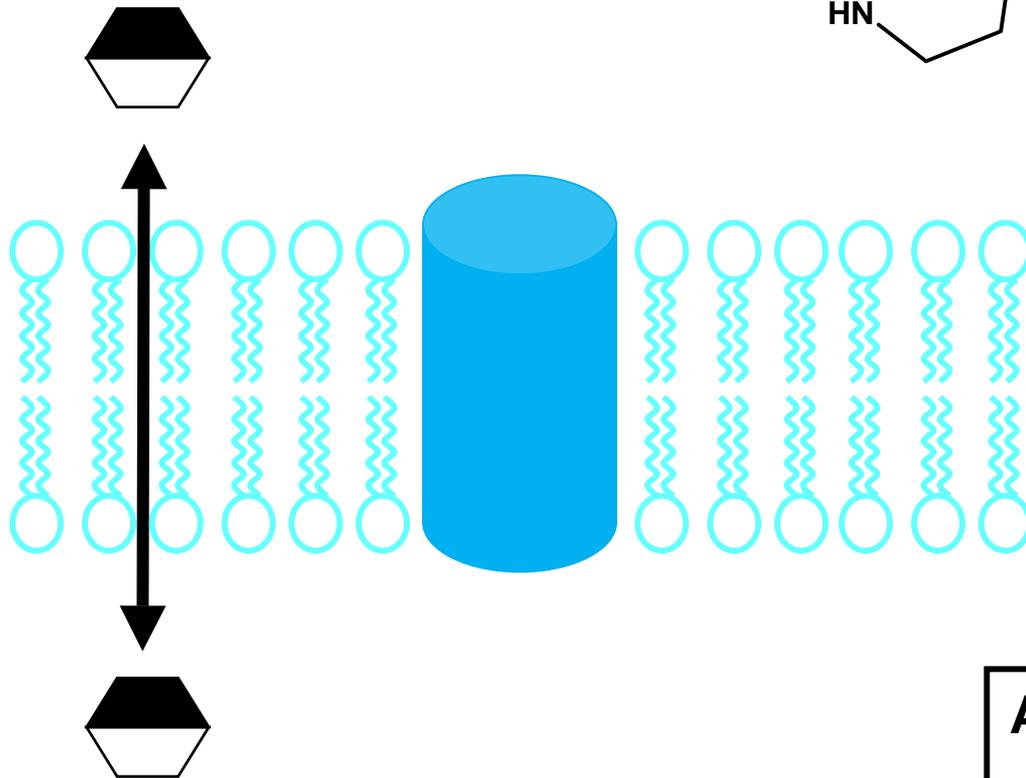
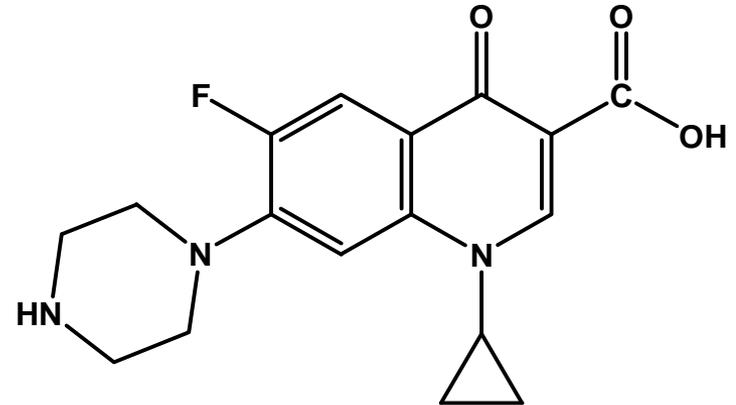


**L'efflux actif comme mécanisme
potentiel d'interactions
médicamenteuses:**

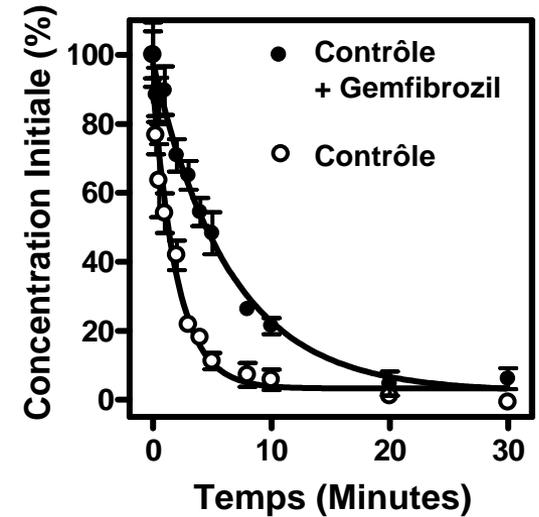
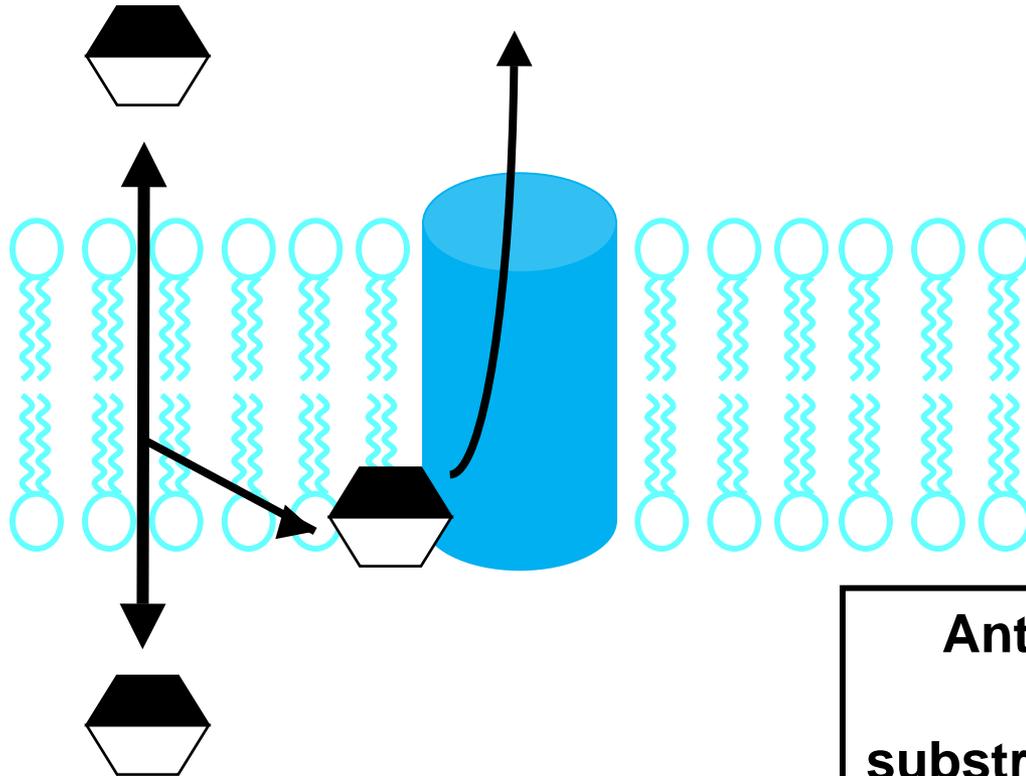
**Compétition entre Fluoroquinolones et
Antiviraux dans un modèle de
macrophages J774**

La Ciprofloxacin, une Fluoroquinolone



**Antibiotique amphiphile
et diffusible**

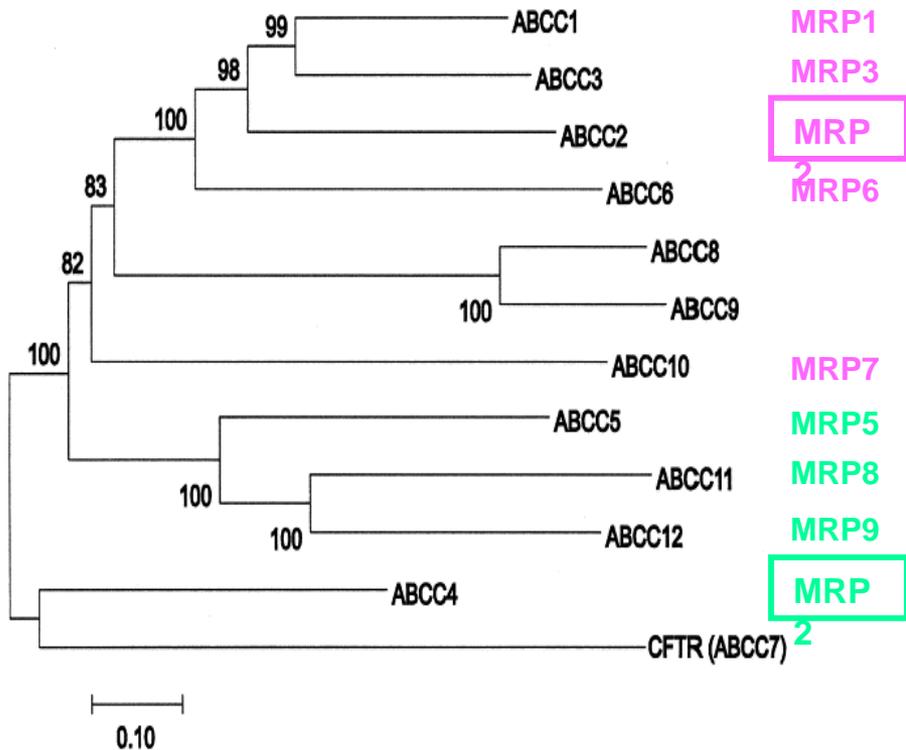
La Ciprofloxacin, une Fluoroquinolone substrat d'une pompe à efflux



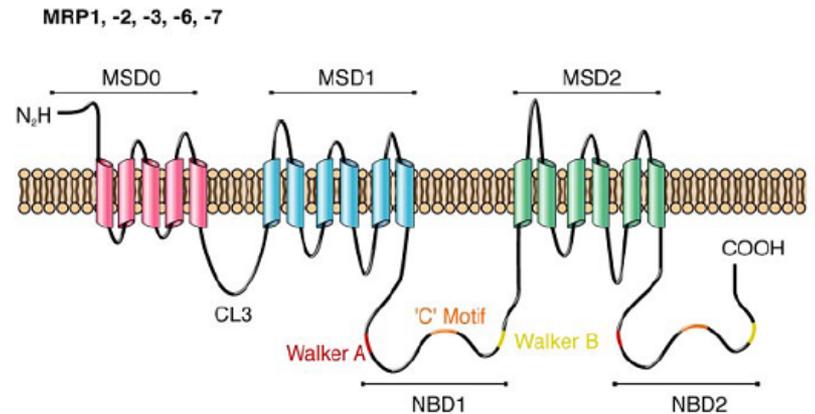
**Antibiotique amphiphile
et diffusible,
substrat d'une pompe à efflux**

Les transporteurs MRPs (Multidrug Resistance Proteins)

