



Diffusion intracellulaire des antibiotiques

Paul M. Tulkens, MD, PhD

**Unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire
Université catholique de Louvain
Bruxelles**

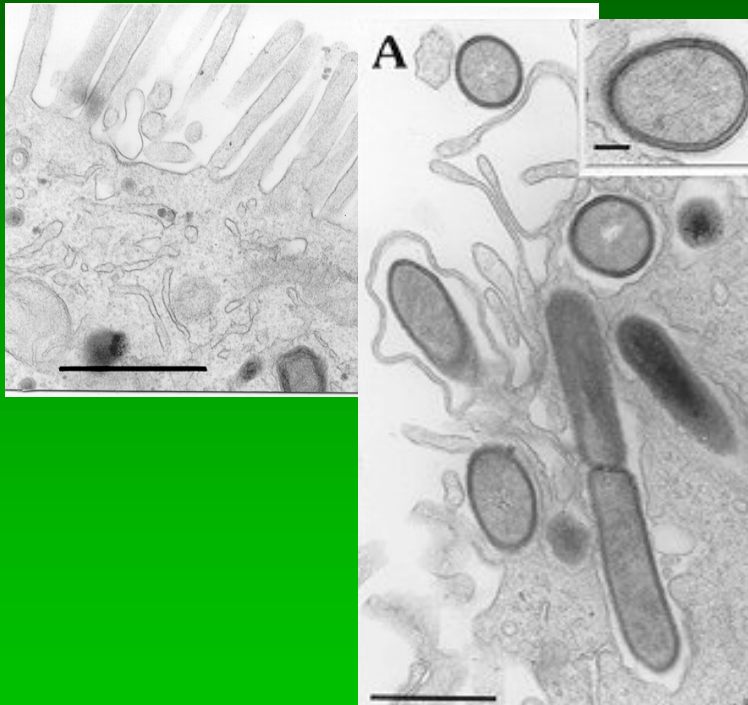
www.md.ucl.ac.be/facm

9ème journée de pathologie infectieuse et tropicale de Paris Nord
Pneumopathies communautaires
17 octobre 2001

Centre de recherches en pathologie infectieuse et tropicale (CREPIT)



Pourquoi des antibiotiques intracellulaires ?



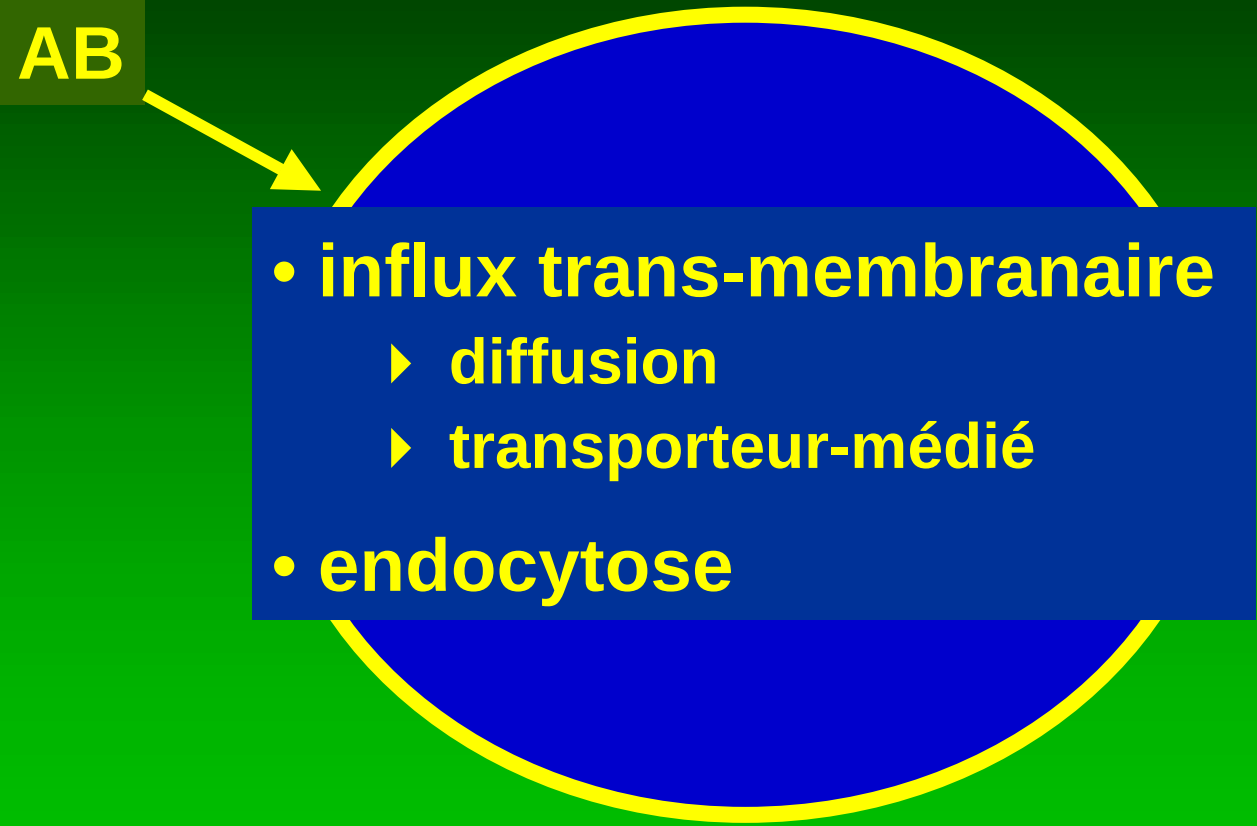
La cellule

bactéries

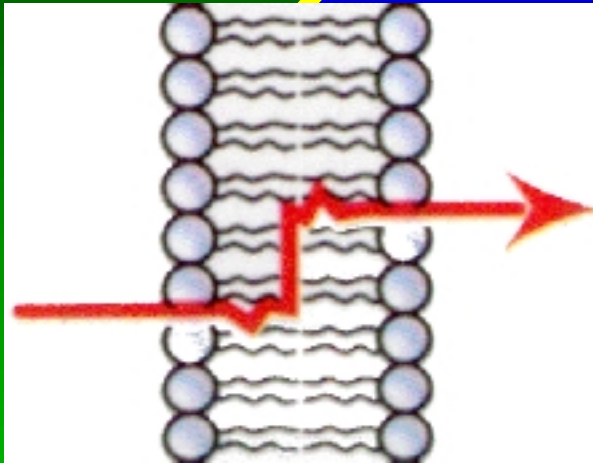
antibiotiques

Comment les antibiotiques pénètrent-ils dans la cellule ?

AB

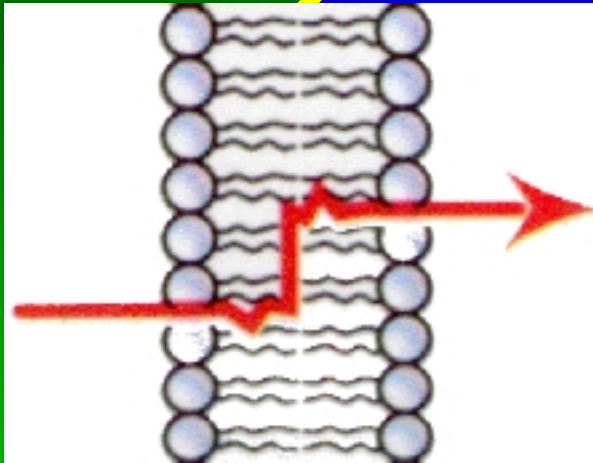
- 
- **influx trans-membranaire**
 - diffusion
 - transporteur-médié
 - **endocytose**

Pénétration par diffusion



- **composés amphiphiles**
 - ➡ **rapide**
 - ➡ **non-saturable**
 - ➡ **pas de compétition spécifique**

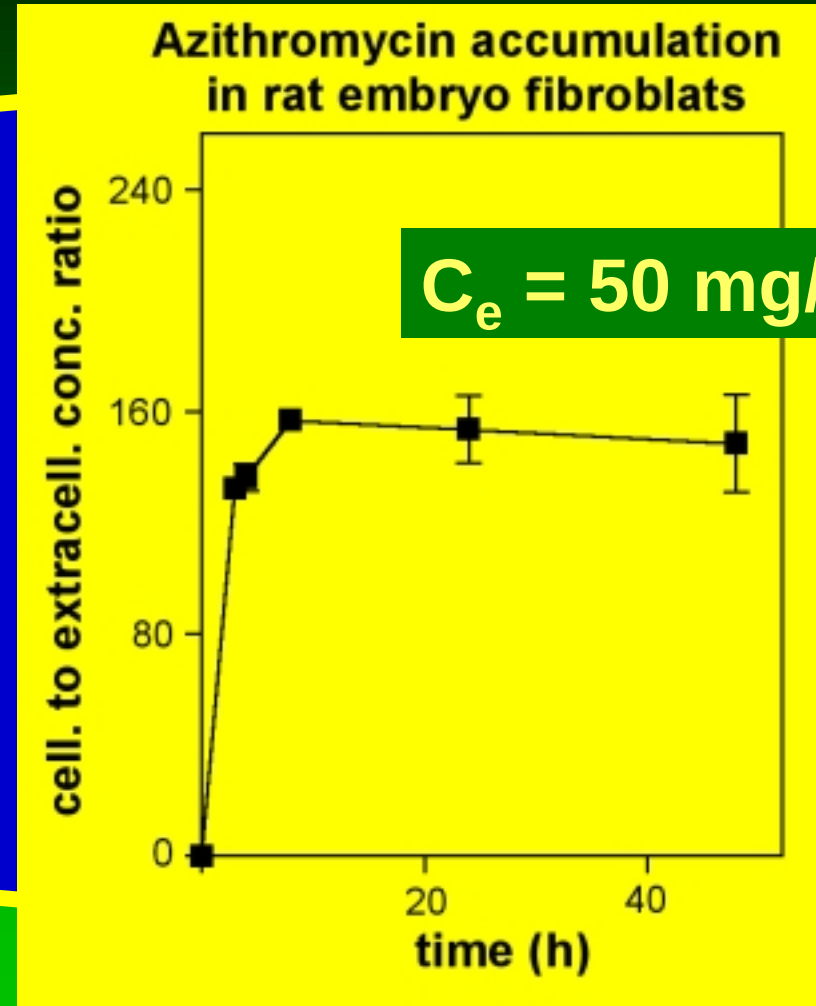
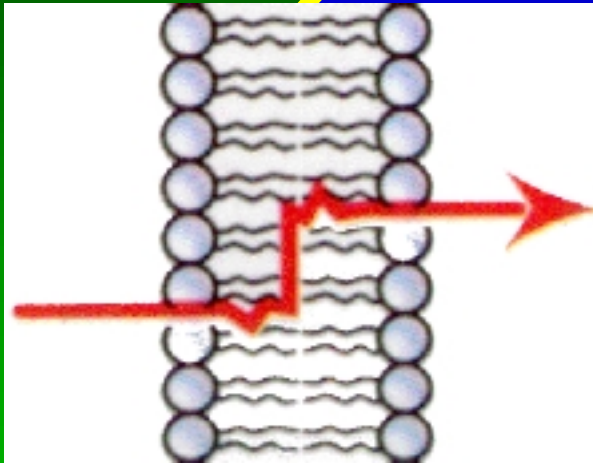
Exemples de pénétration probable par diffusion



