P (2006) Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett* **580**: 1103-1111.
- Deeley RG, Westlake C and Cole S P (2006) Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* **86**: 849-899.
- Endres CJ, Hsiao P, Chung F S and Unadkat J D (2006) The role of transporters in drug interactions. *Eur J Pharm Sci* **27**: 501-517.
- Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga P R, Lankelma J and Borst P (2000) Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer* **83**: 375-383.
- Eytan GD, Regev R, Oren G and Assaraf Y G (1996) The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation. *J Biol Chem* **271**: 12897-12902.
- Ford J, Khoo S H and Back D J (2004) The intracellular pharmacology of antiretroviral protease inhibitors. *J Antimicrob Chemother* **54**: 982-990.
- Hatse S, Schols D, De Clercq E and Balzarini J (1999) 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine induces tumor cell differentiation or cell death by blocking cell cycle progression through the S phase. *Cell Growth Differ* **10**: 435-446.
- Ho ES, Lin D C, Mendel D B and Cihlar T (2000) Cytotoxicity of antiviral nucleotides adefovir and cidofovir is induced by the expression of human renal organic anion transporter 1. *J Am Soc Nephrol* **11**: 383-393.
- Ho RH and Kim R B (2005) Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* **78**: 260-277.
- Hooper DC (1993) Quinolone mode of action--new aspects. *Drugs* **45 Suppl 3**: 8-14.
- Hooper DC (2000) Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* **31 Suppl 2**: S24-S28.
- Huisman MT, Smit J W, Crommentuyn K M, Zelcer N, Wiltshire H R, Beijnen J H and Schinkel A H (2002) Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS* **16**: 2295-2301.
- Kahn J, Lagakos S, Wulfsohn M, Cherng D, Miller M, Cherrington J, Hardy D, Beall G, Cooper R, Murphy R, Basgoz N, Ng E, Deeks S, Winslow D, Toole J J and Coakley D (1999) Efficacy and safety of adefovir dipivoxil with antiretroviral therapy: a randomized controlled trial. *JAMA* **282**: 2305-2312.

- Kim RB, Fromm M F, Wandel C, Leake B, Wood A J, Roden D M and Wilkinson G R (1998) The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest* **101**: 289-294.
- Kramata P, Votruba I, Otova B and Holy A (1996) Different inhibitory potencies of acyclic phosphonomethoxyalkyl nucleotide analogs toward DNA polymerases alpha, delta and epsilon. *Mol Pharmacol* **49**: 1005-1011.
- Kruh GD, Belinsky M G, Gallo J M and Lee K (2007) Physiological and pharmacological functions of Mrp2, Mrp3 and Mrp4 as determined from recent studies on gene-disrupted mice. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 5-14.
- Lage H (2003) ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 188-199.
- Lee K, Klein-Szanto A J and Kruh G D (2000) Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *J Natl Cancer Inst* **92**: 1934-1940.
- Linton KJ (2007) Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* **22**: 122-130.
- Martinez-Martinez L, Garcia I, Ballesta S, Benedi V J, Hernandez-Alles S and Pascual A (1998) Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1850-1852.
- Meaden ER, Hoggard P G, Newton P, Tjia J F, Aldam D, Cornforth D, Lloyd J, Williams I, Back D J and Khoo S H (2002) P-glycoprotein and MRP1 expression and reduced ritonavir and saquinavir accumulation in HIV-infected individuals. *J Antimicrob Chemother* **50**: 583-588.
- Mesaros N, Van Bambeke F, Glupczynski Y, Vanhoof R and Tulkens P M (2005) L'efflux actif des antibiotiques et la résistance bactérienne: état de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Louvain Médical* **124**: 308-320.
- Michot JM, Heremans M F, Caceres N E, Mingeot-Leclercq M P, Tulkens P M and Van Bambeke F (2006) Cellular accumulation and activity of quinolones in ciprofloxacin-resistant J774 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1689-1695.
- Michot JM, Seral C, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M P and Tulkens P M (2005) Influence of efflux transporters on the accumulation and efflux of four quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, garenoxacin, and moxifloxacin) in J774 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2429-2437.
- Michot JM, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M P and Tulkens P M (2004) Active efflux of ciprofloxacin from J774 macrophages through an MRP-like transporter. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2673-2682.
- Miller DS (2001) Nucleoside phosphonate interactions with multiple organic anion transporters in renal proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* **299**: 567-574.