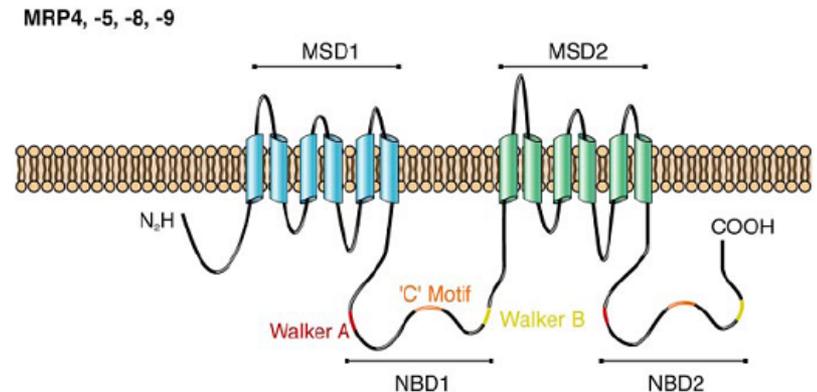
× Phylogénie et structure



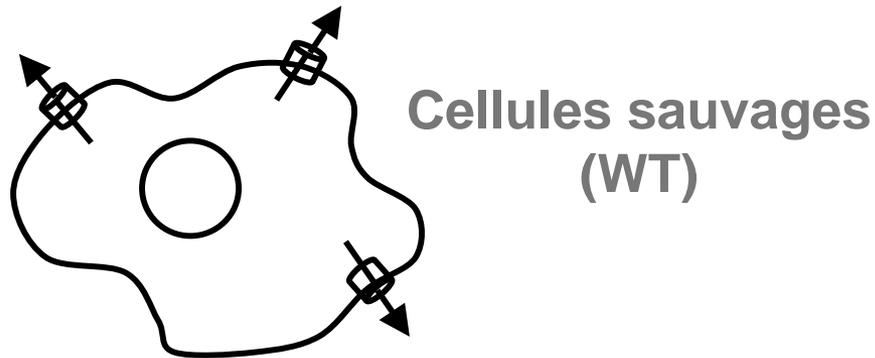
MRPs longues



MRPs courtes

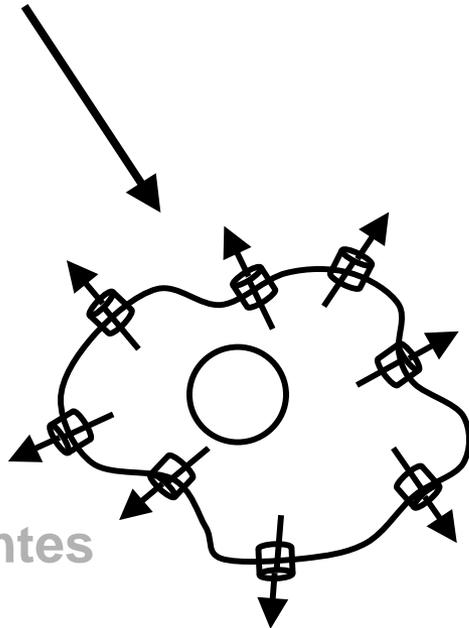


Identification du transporteur de la Ciprofloxacine

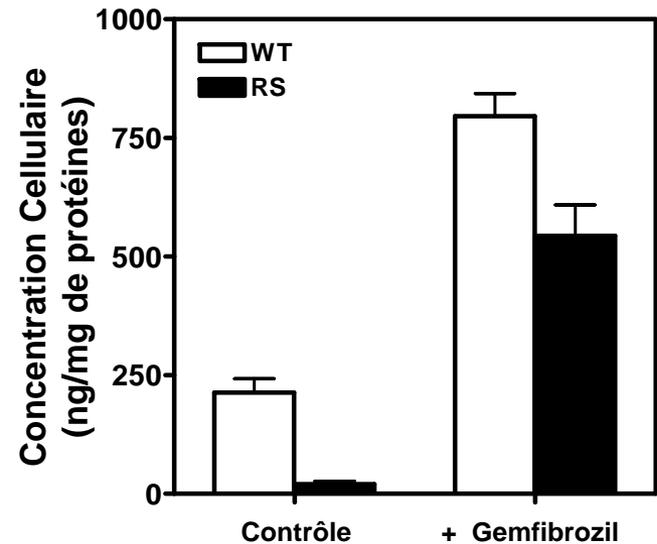


Cellules sauvages (WT)

Exposition chronique à la Ciprofloxacine

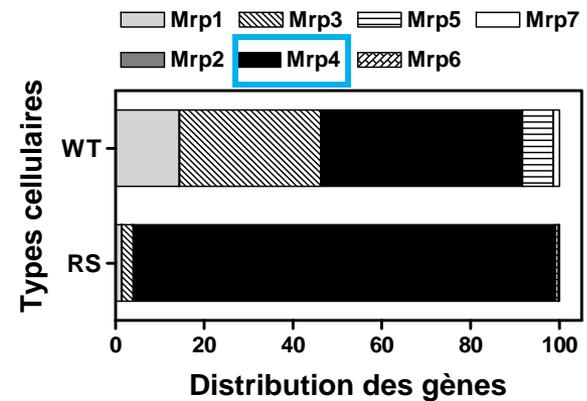
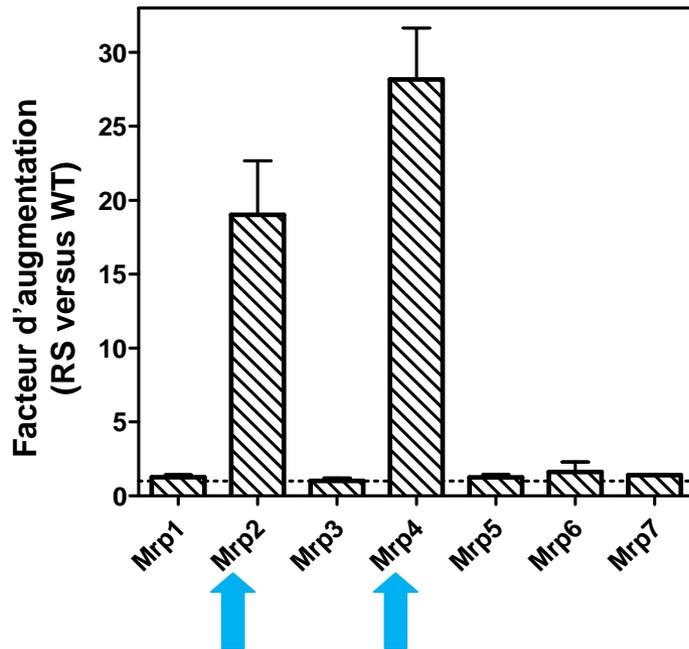


Cellules résistantes (RS)



Identification du transporteur de la Ciprofloxacine

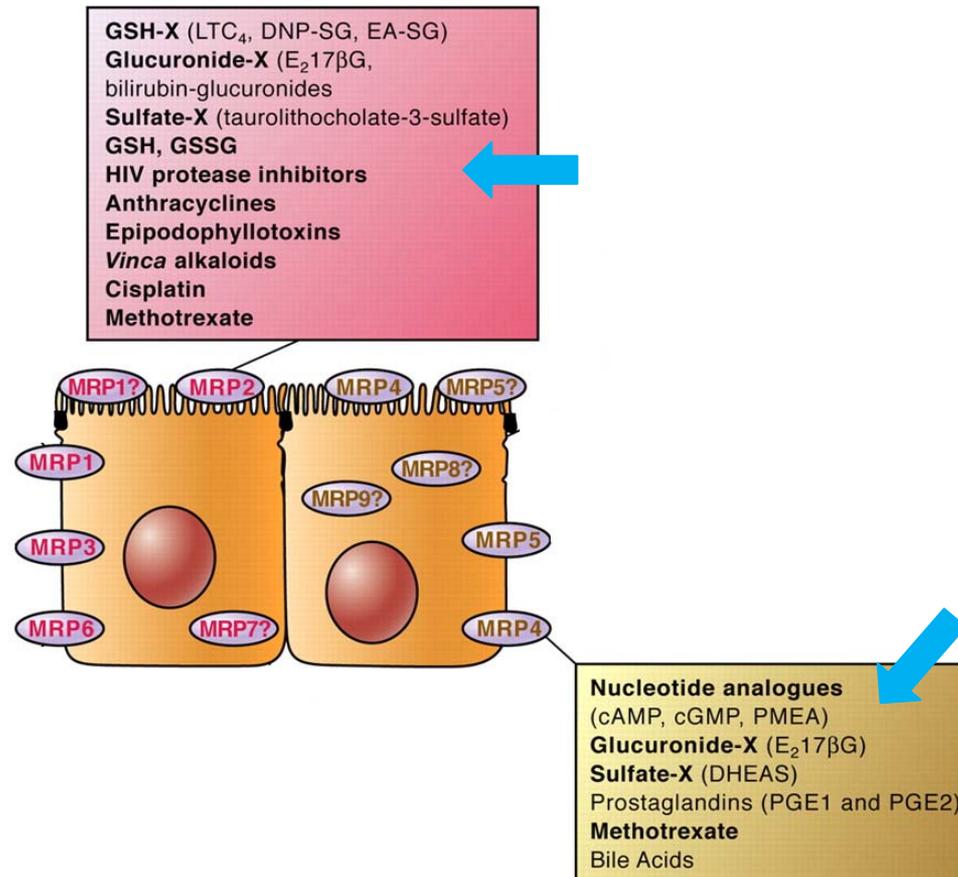
x ARNm des Mrps (RS versus WT)



Les cellules résistantes surexpriment Mrp2 et Mrp4, mais Mrp4 prédomine

Les transporteurs MRPs (Multidrug Resistance Proteins)

× Multiplicité de substrats: Compétition pour le transport?

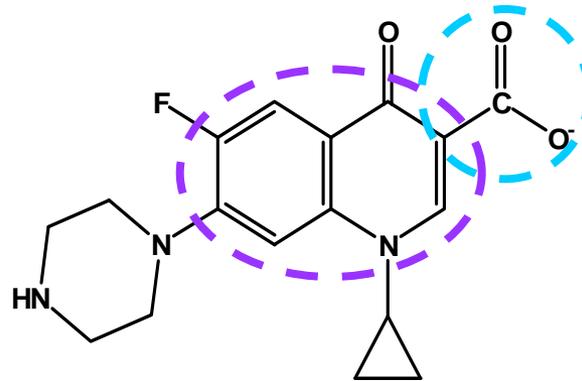


But du travail

- × Etude de la compétition potentielle entre
 - La Ciprofloxacine
 - Différents substrats préférentiels de MRP2 ou de MRP4

- × Afin de :
 - Mieux caractériser le transporteur de Ciprofloxacine;
 - Mettre en évidence des « interactions médicamenteuses » potentielles par compétition pour un même transporteur.

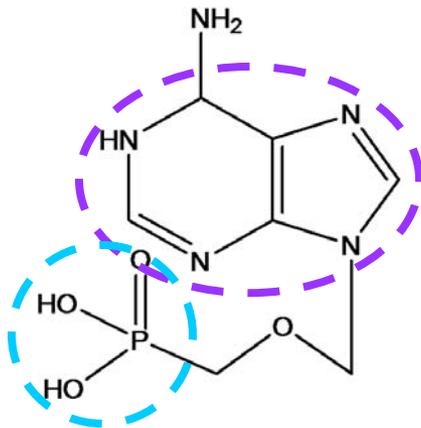
Ciprofloxacin



PMEA et MRP4

PMEA [Adéfovir]

9-(2-PhosphonylMethoxyEthyl)Adenine

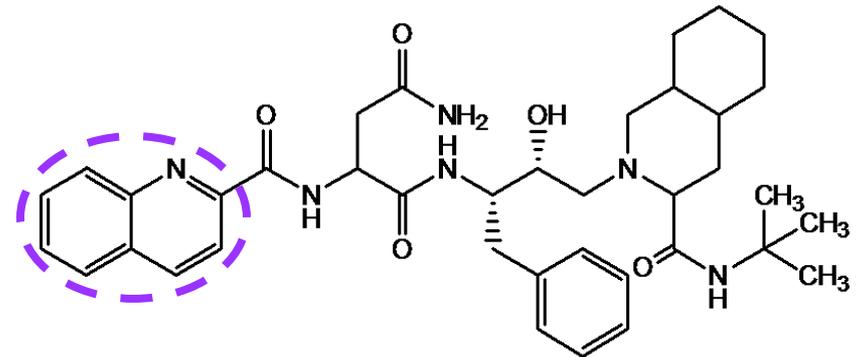


Reid et al.; *Mol Pharmacol.* 2003 63:1094-103

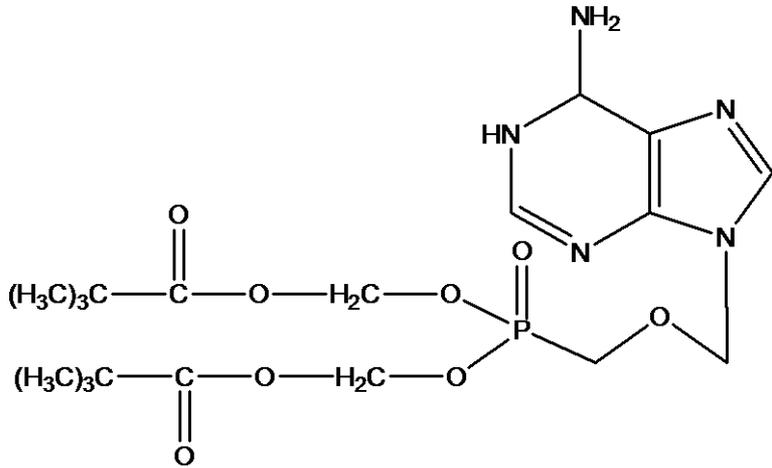
Imaoka et al. *Mol Pharmacol.* 2007 71:619-27.