- ▶ macrolides
- ▶ fluoroquinolones
- ▶ tetracyclines
- ▶ ansamycines
- ▶ β -lactames,
- ▶ ...

Diffusion d'un macrolide

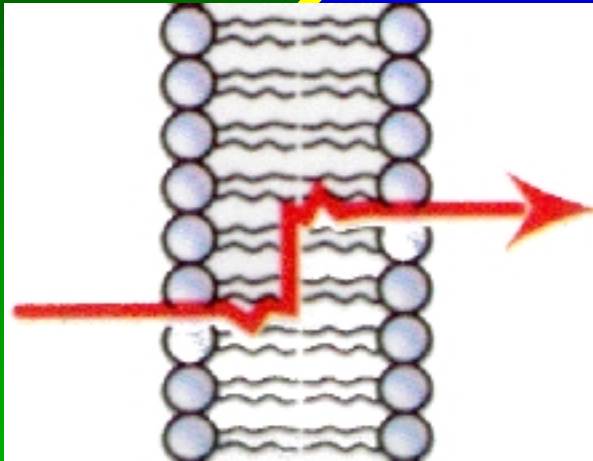
diffusion



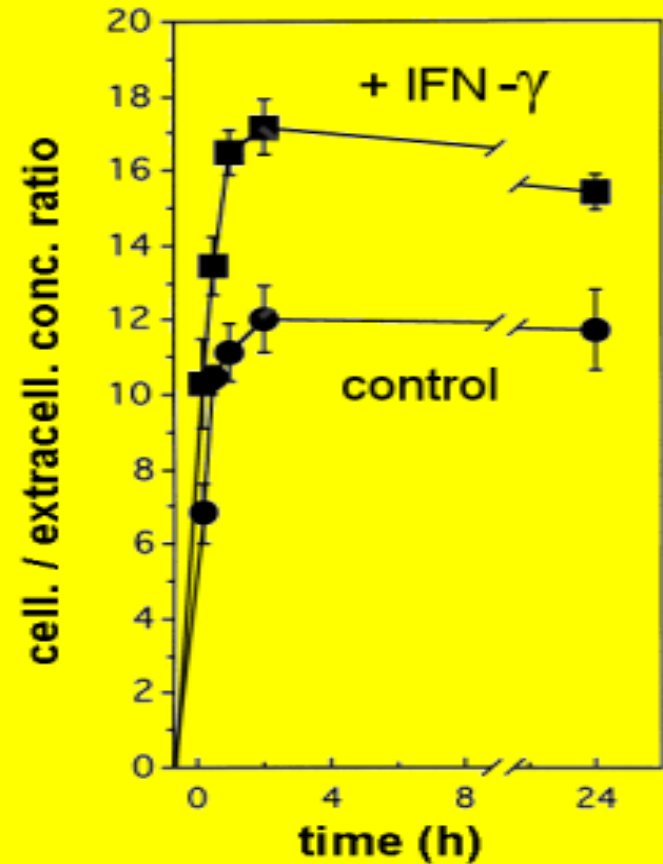
Tyteca et al., Eur. J. Cell Biol., 80(7):466-78, 2001

Diffusion d'une fluoroquinolone

diffusion



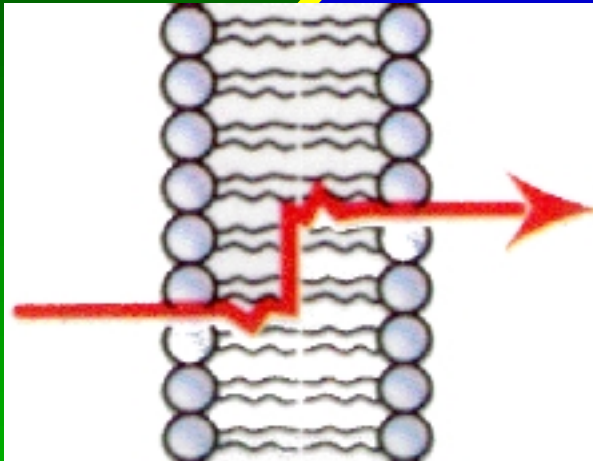
Sparfloxacin accumulation in THP-1 macrophages