- Mortimer PG and Piddock L J (1991) A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolones by Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **28**: 639-653.
- Naesens L, Snoeck R, Andrei G, Balzarini J, Neyts J and De Clercq E (1997) HPMPC (cidofovir), PMEAs (adefovir) and related acyclic nucleoside phosphonate analogues: a review of their pharmacology and clinical potential in the treatment of viral infections. *Antivir Chem Chemother* **8**: 1-23.
- Naesens L, Balzarini J, Bischofberger N and De Clercq E (1996) Antiretroviral activity and pharmacokinetics in mice of oral bis(pivaloyloxymethyl)-9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, the bis(pivaloyloxymethyl) ester prodrug of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 22-28.
- Nies AT and Keppler D (2007) The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* **453**: 643-659.
- Palu G, Stefanelli S, Rassu M, Parolin C, Balzarini J and De Clercq E (1991) Cellular uptake of phosphonylmethoxyalkylpurine derivatives. *Antiviral Res* **16**: 115-119.
- Piddock LJ (1999) Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs* **58 Suppl 2**: 11-18.
- Pisarev VM, Lee S H, Connelly M C and Fridland A (1997) Intracellular metabolism and action of acyclic nucleoside phosphonates on DNA replication. *Mol Pharmacol* **52**: 63-68.
- Qaqish RB, Mattes K A and Ritchie D J (2003) Adefovir dipivoxil: a new antiviral agent for the treatment of hepatitis B virus infection. *Clin Ther* **25**: 3084-3099.
- Reid G, Wielinga P, Zelcer N, de Haas M, van Deemter L, Wijnholds J, Balzarini J and Borst P (2003a) Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol* **63**: 1094-1103.
- Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van d H, I, Kuil A, de Haas M, Wijnholds J and Borst P (2003b) The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9244-9249.
- Risipal P, Grellet J, Celerier C, Breilh D, Dorian M, Pellegrin J L, Saux M C and Leng B (1996) Comparative uptake of sparfloxacin and ciprofloxacin into human THP 1 monocytic cells. *Arzneimittelforschung* **46**: 316-319.
- Robbins BL, Greenhaw J, Connelly M C and Fridland A (1995) Metabolic pathways for activation of the antiviral agent 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine in human lymphoid cells. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2304-2308.
- Rudin DE, Gao P X, Cao C X, Neu H C and Silverstein S C (1992) Gemfibrozil enhances the listeriocidal effects of fluoroquinolone antibiotics in J774 macrophages. *J Exp Med* **176**: 1439-1447.
- Saier MH, Jr. (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 354-411.

- Saurin W, Hofnung M and Dassa E (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* **48**: 22-41.
- Scheffer GL, Kool M, Heijn M, de Haas M, Pijnenborg A C, Wijnholds J, van Helvoort A, de Jong M C, Hooijberg J H, Mol C A, van der L M, de Vree J M, van d, V, Elferink R P, Borst P and Scheper R J (2000) Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. *Cancer Res* **60**: 5269-5277.
- Schinkel AH and Jonker J W (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* **55**: 3-29.
- Schuetz JD, Connelly M C, Sun D, Paibir S G, Flynn P M, Srinivas R V, Kumar A and Fridland A (1999) MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med* **5**: 1048-1051.
- Seral C, Barcia-Macay M, Mingeot-Leclercq M P, Tulkens P M and Van Bambeke F (2005) Comparative activity of quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin and garenoxacin) against extracellular and intracellular infection by *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in J774 macrophages. *J Antimicrob Chemother* **55**: 511-517.
- Seral C, Carryn S, Tulkens P M and Van Bambeke F (2003a) Influence of P-glycoprotein and MRP efflux pump inhibitors on the intracellular activity of azithromycin and ciprofloxacin in macrophages infected by *Listeria monocytogenes* or *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **51**: 1167-1173.
- Seral C, Michot J M, Chanteux H, Mingeot-Leclercq M P, Tulkens P M and Van Bambeke F (2003b) Influence of P-glycoprotein inhibitors on accumulation of macrolides in J774 murine macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1047-1051.
- Snyderman R, Pike M C, Fischer D G and Koren H S (1977) Biologic and biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774.1. *J Immunol* **119**: 2060-2066.
- Sparidans RW, Veldkamp A, Hoetelmans R M and Beijnen J H (1999) Improved and simplified liquid chromatographic assay for adefovir, a novel antiviral drug, in human plasma using derivatization with chloroacetaldehyde. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **736**: 115-121.
- Srinivas RV, Robbins B L, Connelly M C, Gong Y F, Bischofberger N and Fridland A (1993) Metabolism and in vitro antiretroviral activities of bis(pivaloyloxymethyl) prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 2247-2250.
- Steinberg TH, Newman A S, Swanson J A and Silverstein S C (1987) Macrophages possess probenecid-inhibitable organic anion transporters that remove fluorescent dyes from the cytoplasmic matrix. *J Cell Biol* **105**: 2695-2702.
- Suzuki H and Sugiyama Y (2002) Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev* **54**: 1311-1331.