Saquinavir et MRP2

Saquinavir

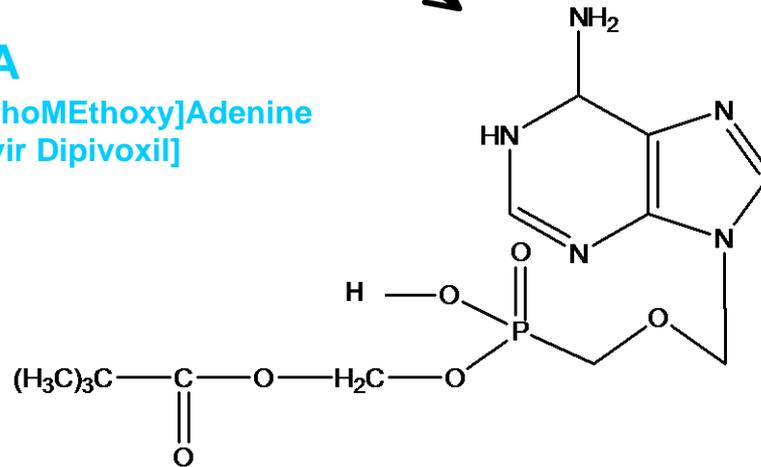
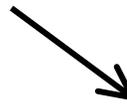


Hydrolyse du Bis(POM)PMEA

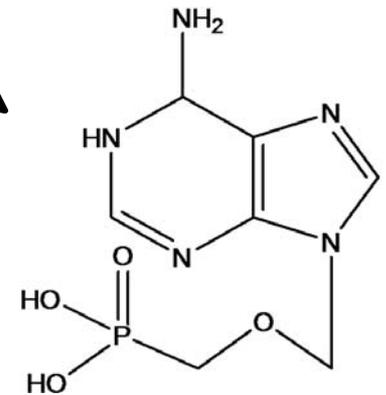


Bis(POM)PMEA

9-[2-(BisPivaloyloxyMethyl)PhosphoMEthoxy]Adenine
[Bis(POM)PMEA ou Adefovir Dipivoxil]

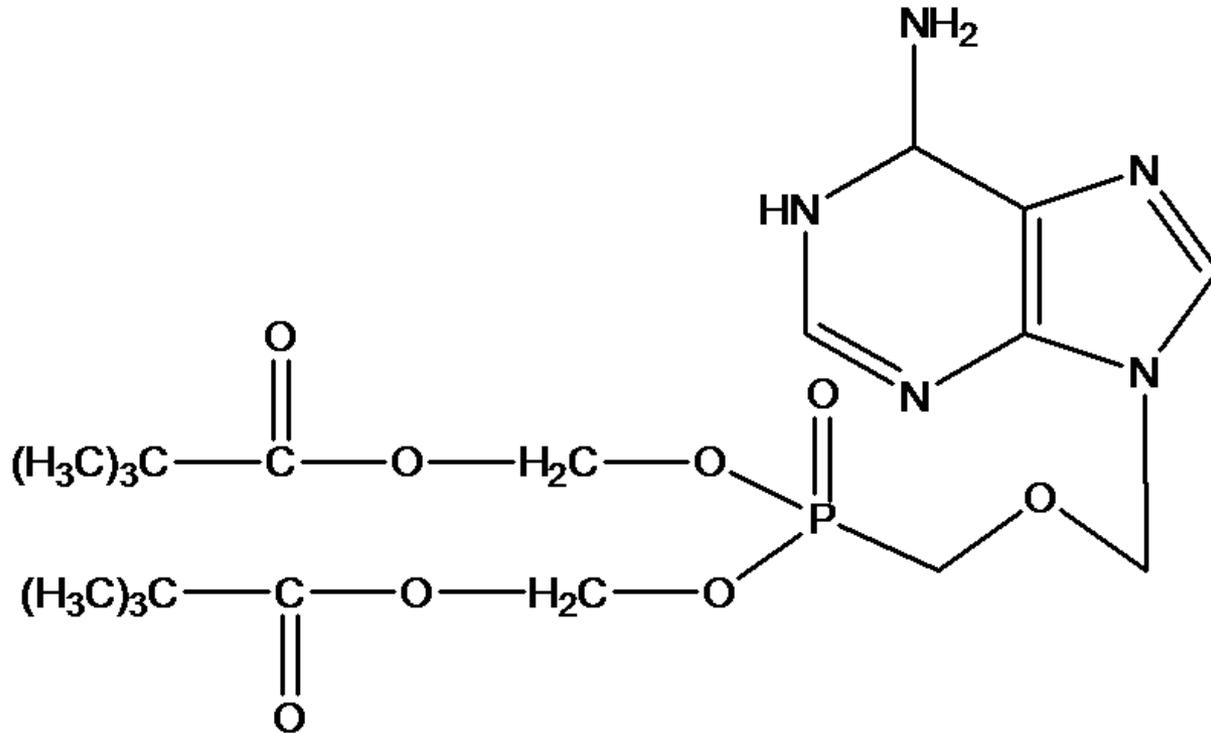


Mono(POM)PMEA



PME A

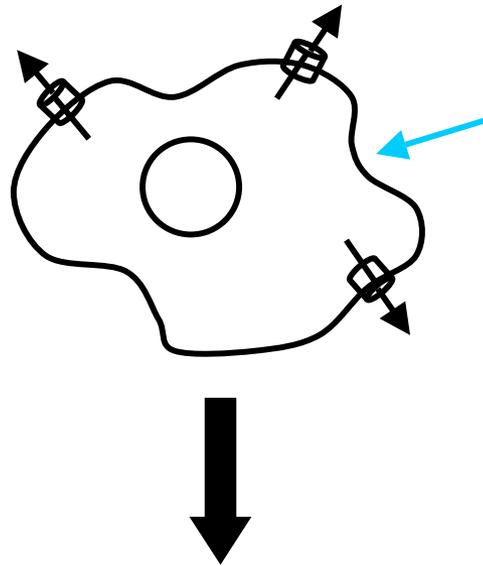
Résultats : Bis(POM)PMEA



9-[2-(BisPivaloyloxyMethyl)PhosphoMethoxy]Adenine
[Bis(POM)PMEA ou Adefovir Dipivoxil]

Accumulation de **Bis(POM)PMEA**, **Mono(POM)PMEA** et **PMEA**

Cellules sauvages



Bis(POM)PMEA
0-200 μ M pdt 2 heures

Dosage des contenus cellulaires en
Bis(POM)PMEA, **Mono(POM)PMEA** et **PMEA**

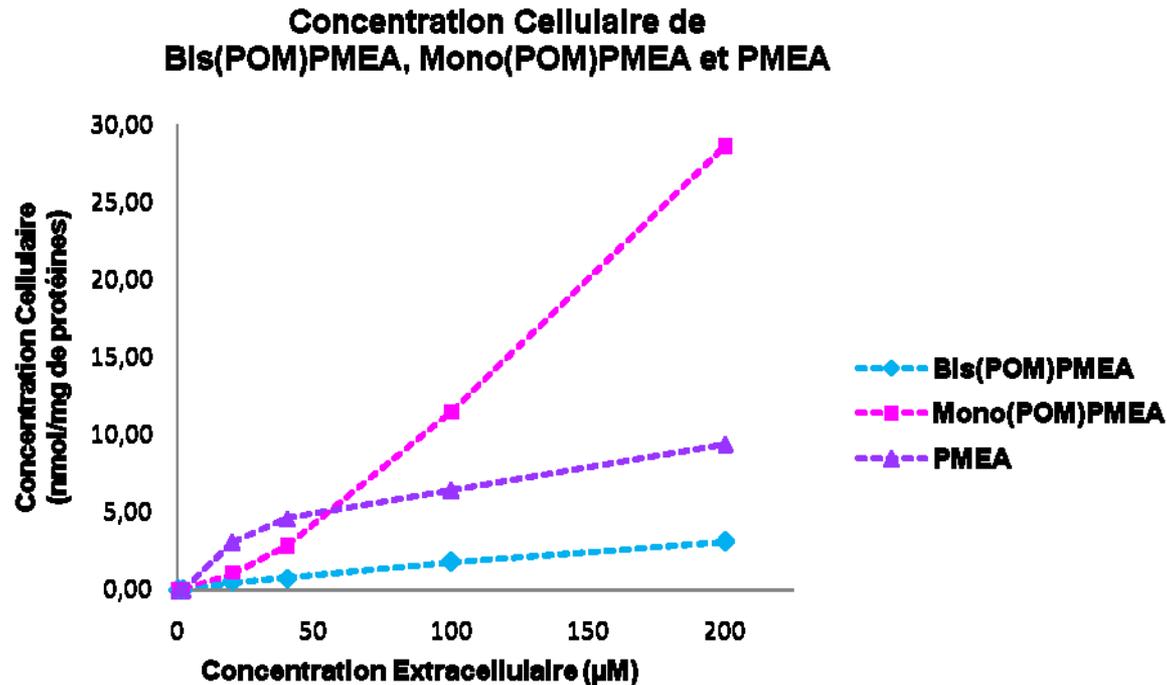
HPLC: 4°C, flux de 1 mL/min, volume d'injection 25 μ L.

Phase stationnaire: colonne Agilent C8 (4,6x250mm)

Phase mobile A : Acétonitrile

Phase mobile B : 900 mL de tampon [10 mM KH_2PO_4 et 2 mM $(\text{But})_4\text{N}^+ \text{HSO}_4^-$] et 50 mL Acétonitrile.