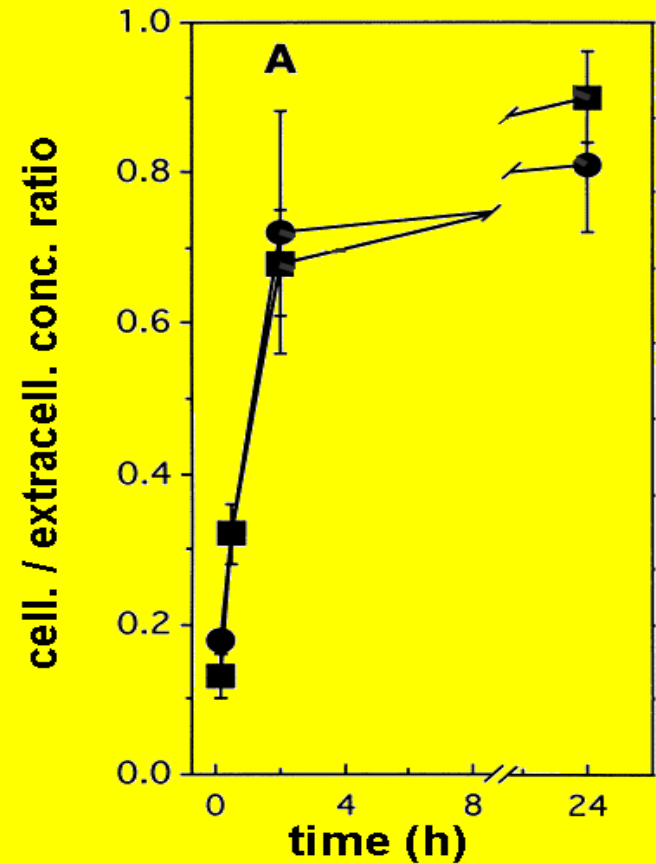
Ouahiri et al., AAC43:1242-1251, 1999

Diffusion d'une β -lactame

diffusion

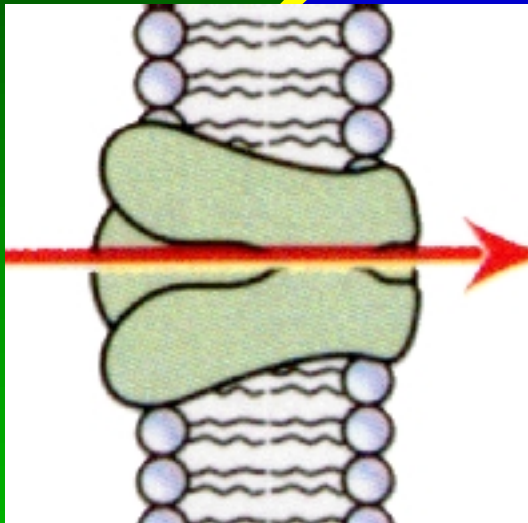


Ampicillin accumulation in THP-1 macrophages



Ouadrhiri et al., AAC43:1242-1251, 1999

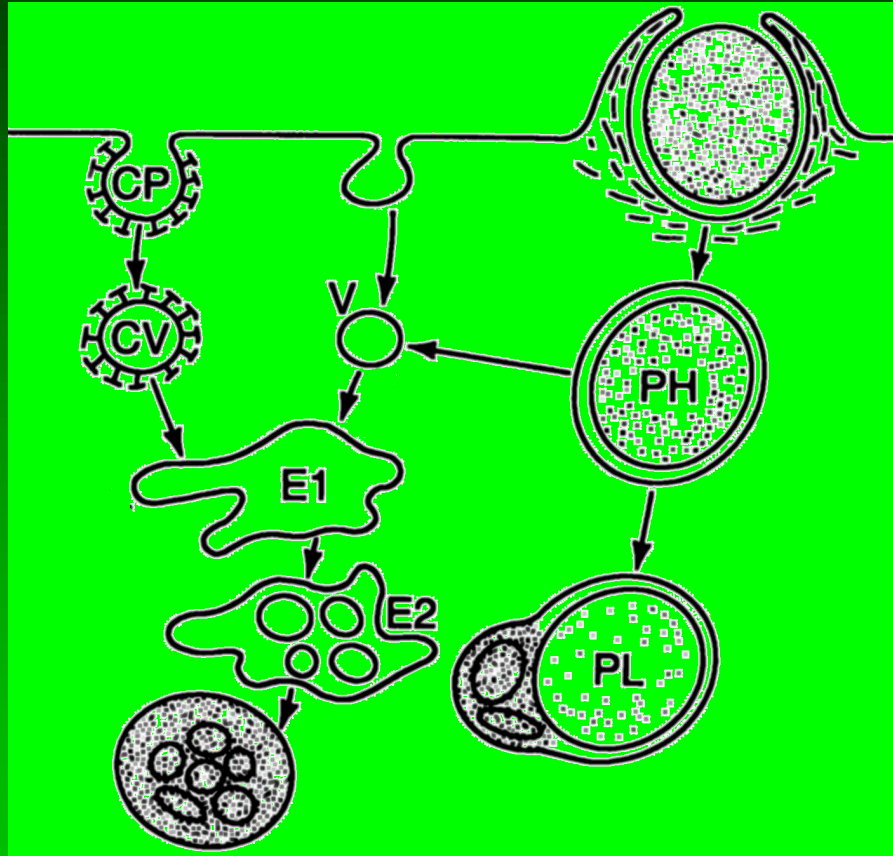
Pénétration médiée par transporteur “classique”



- ➡ **spécificité de structure**
- ➡ **énergie-dépendance**
- ➡ **saturabilité**
- ➡ **compétition par des analogues**

**Peu d'exemples totalement convaincants
sauf pour le transport intestinal**

Pénétration par endocytose



**molécules non- perméantes
(total. polaires)**

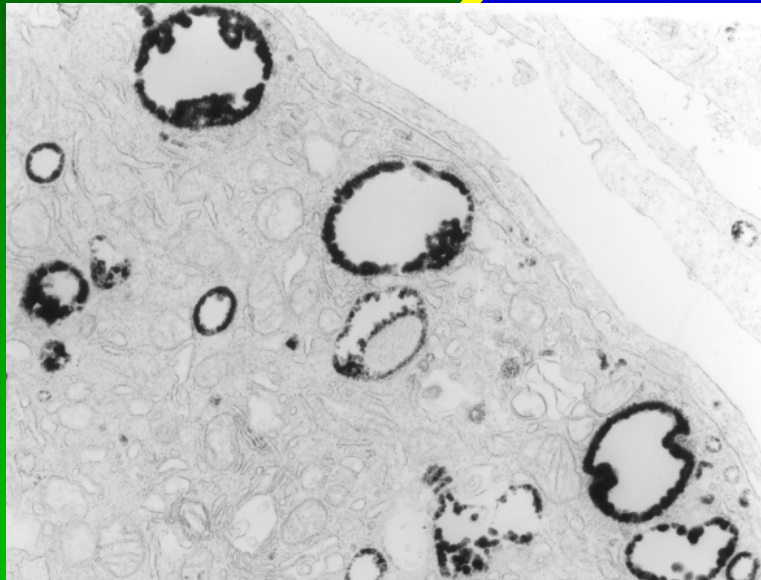
Endocytose:

- **fluide:**
→ **lent et non-saturable**
- **récepteur-médiée:**
→ **rapide et saturable**

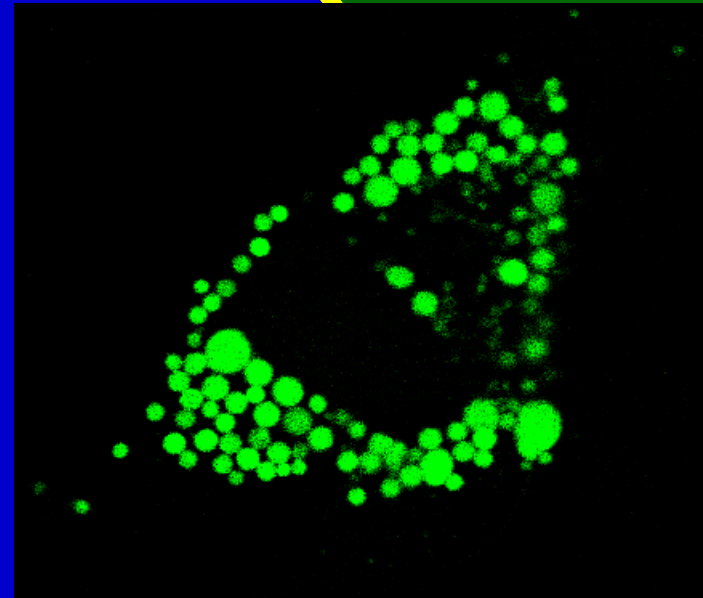
**Antibiotique confiné au
système endosomal /
lysosomal**

Exemples d'endocytose

Peroxydase de raifort

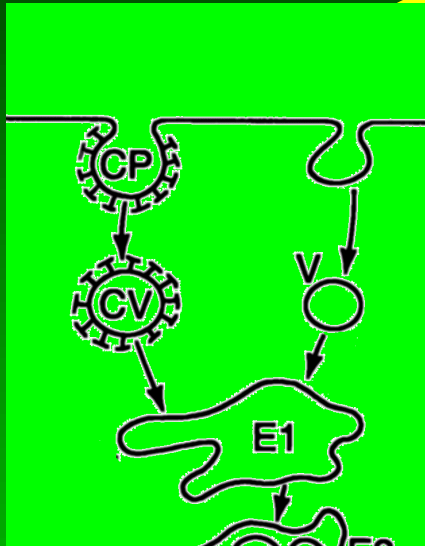


Lucifer Yellow

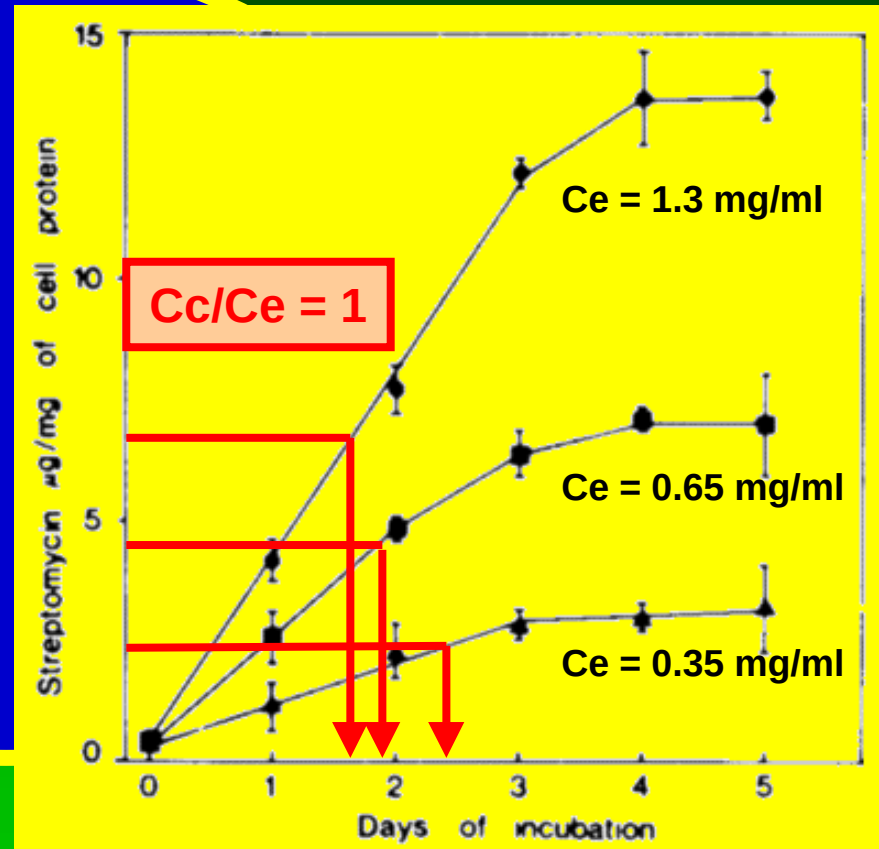


Tyteca et al., Eur. J. Cell Biol., 80(7):466-78, 2001

Accumulation des aminoglycosides dans les fibroblastes

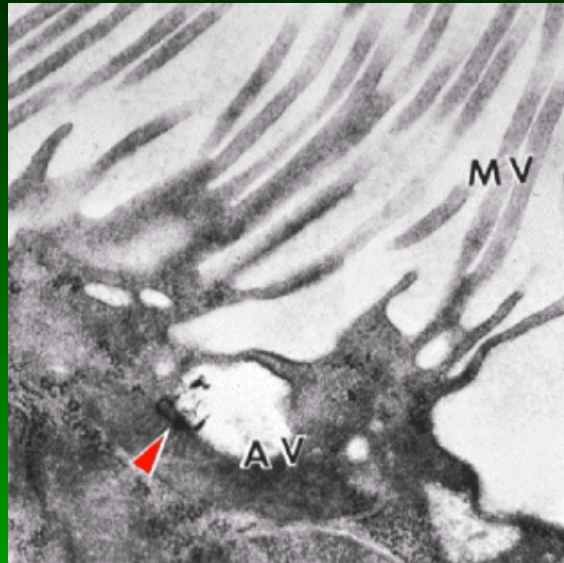


- ▶ lent (jours...)
- ▶ non-saturable
- ▶ peu efficace (2-4 fold)
- ▶ endocytose fluide ...