- Takenaka K, Morgan J A, Scheffer G L, Adachi M, Stewart C F, Sun D, Leggas M, Ejendal K F, Hrycyna C A and Schuetz J D (2007) Substrate overlap between Mrp4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. *Cancer Res* **67**: 6965-6972.
- Tulkens PM (1990) Intracellular pharmacokinetics and localization of antibiotics as predictors of their efficacy against intraphagocytic infections. *Scand J Infect Dis Suppl* **74**: 209-217.
- Ucpinar SD and Stavchansky S (2003) Quantitative determination of saquinavir from Caco-2 cell monolayers by HPLC-UV. High performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* **17**: 21-25.
- Van Bambeke F, Balzi E and Tulkens P M (2000) Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* **60**: 457-470.
- Van Bambeke F, Barcia-Macay M, Lemaire S and Tulkens P M (2006) Cellular pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics: current views and perspectives. *Curr Opin Drug Discov Devel* **9**: 218-230.
- Van Bambeke F, Carryn S, Seral C, Chanteux H, Tyteca D, Mingeot-Leclercq M P and Tulkens P M (2004) Cellular pharmacokinetics and pharmacodynamics of the glycopeptide antibiotic oritavancin (LY333328) in a model of J774 mouse macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2853-2860.
- Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plesiat P, Pechere J C and Tulkens P M (2003a) Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* **51**: 1055-1065.
- Van Bambeke F, Michot J M and Tulkens P M (2003b) Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. *J Antimicrob Chemother* **51**: 1067-1077.
- Van Wert L, Srimaroeng C and Sweet D (2008) Organic Anion Transporter 3 (Oat3/*Slc22a8*) Interacts with Carboxyfluoroquinolones and Deletion Increases Systemic Exposure to Ciprofloxacin. *Molecular Pharmacology*.
- Varma MV, Ashokraj Y, Dey C S and Panchagnula R (2003) P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res* **48**: 347-359.
- Wang M, Sahm D F, Jacoby G A, Zhang Y and Hooper D C (2004) Activities of newer quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1400-1401.
- Westlake CJ, Cole S P and Deeley R G (2005) Role of the NH<sub>2</sub>-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. *Mol Biol Cell* **16**: 2483-2492.
- Wijnholds J, Mol C A, van Deemter L, de Haas M, Scheffer G L, Baas F, Beijnen J H, Scheper R J, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J and Borst P (2000) Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7476-7481.

- Williams GC, Liu A, Knipp G and Sinko P J (2002) Direct evidence that saquinavir is transported by multidrug resistance-associated protein (MRP1) and canalicular multispecific organic anion transporter (MRP2). *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3456-3462.
- Zelcer N, Reid G, Wielinga P, Kuil A, van d H, I, Schuetz J D and Borst P (2003) Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem J* **371**: 361-367.
- Zidek Z, Potmesil P and Holy A (2003) Cytostatic activity of antiviral acyclic nucleoside phosphonates in rodent lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **192**: 246-253.