Accumulation de **Bis(POM)PMEA**, **Mono(POM)PMEA** et **PMEA**



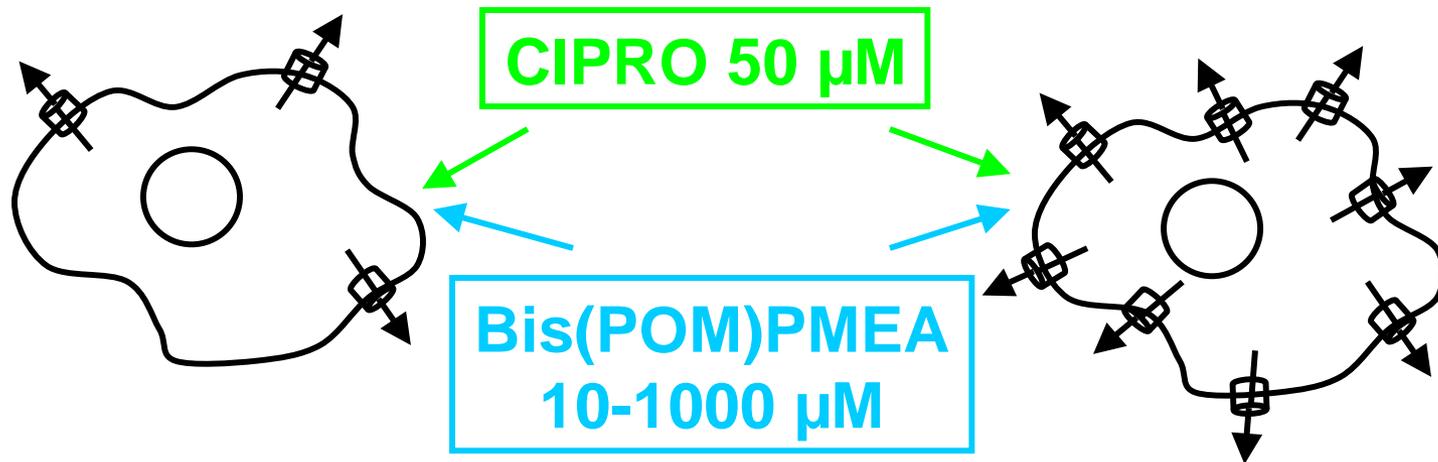
Le profil de dégradation du **Bis(POM)PMEA** est caractérisé par :

- Une dégradation quasi complète du **Bis(POM)PMEA** ;
- Une importante formation de **Mono(POM)PMEA** ;
- Une production faible et saturable de **PMEA**.

Compétition entre CIPRO et Bis(POM)PMEA

Cellules sauvages

Cellules résistantes



Dosage du contenu cellulaire en CIPRO

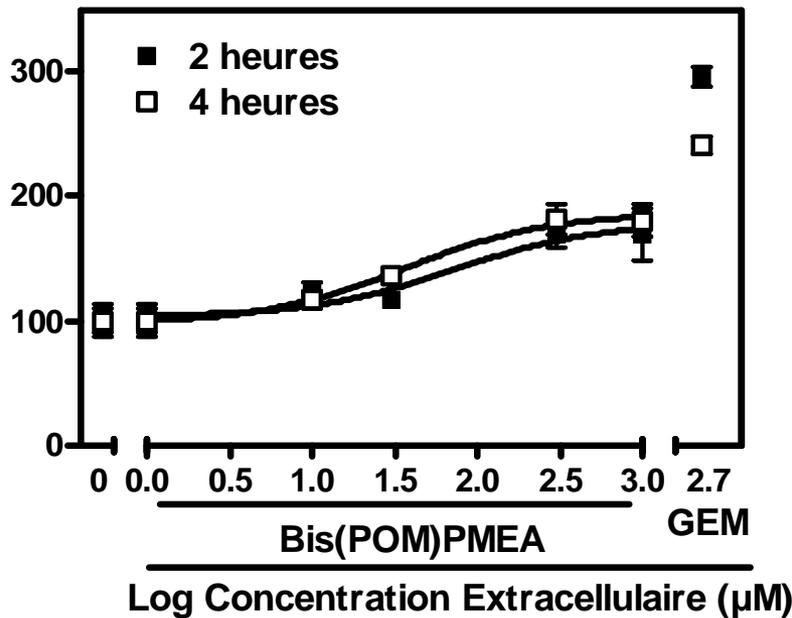
Fluorimétrie: $\lambda_{\text{excitation}} = 275 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 450 \text{ nm}$

Compétition entre CIPRO et Bis(POM)PMEA

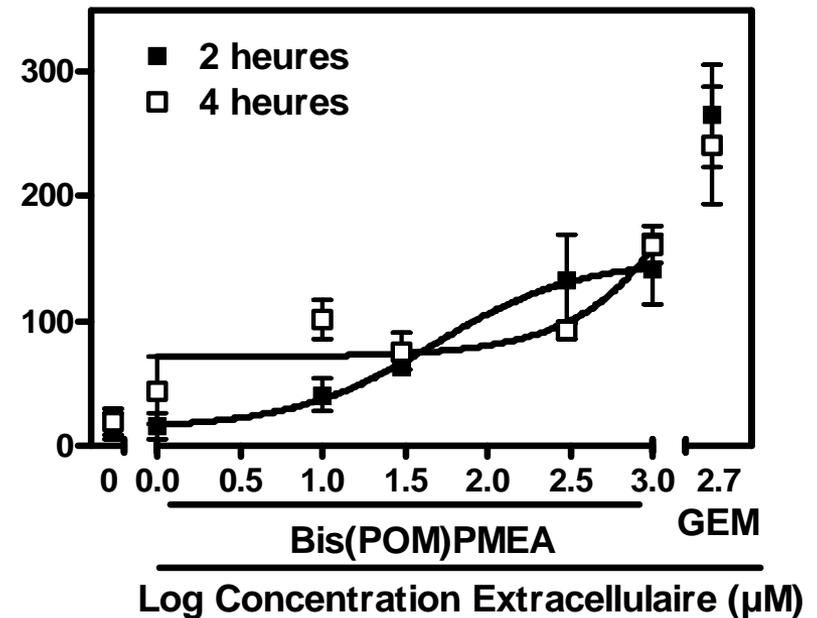
Accumulation de Ciprofloxacine

Concentration Cellulaire de CIPRO
(% par rapport au contrôle ds les WT)

Cellules sauvages



Cellules résistantes

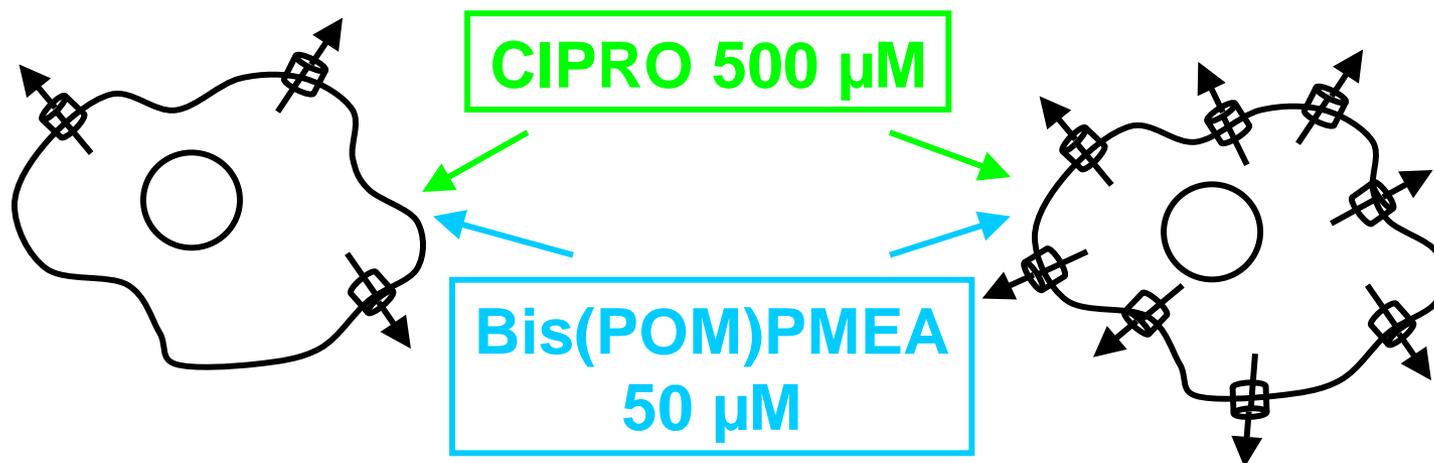


L'accumulation de CIPRO est augmentée en présence de Gemfibrozil ou de Bis(POM)PMEA dans les deux types cellulaires

Compétition entre Bis(POM)PMEA et CIPRO

Cellules sauvages

Cellules résistantes



Dosage du contenu cellulaire en Mono(POM)PMEA et PMEA

HPLC: 4°C, flux de 1 mL/min, volume d'injection 25 μL.

Phase stationnaire: colonne Agilent C8 (4,6x250mm)

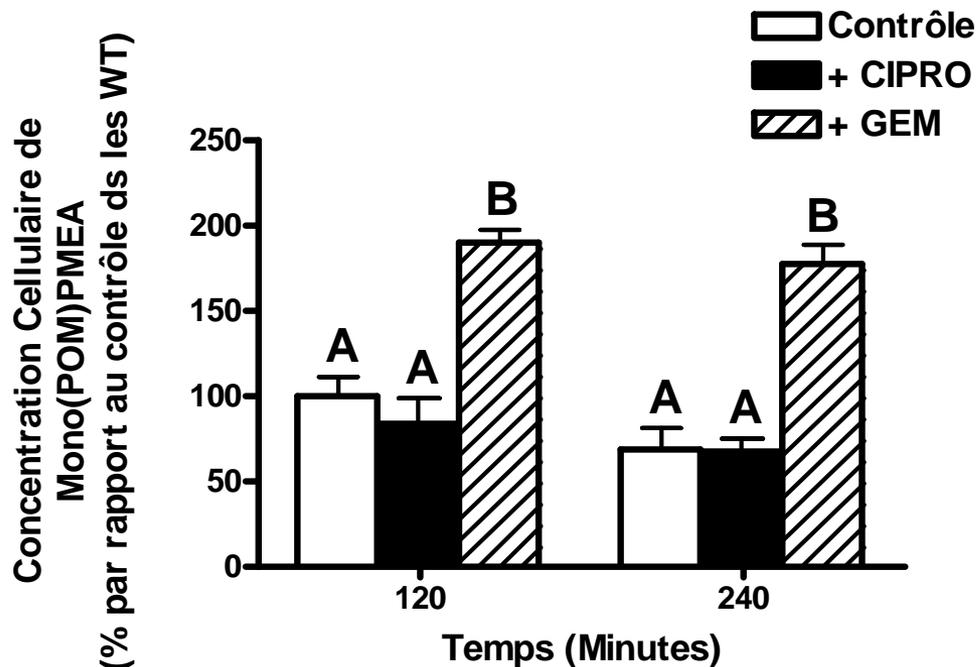
Phase mobile A : Acétonitrile

Phase mobile B : 900 mL de tampon [10 mM KH_2PO_4 et 2 mM $(\text{But})_4\text{N}^+ \text{HSO}_4^-$] et 50 mL Acétonitrile.