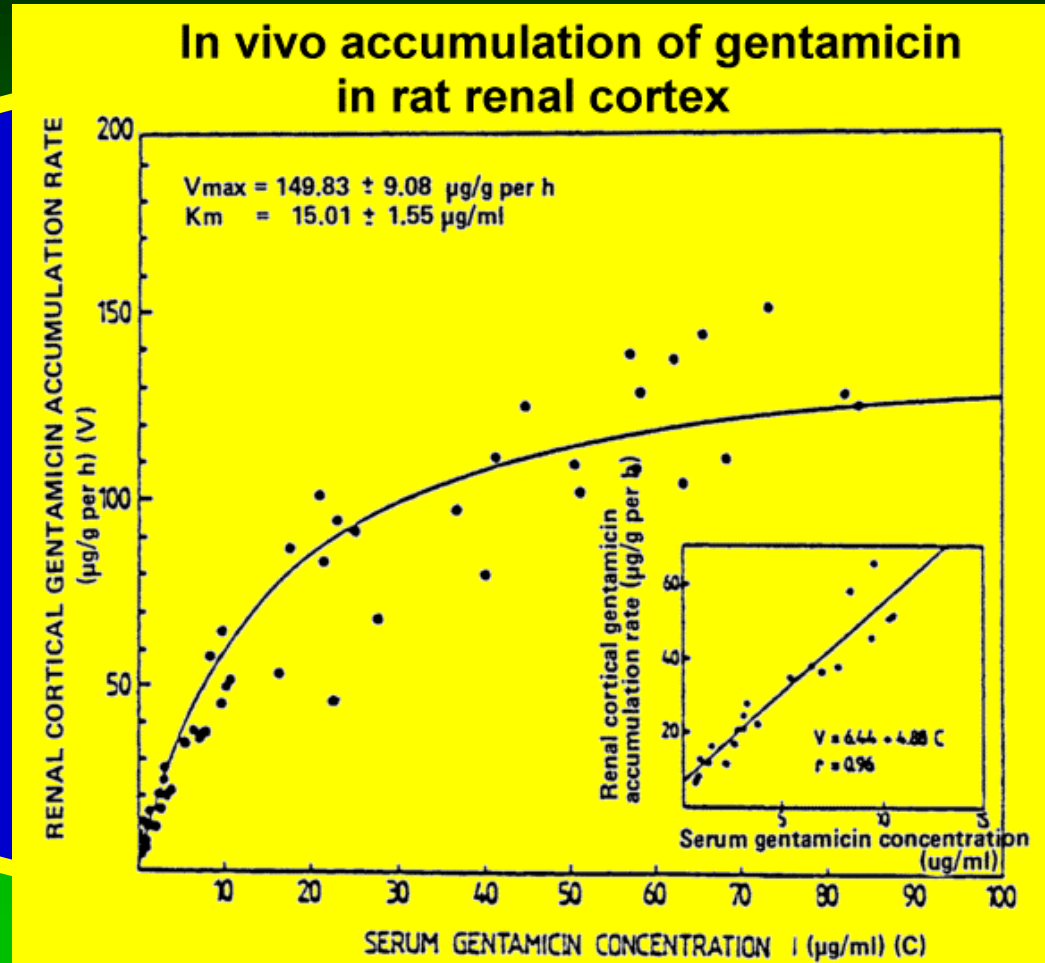
Tulkens & Trouet, Biochem. Pharmacol. 27:415-424 1978

Accumulation des aminoglycosides dans le rein



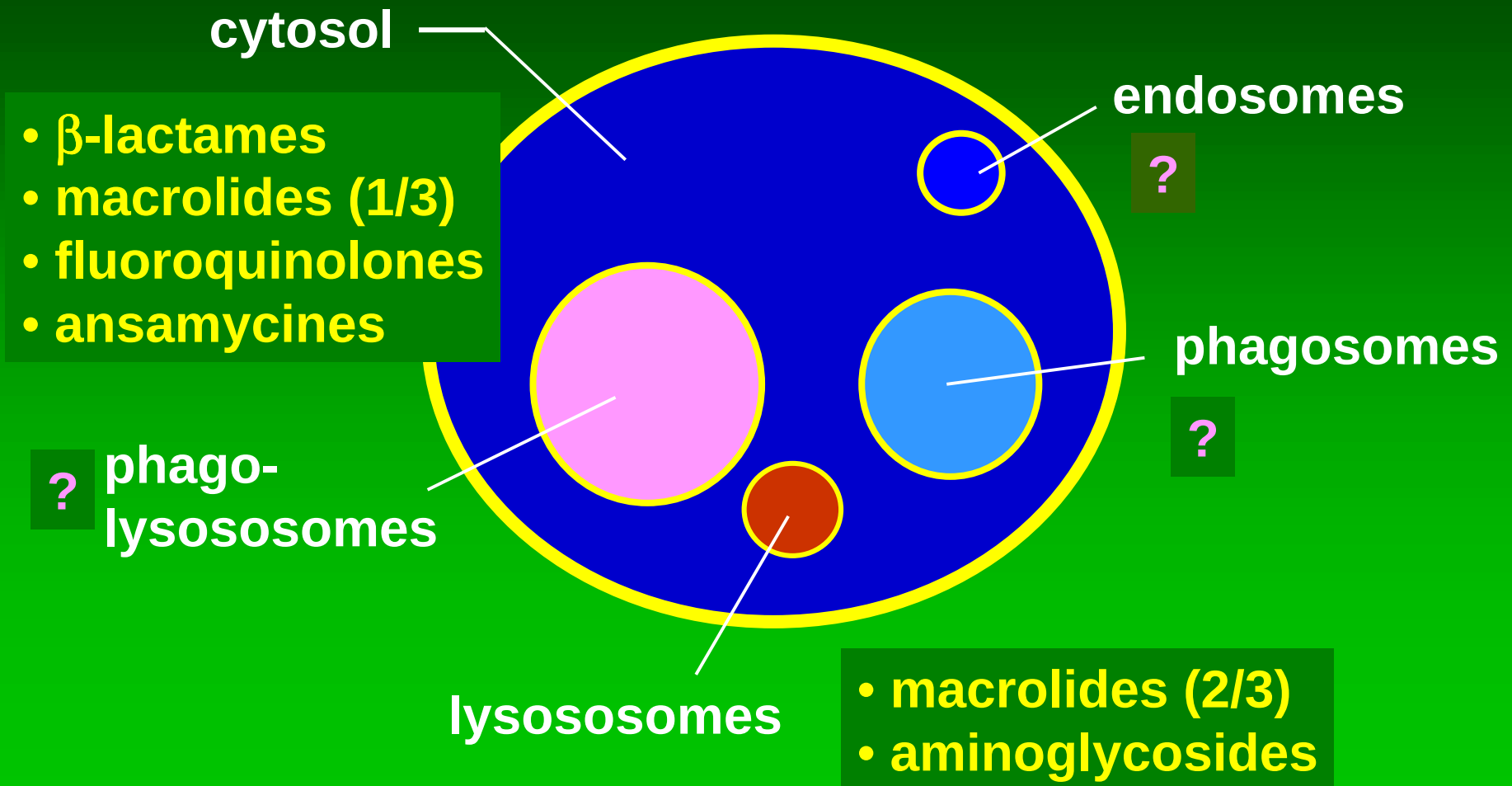
Liaison

- **à la bordure en brosse**
(Just et al, 1977;
Silverblatt & Kuhen, 1979)
- **aux phospholipides acides**
(Humes et al, 1983)
- **à la mégaline**
(Moeströper et al., 1995)



Giuliano *et al.*, J. Pharm. Exp. Ther., 1986

Quelle est la localisation (préférentielle) des antibiotiques ?



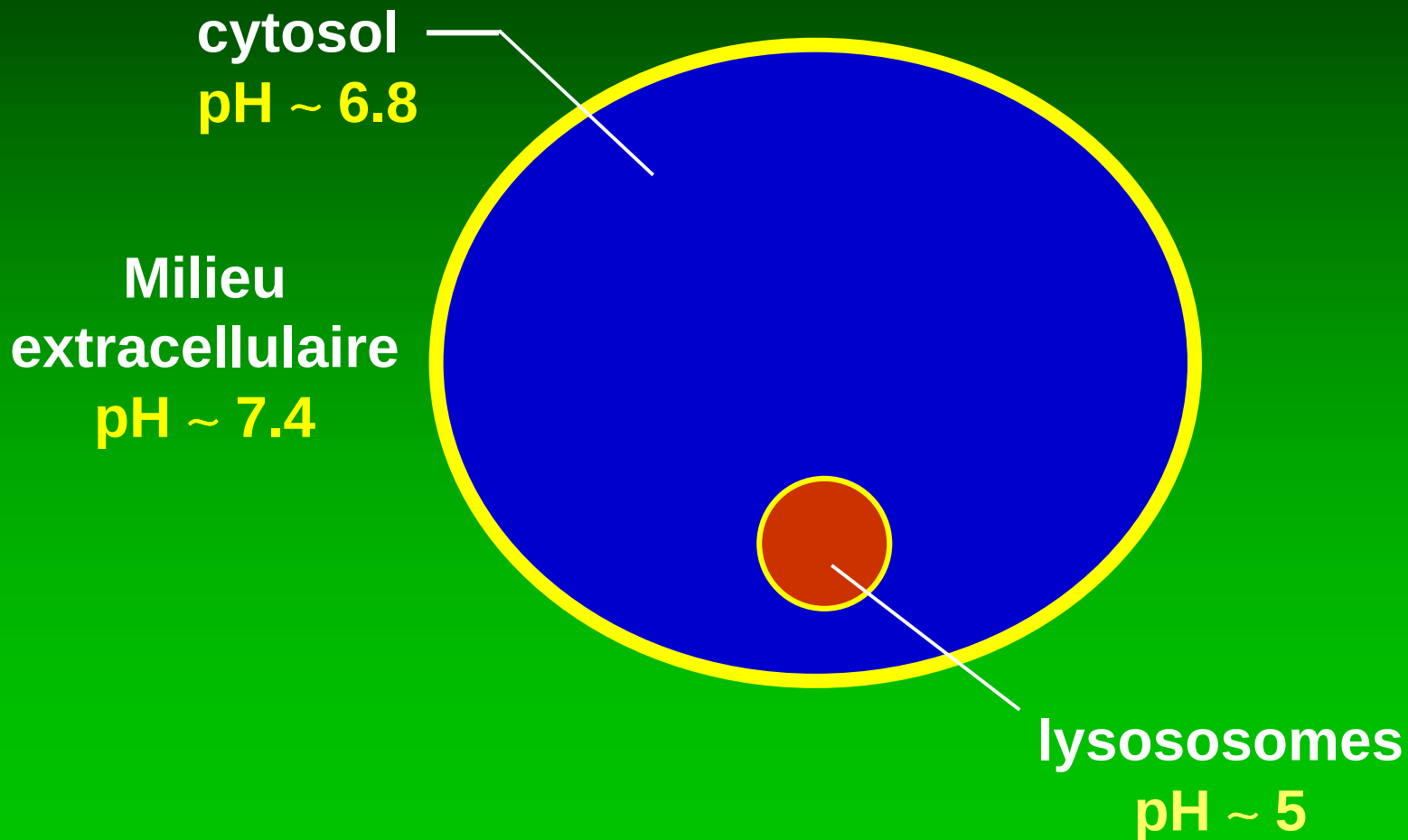
Quel est le niveau d'accumulation des antibiotiques ?

- beta-lactames: $\leq 1x$
- aminoglycosides: <1 to $2 x$
- ansamycines: $2-3 x$
- tétracyclines: $2-4 x$
- fluoroquinolones: $5 - 20 x$
- macrolides: 4 to $> 100 x$ *
- glycopeptides: 1 to $400 x$!! **

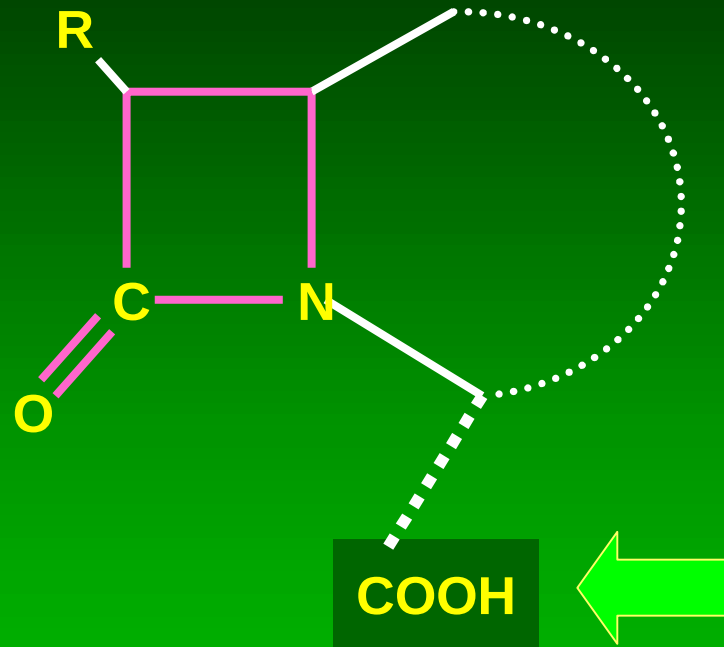
* azithromycin, ketolides

** LY 333328

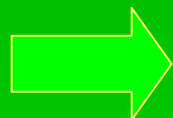
Comprenons-nous les raisons de ces accumulations et localisations différentes ?



Pourquoi les β -lactames ne s'accumulent-elles pas dans les cellules ?

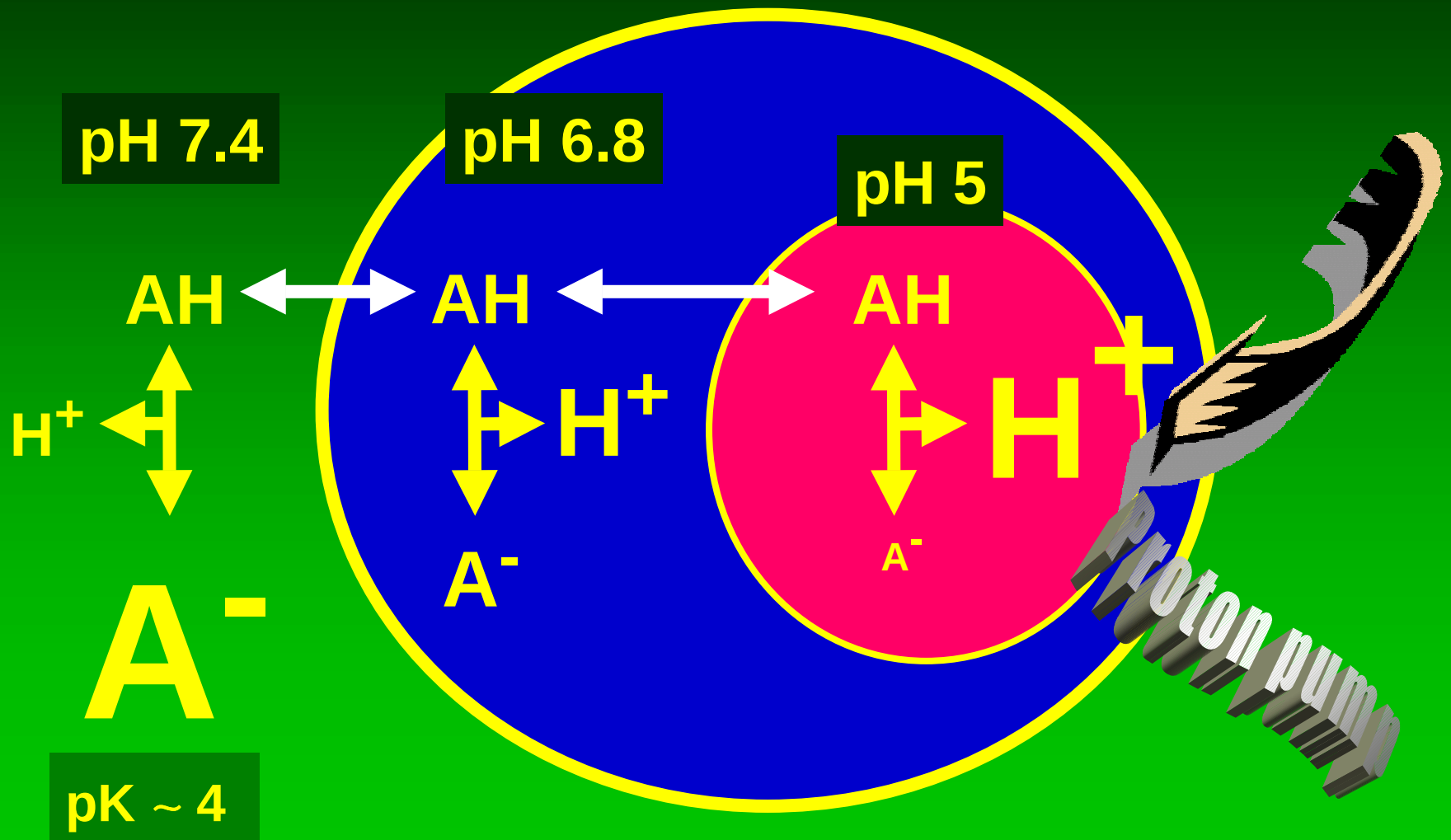


Toutes les β -lactames ont (et doivent avoir) une fonction carboxylique libre (ou une fonction acide [électron-donneuse] équivalente) à distance appropriée du lien C — N du **cycle β -lactame**