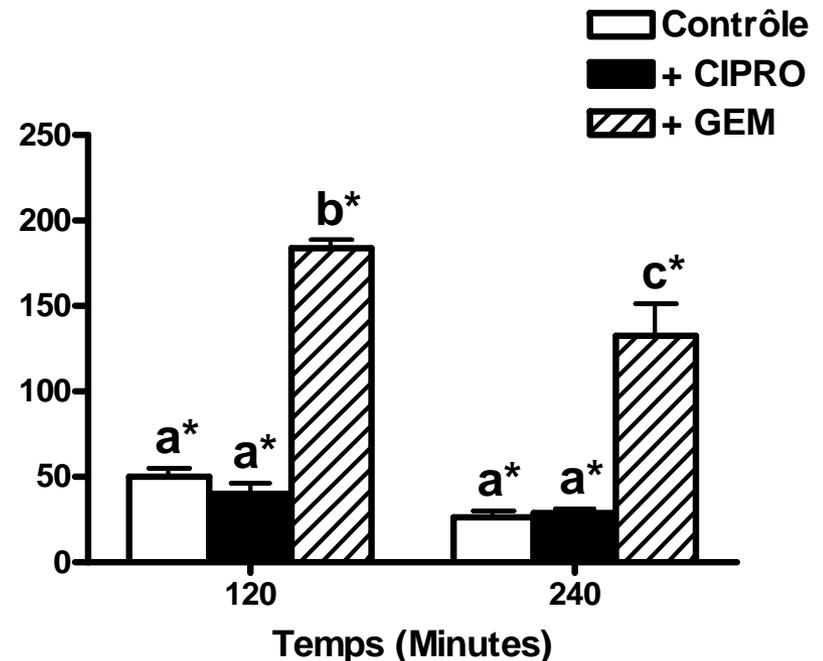
Compétition entre Bis(POM)PMEA et CIPRO

Accumulation de Mono(POM)PMEA

Cellules sauvages



Cellules résistantes

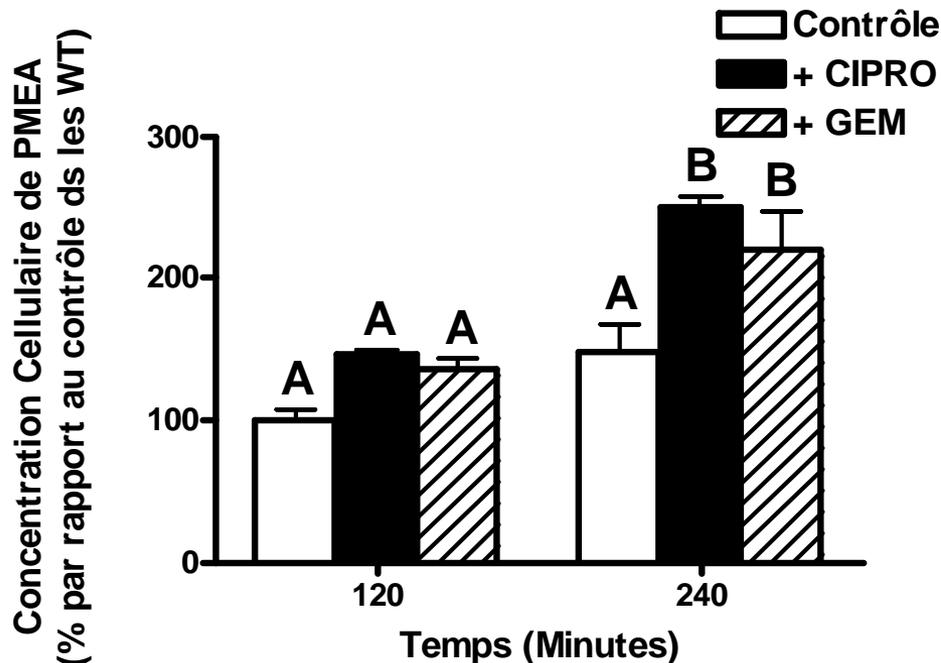


L'accumulation de Mono(POM)PMEA n'est pas affectée par la CIPRO mais l'est par le Gemfibrozil dans les cellules sauvages et résistantes

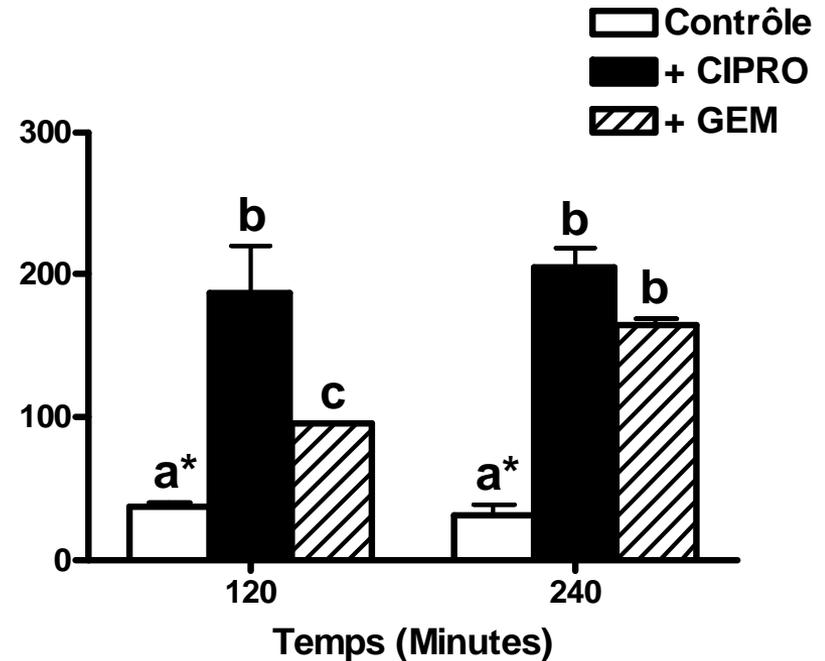
Compétition entre Bis(POM)PMEA et CIPRO

Accumulation de PMEA

Cellules sauvages



Cellules résistantes



L'accumulation de PMEA est augmentée en présence de Gemfibrozil ou de CIPRO et ce, surtout dans les cellules résistantes

CIPRO versus Bis(POM)PMEA/PMEA :

Conclusion de ces compétitions

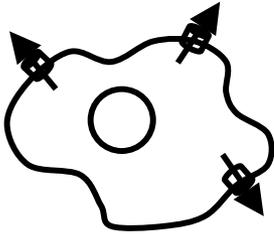
Paramètre	Cellules	Accumulation	
		CIPRO	PMEA < BIS(POM)PMEA
Accumulation	RS vs WT	↘	↘
Effet du Gemfibrozil	WT	↗	(↗)
Effet du médicament compétiteur	WT	↗	(↗)
Effet du Gemfibrozil	RS	↗	↗
Effet du médicament compétiteur	RS	↗	↗



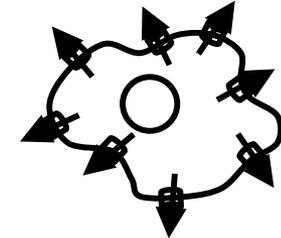
Le Bis(POM)PMEA a un effet similaire à celui du Gemfibrozil...
Mais y a-t-il compétition pour l'efflux?

Cinétique d'efflux de la **Ciprofloxacine**

Cellules sauvages



Cellules résistantes



Incubation en présence
de 50 μM de **CIPRO**

Incubation en présence
de 50 μM de **CIPRO**
+ 300 μM de
Bis(POM)PMEA

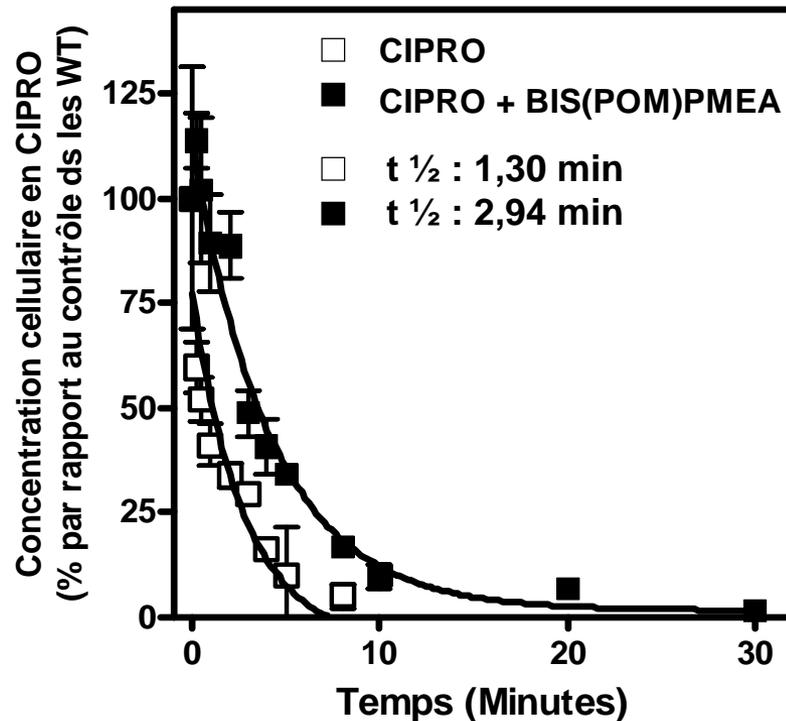
Lavages
Réincubation en présence
ou non de 1000 μM de
Bis(POM)PMEA

Dosage du contenu cellulaire en **CIPRO**

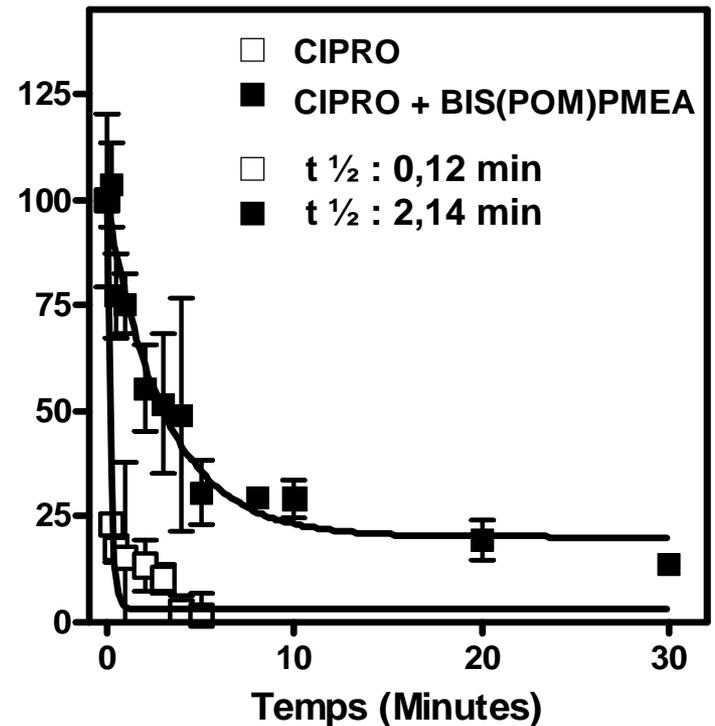
Fluorimétrie: $\lambda_{\text{excitation}} = 275 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 450 \text{ nm}$

Cinétique d'efflux de la Ciprofloxacine

Cellules sauvages



Cellules résistantes

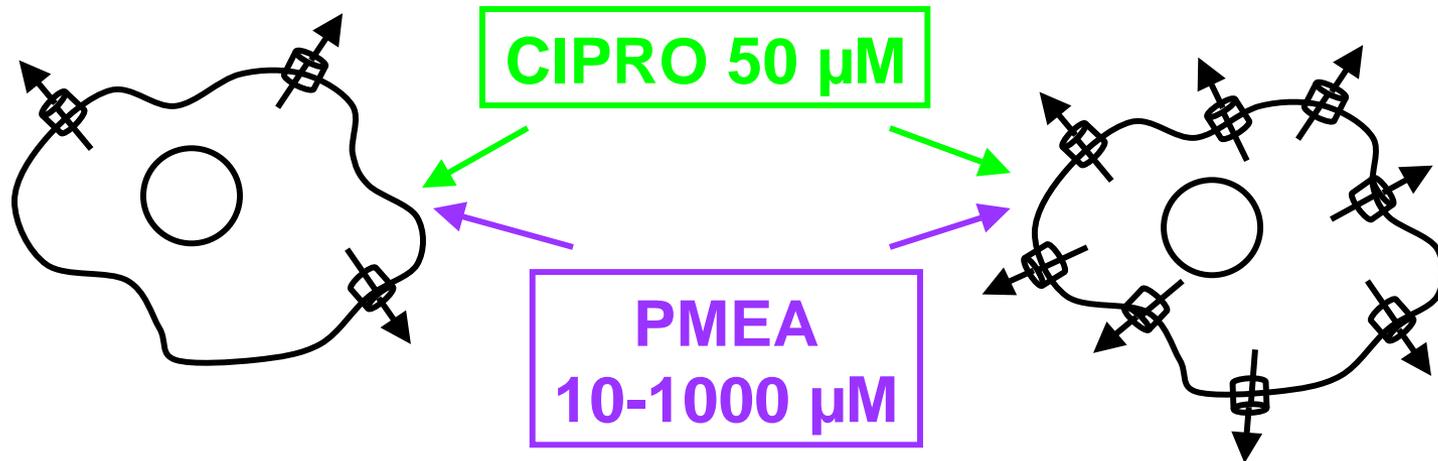


Le **PMEA** inhibe l'efflux de la **CIPRO** dans les 2 types cellulaires

Compétition entre Ciprofloxacine et PMEA

Cellules sauvages

Cellules résistantes



Dosage du contenu cellulaire en CIPRO

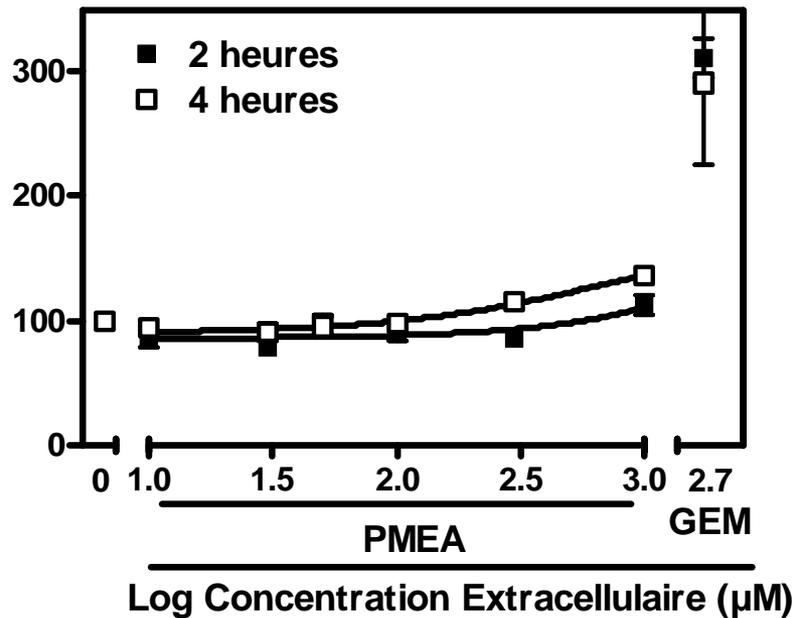
Fluorimétrie: $\lambda_{\text{excitation}} = 275 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 450 \text{ nm}$

Compétition entre Ciprofloxacine et PME A

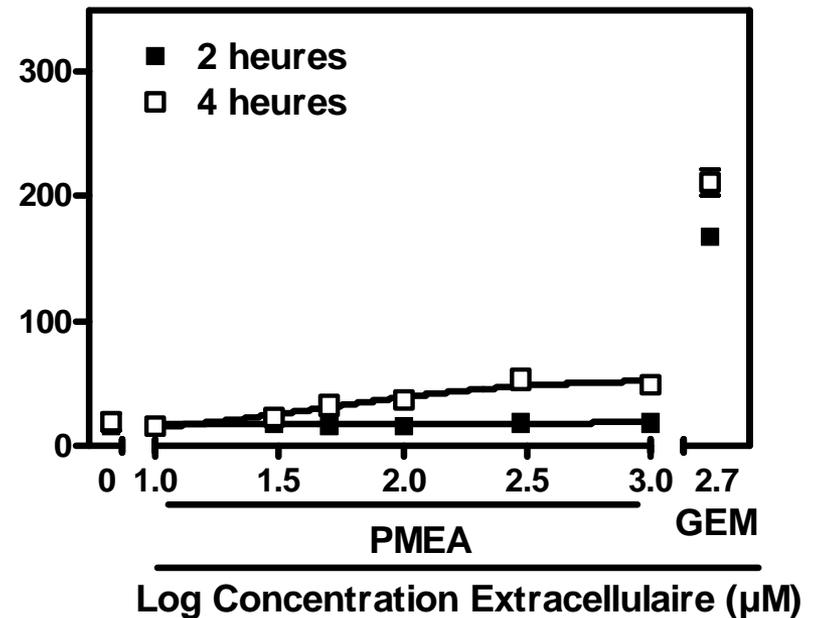
Accumulation de Ciprofloxacine

Concentration Cellulaire de CIPRO
(% par rapport au contrôle ds les WT)

Cellules sauvages



Cellules résistantes

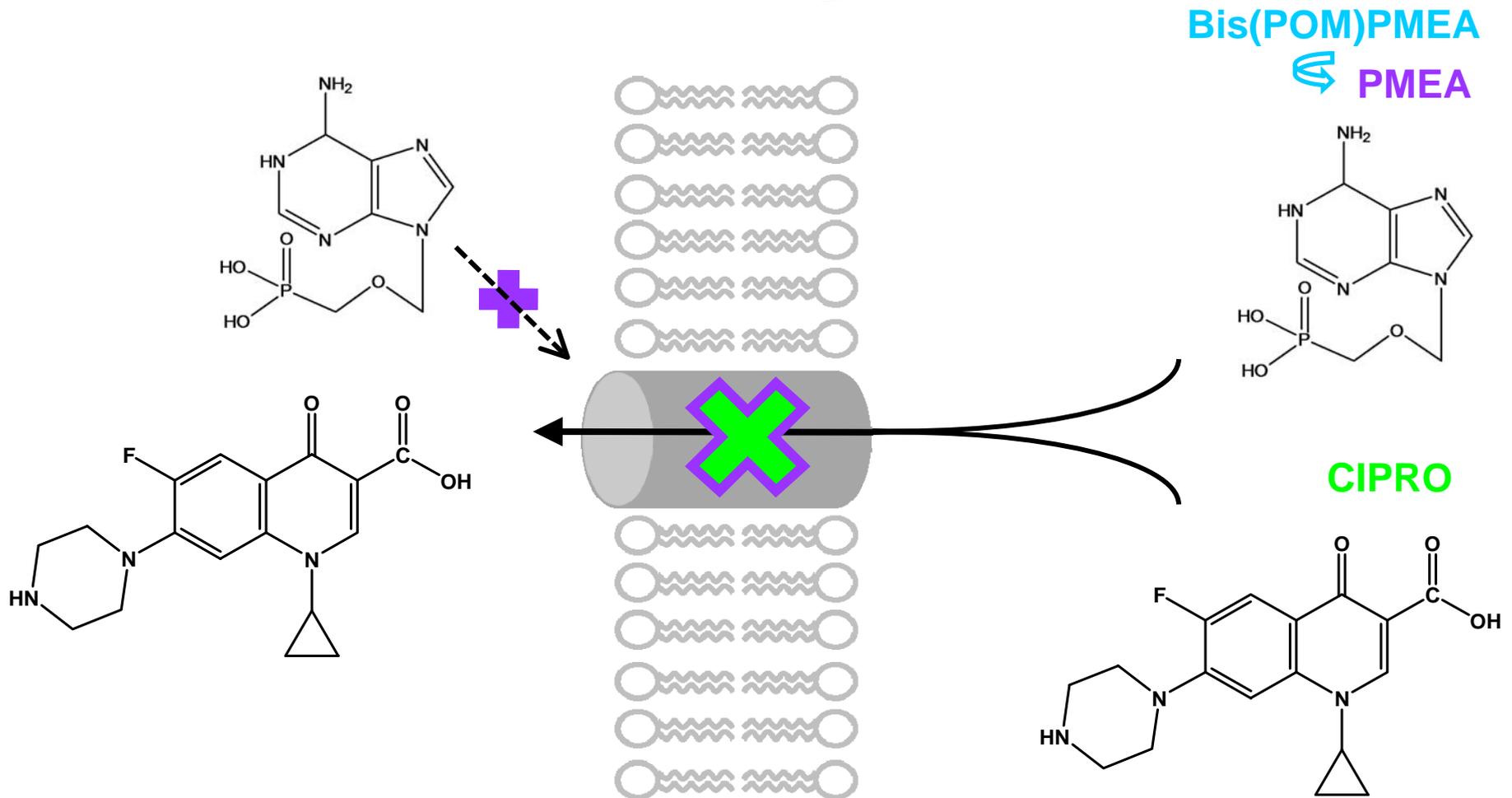


L'accumulation de CIPRO n'est pas (ou peu) affectée par le PME A dans les cellules sauvages et résistantes

CIPRO versus Bis(POM)PMEA/PMEA: Conclusions générales

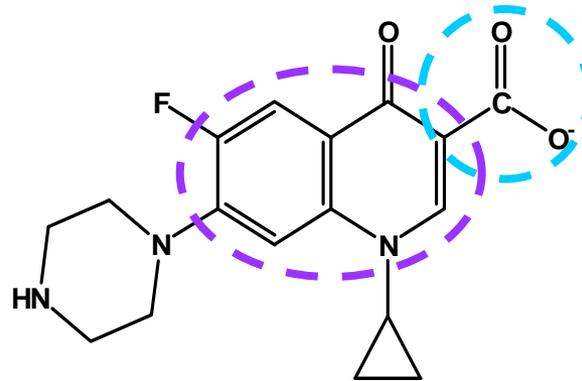
- x Le **PMEA** n'a quasi effet sur l'accumulation de **CIPRO** dans les cellules sauvages et résistantes
- x Le **Bis(POM)PMEA**
 - ↗ l'accumulation de **CIPRO**
 - ↘ l'efflux de **CIPRO**
- x La **CIPRO** ↗ l'accumulation de **PMEA**

Conclusions générales



Le **PMEA** est substrat du transporteur MRP de la **CIPRO** et inhibe également son efflux

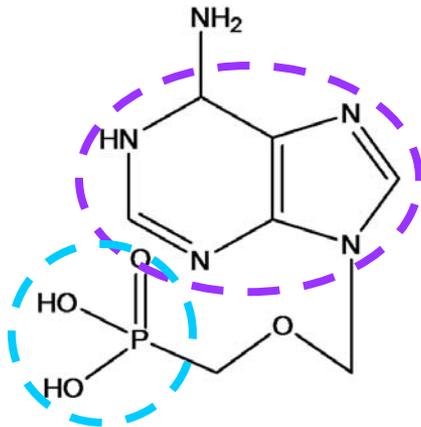
Ciprofloxacin



PMEA et MRP4

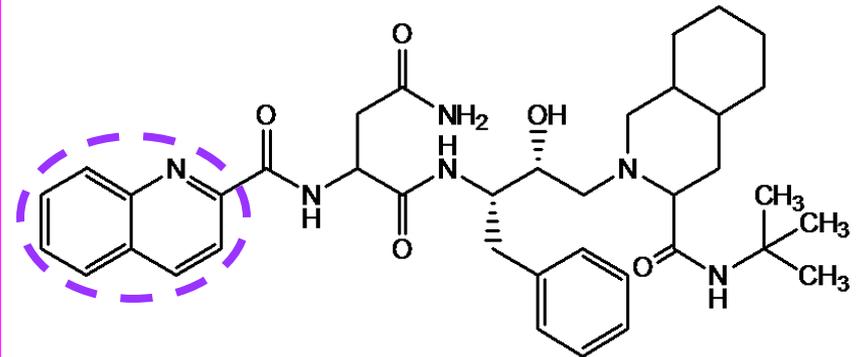
PMEA [Adéfovir]