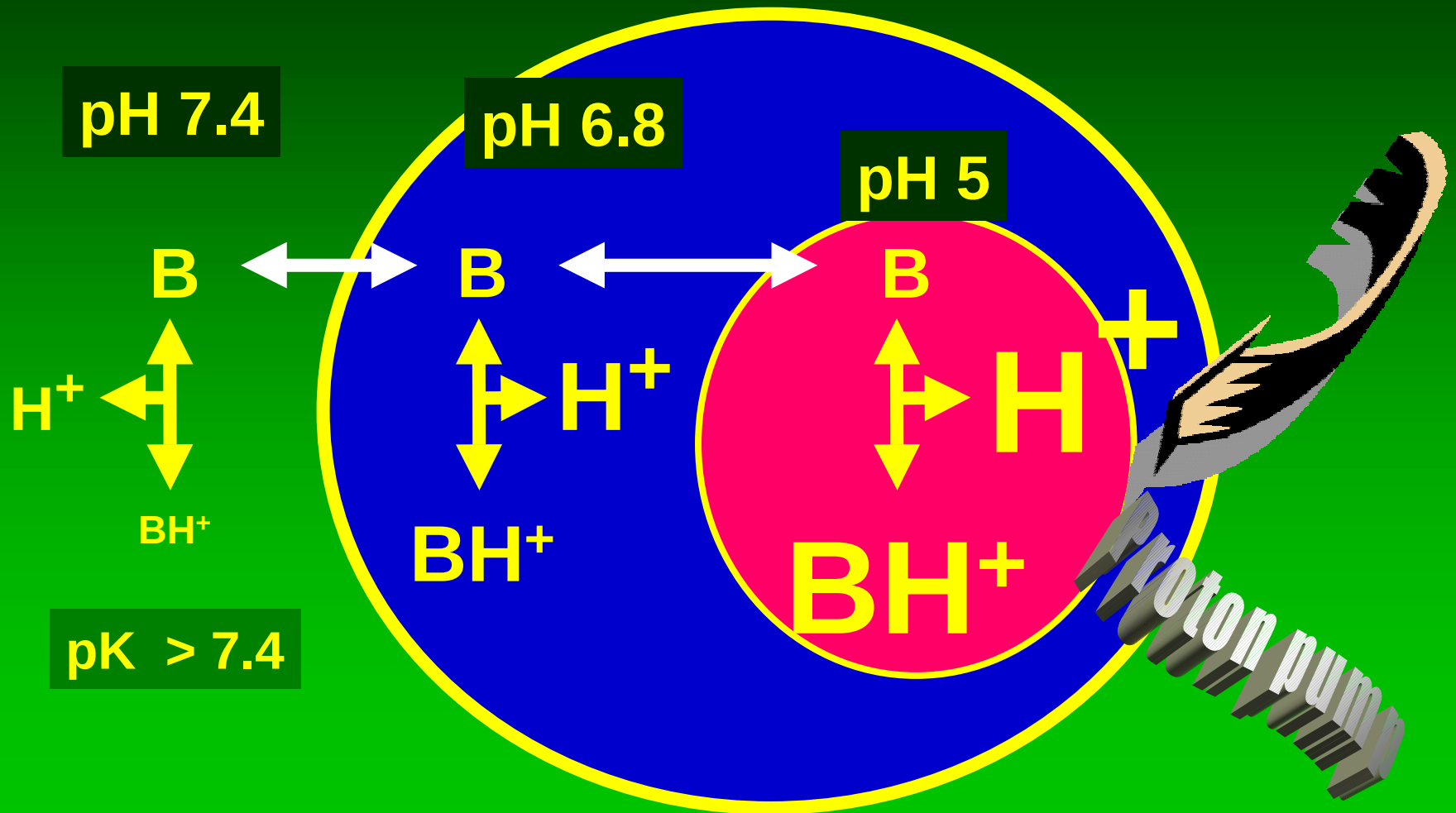


Ce sont donc des acides faibles

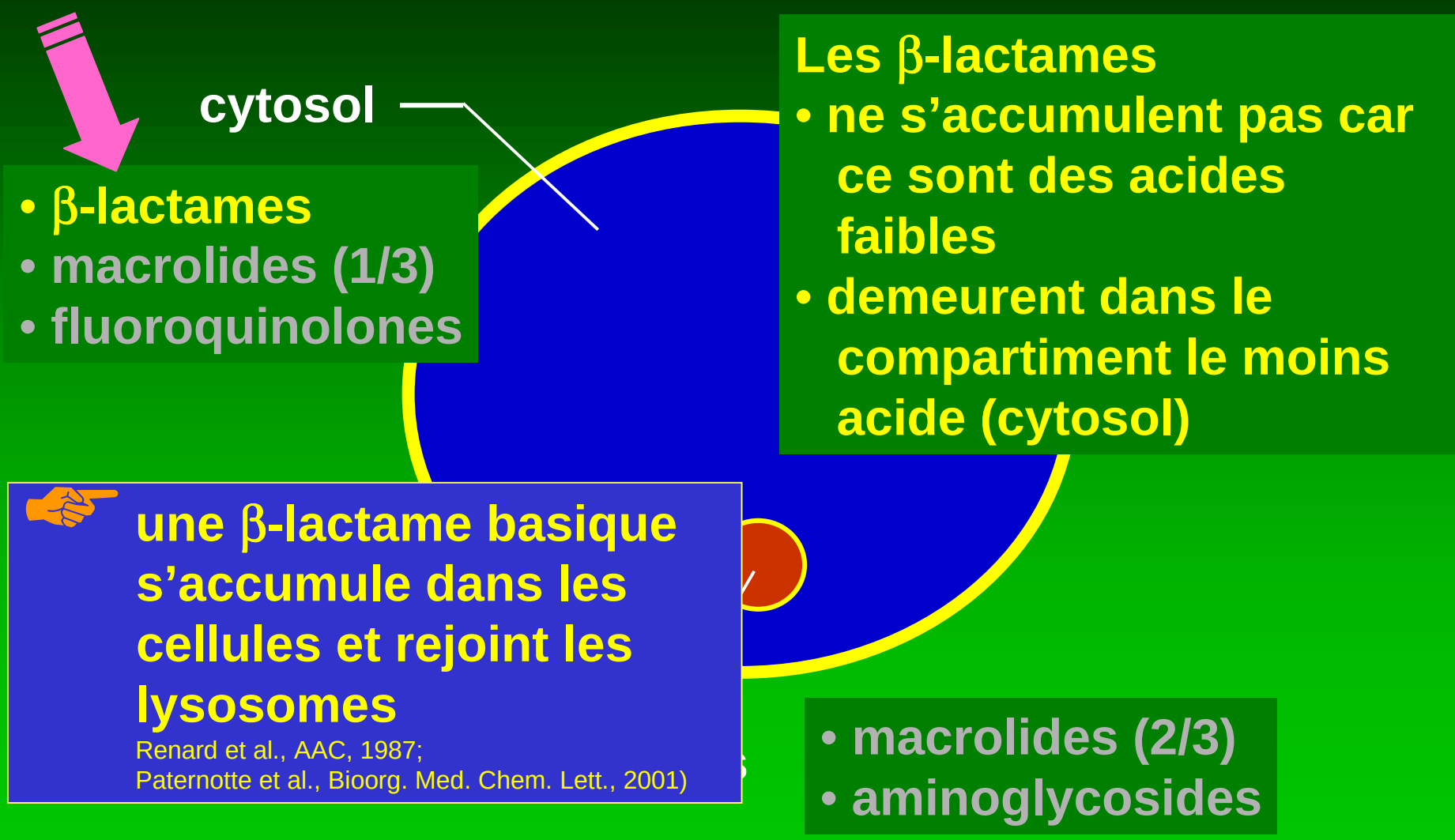
Les β -lactames sont l'objet d'un processus de diffusion / ségrégation négative



Inversément, les macrolides (bases faibles)
sont l'objet d'un processus de
diffusion / ségrégation positive



Que comprenons-nous ?



cytosol

- **β -lactames**
- macrolides (1/3)
- fluoroquinolones

Les β -lactames

- ne s'accumulent pas car ce sont des acides faibles
- demeurent dans le compartiment le moins acide (cytosol)



une β -lactame basique s'accumule dans les cellules et rejoint les lysosomes

Renard et al., AAC, 1987;
Paternotte et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2001)

- macrolides (2/3)
- aminoglycosides

Que comprenons-nous ?

cytosol

- 
- **β -lactames**
 - **macrolides (1/3)**
 - **fluoroquinolones**

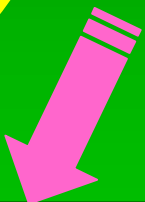
Les macrolides

- s'accumulent car ce sont des bases faibles
- s'accumulent préférentiellement dans le compartiment le plus acide (lysosomes)



la monensine (un H^+ ionophore) annule et le pH extracell. acide diminue l'accumulation des **macrolides**

Carlier et al., JAC, 1987;
Tyteca et al., EJCB, 2001

- 
- **macrolides (2/3)**
 - **aminoglycosides**

Que comprenons-nous ?

cytosol

- β -lactames
- macrolides (1/3)
- fluoroquinolones

Les aminoglycosides

- ne pénètrent de façon importante que par endocytose
- sont confinés au système endosomal et lysosomal



l'accumulation lysosomiale et la protonation des AG induit une phospholipidose (annulée par un polyanion [ac. Poly-asp.]

Kishore et al., JPET 255:867-874, 1990;
Mingeot & Tulkens, AAC 43: 1003-1012, 1999

macrolides (2/3)
aminoglycosides

Que comprenons-nous ?

cytosol

- β -lactame
- macrolides (1/3)
- **fluoroquinolones**

Je ne comprends pas
l'accumulation des
fluoroquinolones ...