9-(2-PhosphonylMethoxyEthyl)Adenine



Saquinavir et MRP2

Saquinavir

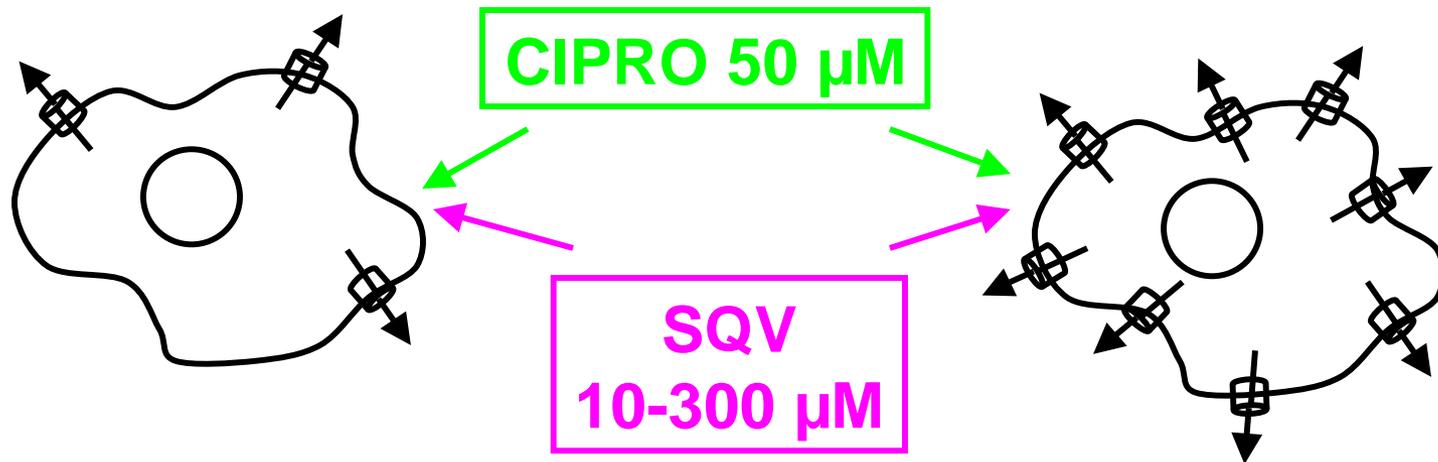


Huisman et al. *AIDS*. 2002 16:2295-301.
Williams et al. *AAC*. 2002 46:3456-62.

Compétition entre Ciprofloxacine et SQV

Cellules sauvages

Cellules résistantes



Dosage du contenu cellulaire en CIPRO

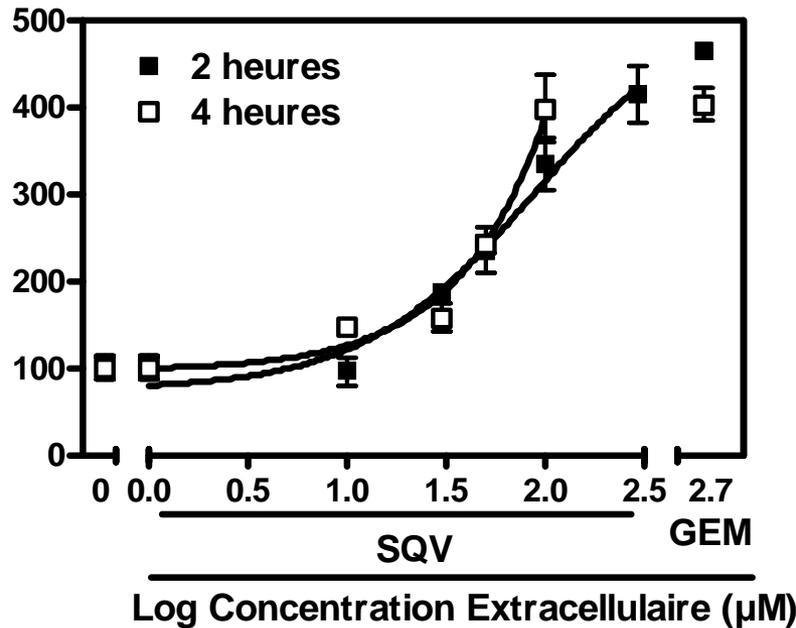
Fluorimétrie: $\lambda_{\text{excitation}} = 275 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 450 \text{ nm}$

Compétition entre Ciprofloxacine et SQV

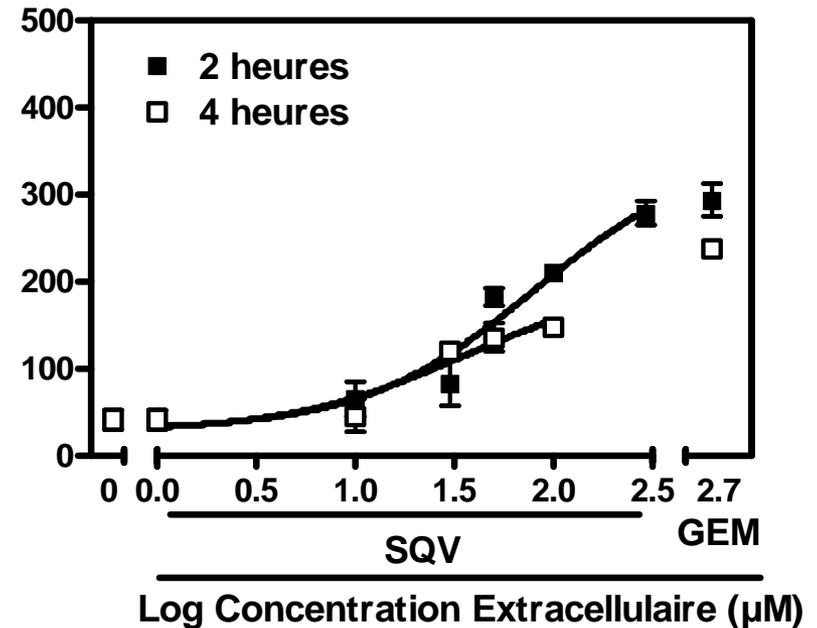
Accumulation de Ciprofloxacine

Concentration Cellulaire de CIPRO
(% par rapport au contrôle ds les WT)

Cellules sauvages



Cellules résistantes

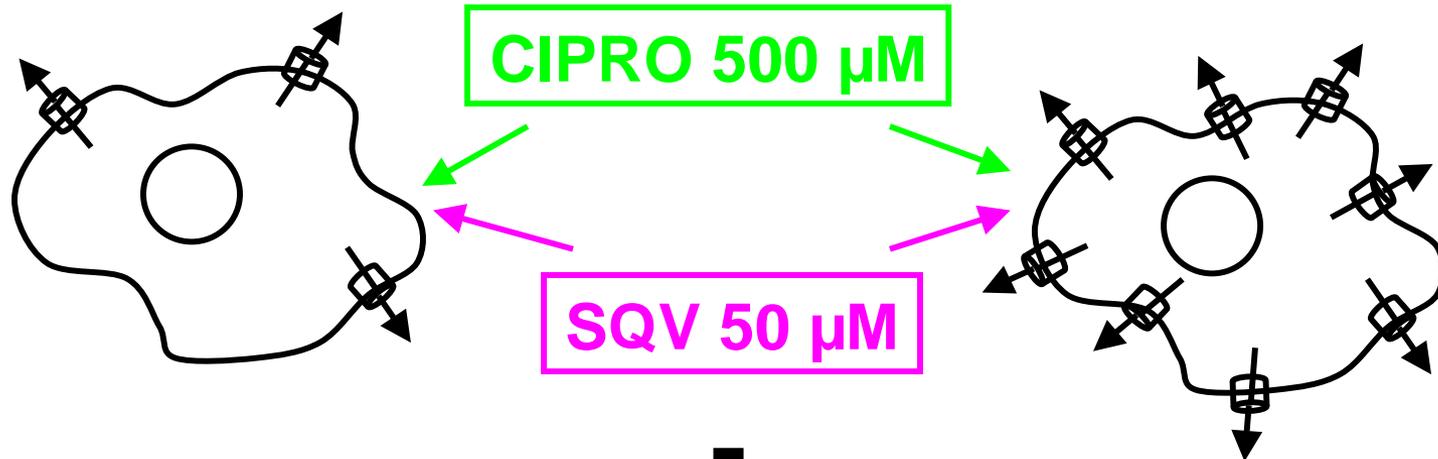


L'accumulation de CIPRO est augmentée en présence de Gemfibrozil ou de SQV dans les deux types cellulaires

Compétition entre SQV et Ciprofloxacine

Cellules sauvages

Cellules résistantes



Dosage du contenu cellulaire en SQV

HPLC: 25°C, gradient isocratique, flux de 1 mL/min.

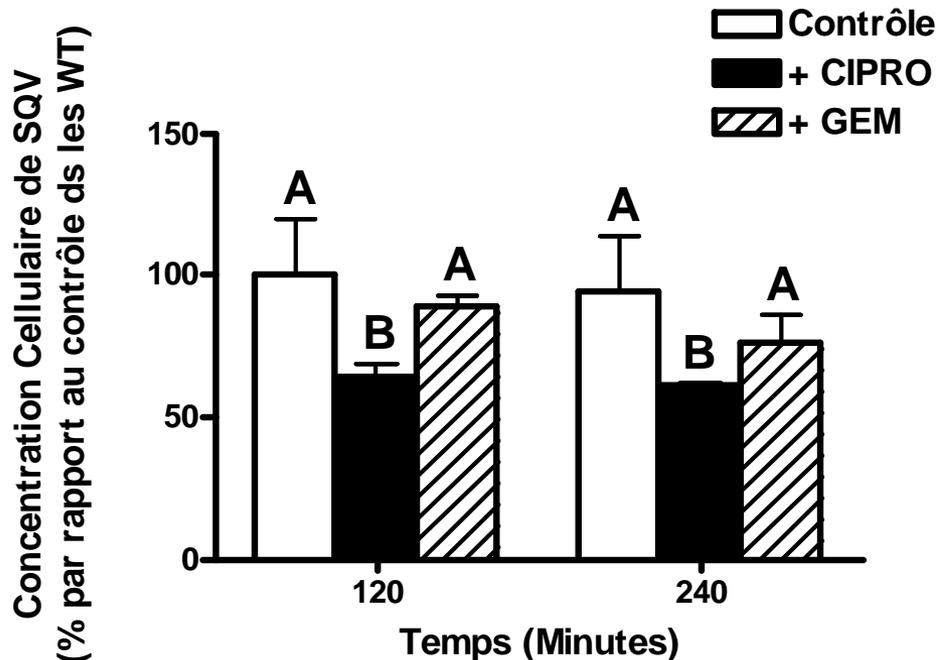
Phase stationnaire : colonne Agilent C8 (4,6x250mm)

Phase mobile : 45% Acétonitrile / 55% de tampon [3,042 g KH_2PO_4 et 0,6 mL Triéthylamine /L, ajusté à pH 3,1]

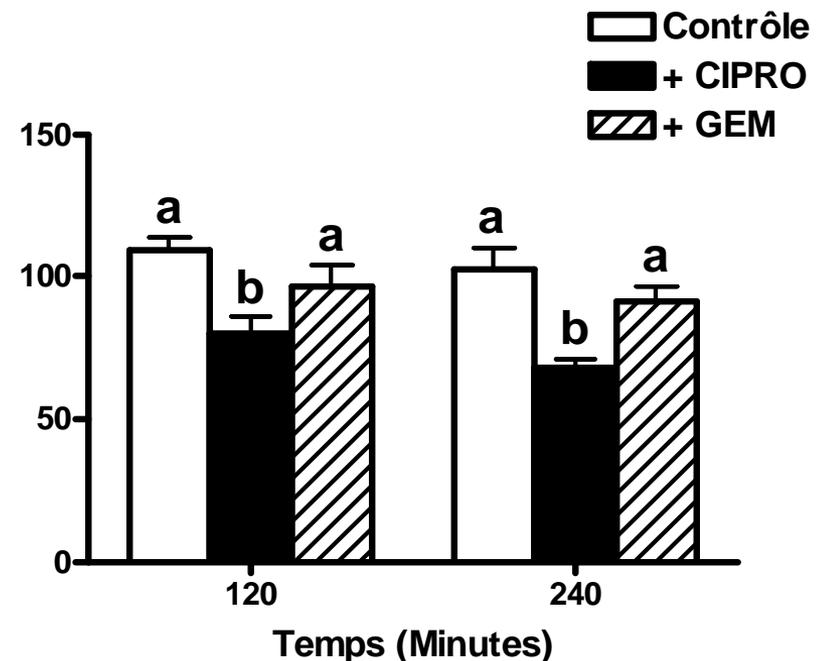
Compétition entre SQV et Ciprofloxacine

Accumulation de Saquinavir

Cellules sauvages



Cellules résistantes



➔ L'accumulation de SQV n'est augmentée ni par la CIPRO ni par le Gemfibrozil dans les cellules sauvages et résistantes

CIPRO versus SQV :

Conclusion de ces compétitions

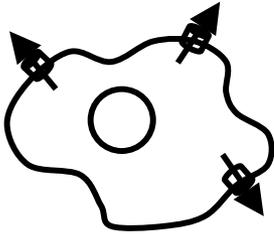
Paramètre	Cellules	Accumulation	
		CIPRO	SQV
Accumulation	RS vs WT	↘	-
Effet du Gemfibrozil	WT	↗	-
Effet du médicament compétiteur	WT	↗	-
Effet du Gemfibrozil	RS	↗	-
Effet du médicament compétiteur	RS	↗	-



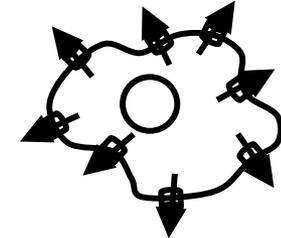
Le **SQV** a un effet similaire à celui du Gemfibrozil...
Mais y a-t-il compétition pour l'efflux?

Cinétique d'efflux de la **Ciprofloxacine**

Cellules sauvages



Cellules résistantes



Incubation en présence
de 50 μM de **CIPRO**

Incubation en présence
de 50 μM de **CIPRO**
+ 30 μM de **SQV**

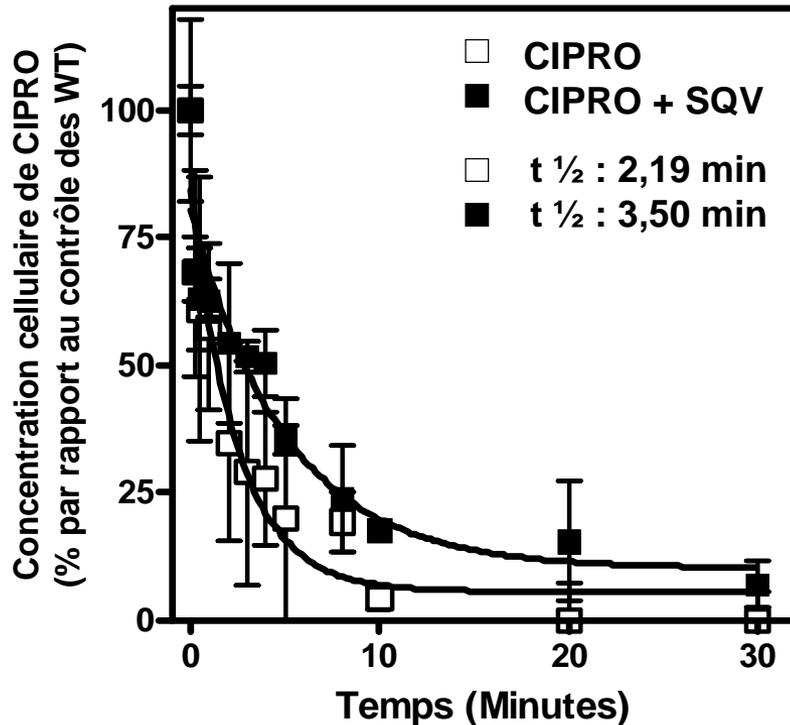
Lavages
Réincubation en présence
ou non de 300 μM de **SQV**

Dosage du contenu cellulaire en **CIPRO**

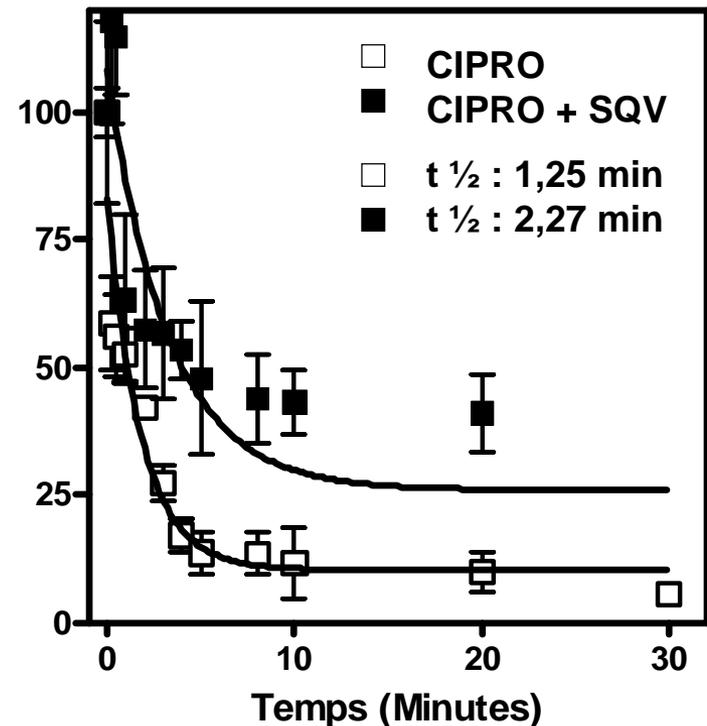
Fluorimétrie: $\lambda_{\text{excitation}} = 275 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 450 \text{ nm}$

Cinétique d'efflux de la **Ciprofloxacine**

Cellules sauvages



Cellules résistantes

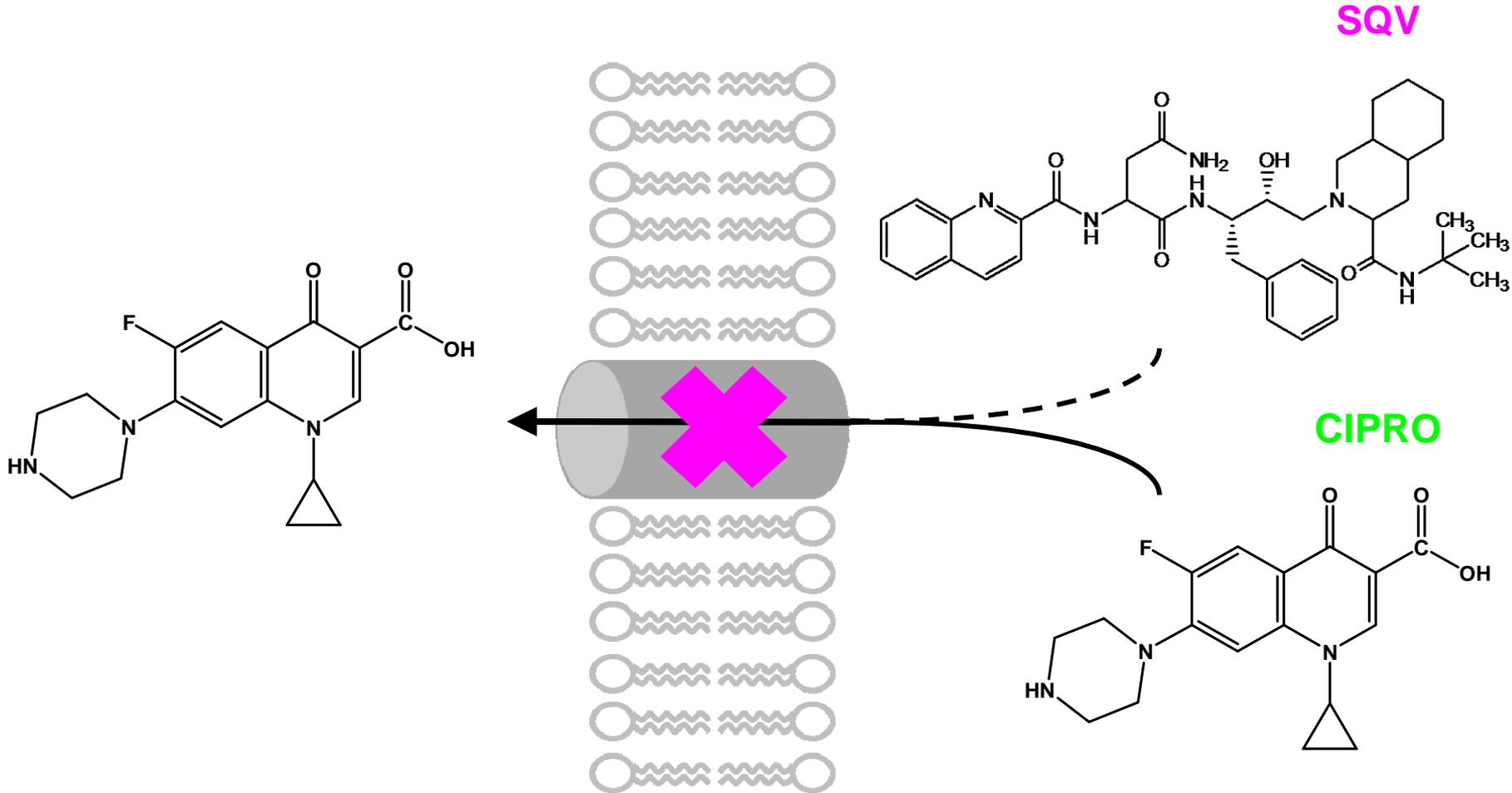


Le **SQV** inhibe l'efflux de la **CIPRO** dans les deux types cellulaires

CIPRO versus **SQV**: Conclusions générales

- × **Le Saquinavir**
 - ↗ l'accumulation de **CIPRO**
 - ↘ l'efflux de **CIPRO**
- × **La CIPRO** n'a aucun effet sur le **Saquinavir**

Conclusions générales



Le **Saquinavir** est un puissant inhibiteur du transport de la **CIPRO**

Perspectives

× Etudes à court terme :

- Mécanisme d'inhibition par le Saquinavir : Compétitif ou non ?
 - Etudes pharmacocinétiques:
 - Accumulation de SQV à de plus faibles concentrations;
 - Etudes de la capture et de l'efflux du SQV.
- Interaction du Saquinavir : MRP2 ou MRP4 ?
 - Compétition entre le Bis(POM)PMEA et le SQV;
 - Etude de l'accumulation des antiviraux et de leur pouvoir inhibiteur sur le transport de la Ciprofloxacine dans des cellules surexprimant spécifiquement MRP2 ou MRP4.

× Etudes à long terme :

- Implications pharmacocinétiques;
- Conséquences toxicologiques et pharmacologiques.