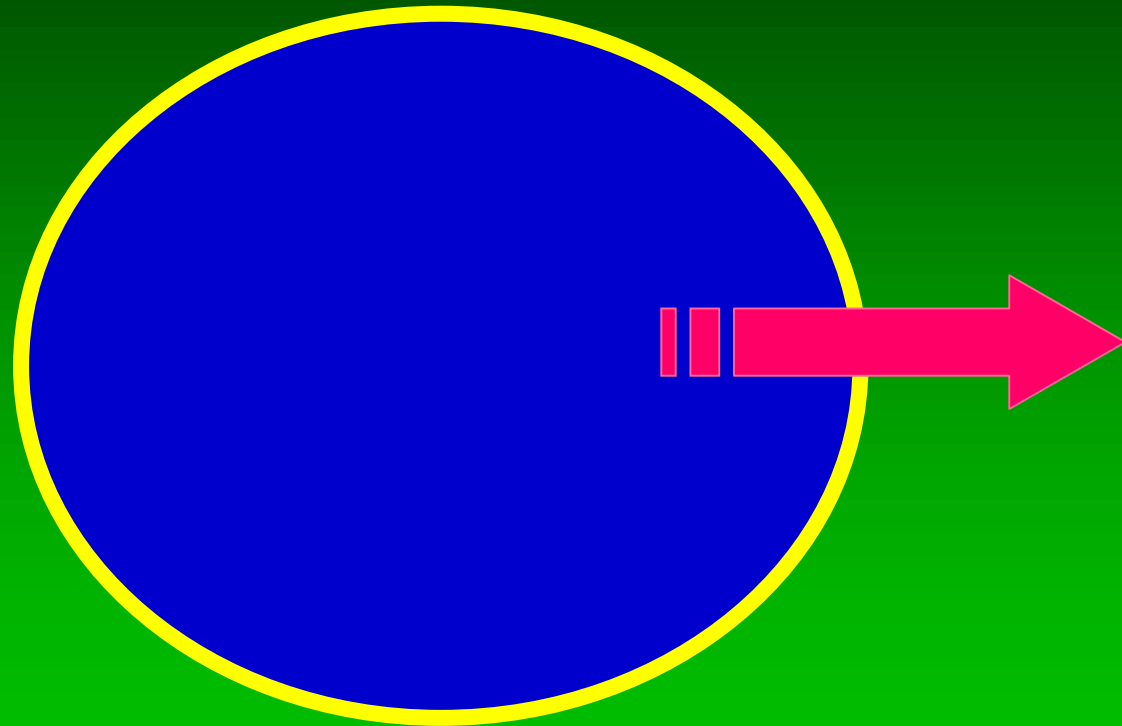


péfloxacine

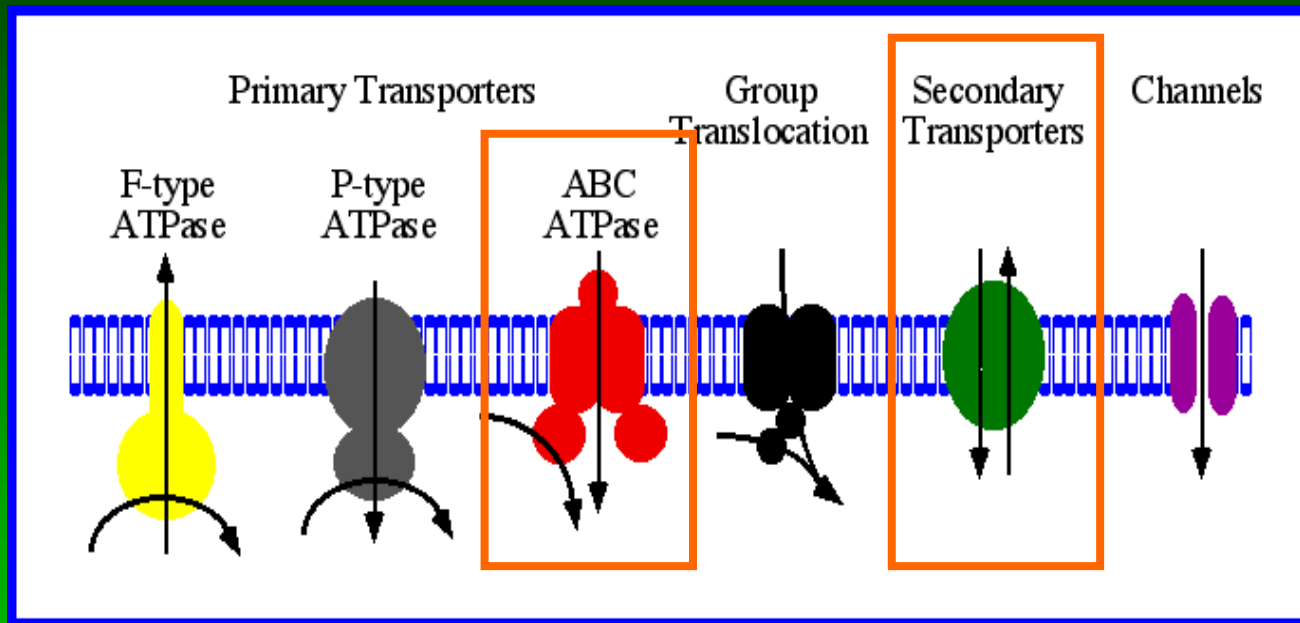
ribosomes

- macrolides (2/3)
- aminoglycosides

Antibiotics efflux ?



Transporteurs ...



**principaux
transporteurs
de médicaments**

<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/titlepage.html>

Saier, 2000

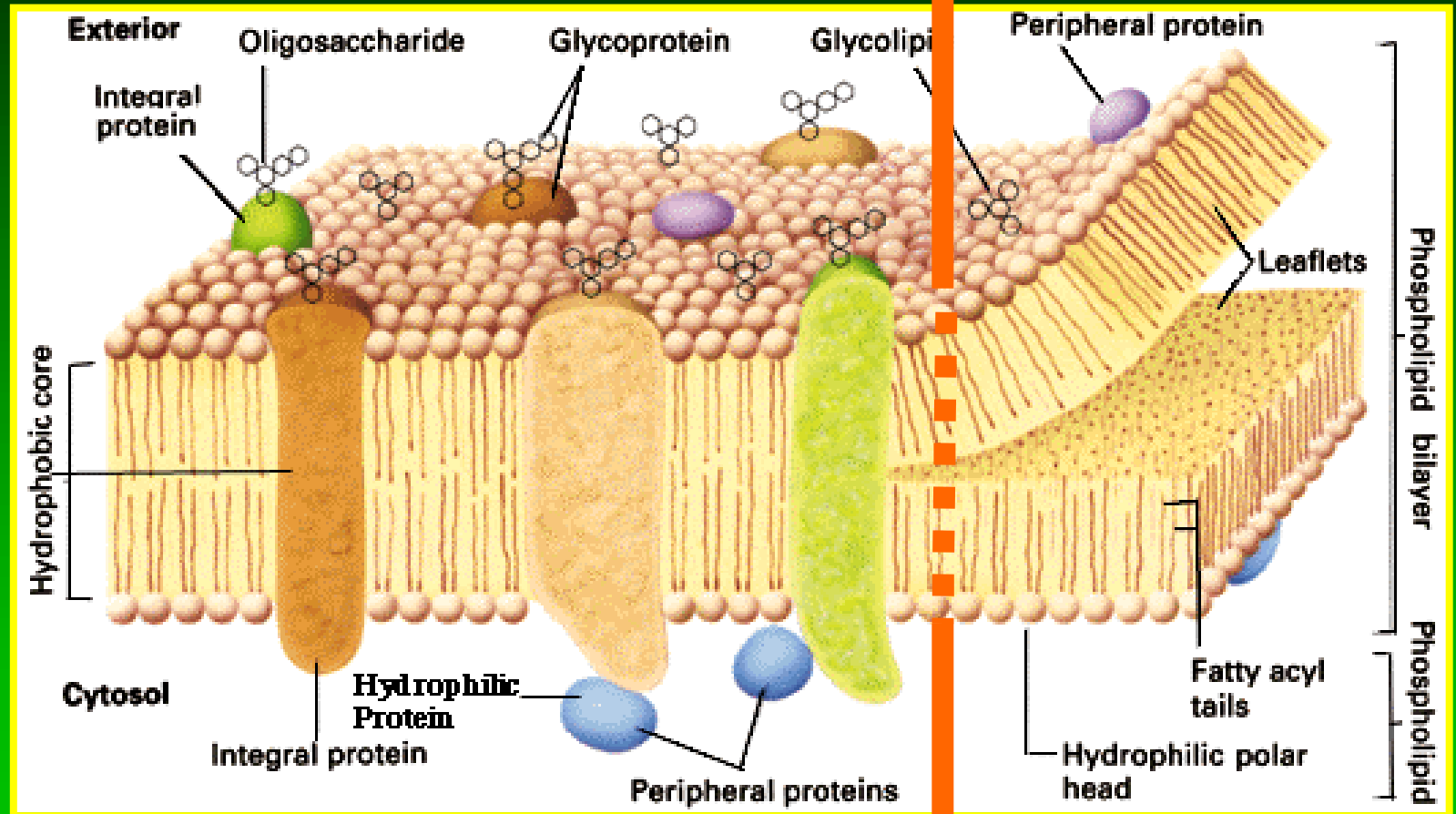
Il y a beaucoup plus que des transporteurs de médicaments ...

Années 90:

- la génomique montre qu'il existe un TRES grand nombre de transporteurs potentiels
- L'analyse protéomique et fonctionnelle montre que tous ces transporteurs reconnaissant des substances pharmacologiquement TRES différentes mais avec un caractère commun:

l'amphiphilie...

Pourquoi des substances amphiphiles ?



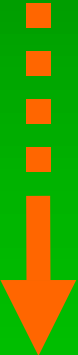
Parce qu'elles passent aisément au travers des membranes...

Pourquoi les médicaments sont-ils des substrats des pompes à efflux ?



La plupart de nos médicaments, si pas tous, ont été sélectionnés ou construits pour être des substances amphiphiles

afin de pénétrer dans les tissus et les cellules



Transporteurs impliqués dans l'efflux des antibiotiques hors des cellules eucaryotes

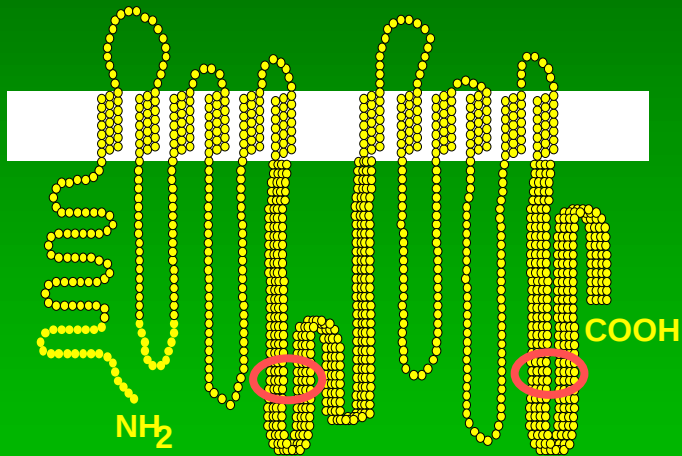
superfamille	transporteur	substrat physiolog.	antibiotiques
ABC	MDR1	phospholipides	fluoroquinolones macrolides β -lactames tétracyclines streptogramines
	MRP1	phospholipides leukotriènes conjugués	fluroquinolones macrolides ansamycines
	MRP2	conjugués	fluoroquinolones β -lactames
MFS	NPT1	phosphates	β -lactames
OAT	OATP1	sels biliaires stéroïdes	β -lactames

Transporteurs d'antibiotiques les plus fréquents chez les eucaryotes (1/2)

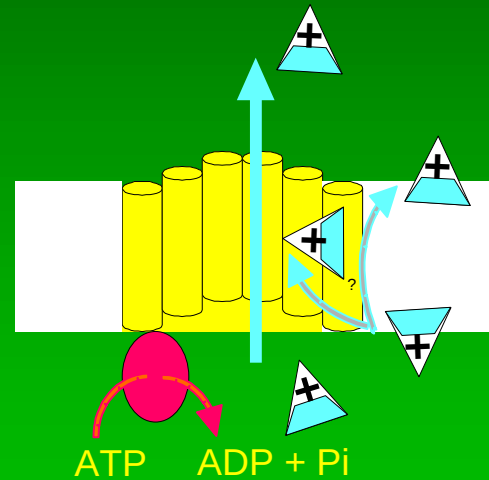


Multiple Drug Resistance (MDR, = PgP)

TOPOLOGIE



MECHANISME



ANTIBIOTIQUES

-  tétracyclines
fluoroquinolones
érythromycine
lincosamides
rifampicine
-  chloramphénicol
-  aminoglycosides

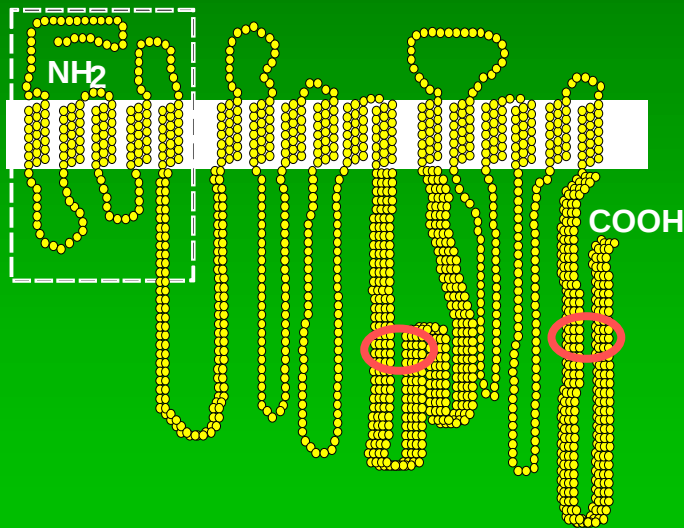
Van Bambeke et al., Biochem. Pharmacol. 2000

Transporteurs d'antibiotiques les plus fréquents chez les eucaryotes (2/2)

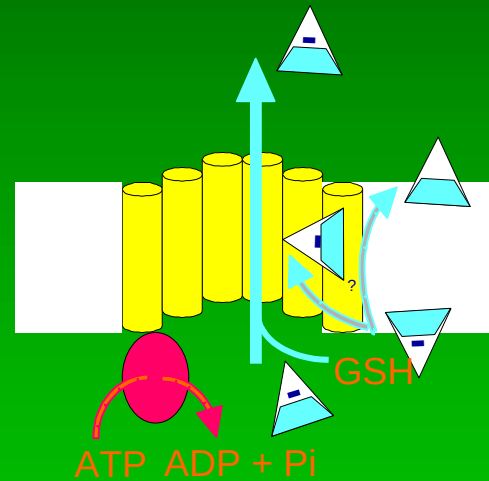


Multidrug Resistance Proteins (MRP)

TOPOLOGIE



MECHANISME



ANTIBIOTIQUES



fluoroquinolones



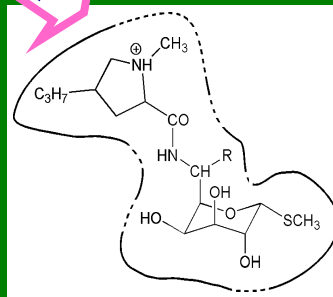
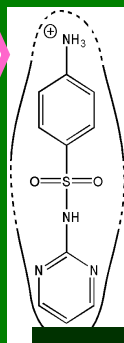
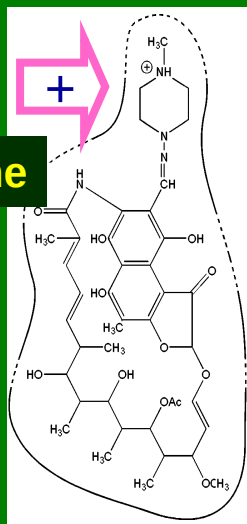
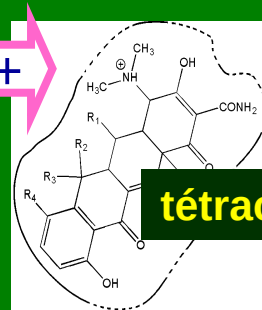
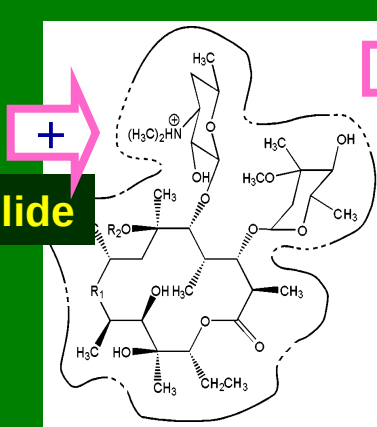
tétracyclines
macrolides

Van Bambeke et al., Biochem. Pharmacol. 2000

Les antibiotiques sont des substrats amphiphiles



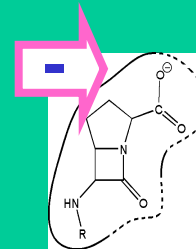
amphiphiles cationiques



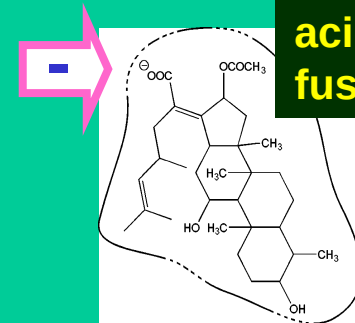
— hydrophobe
- - - polaire



amphiphiles anioniques

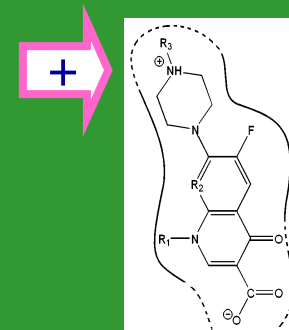


β-lactame



acide fusidique

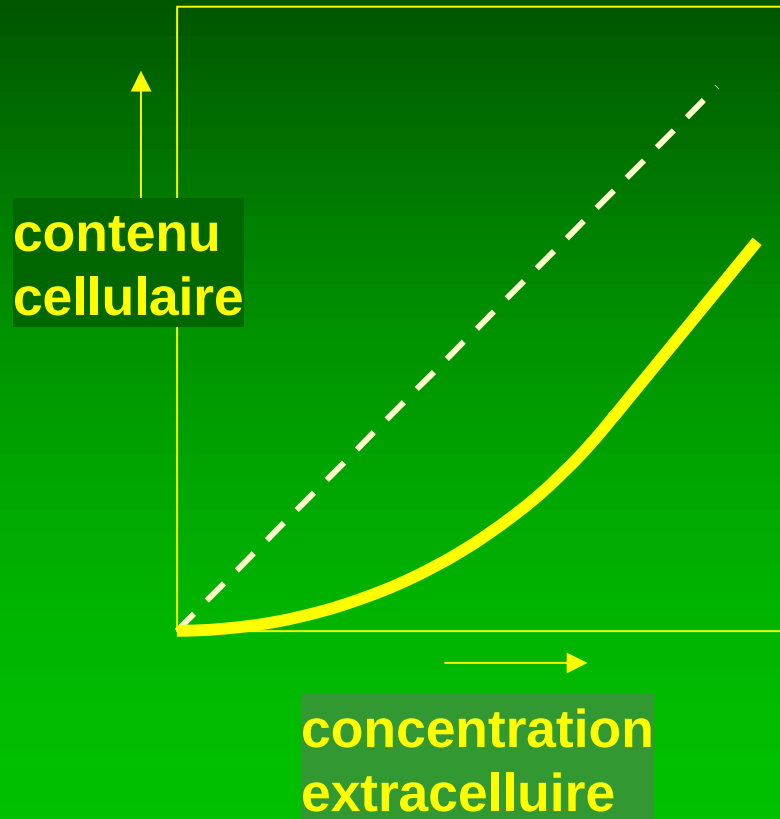
amphiphile zwitterionique



fluoroquinolone

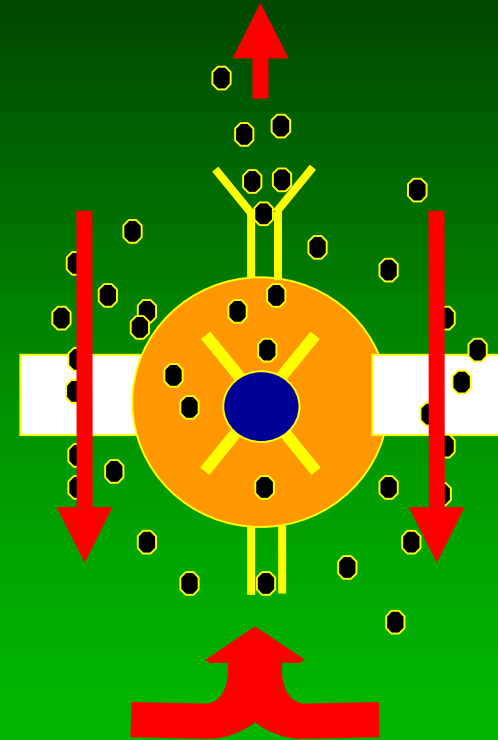
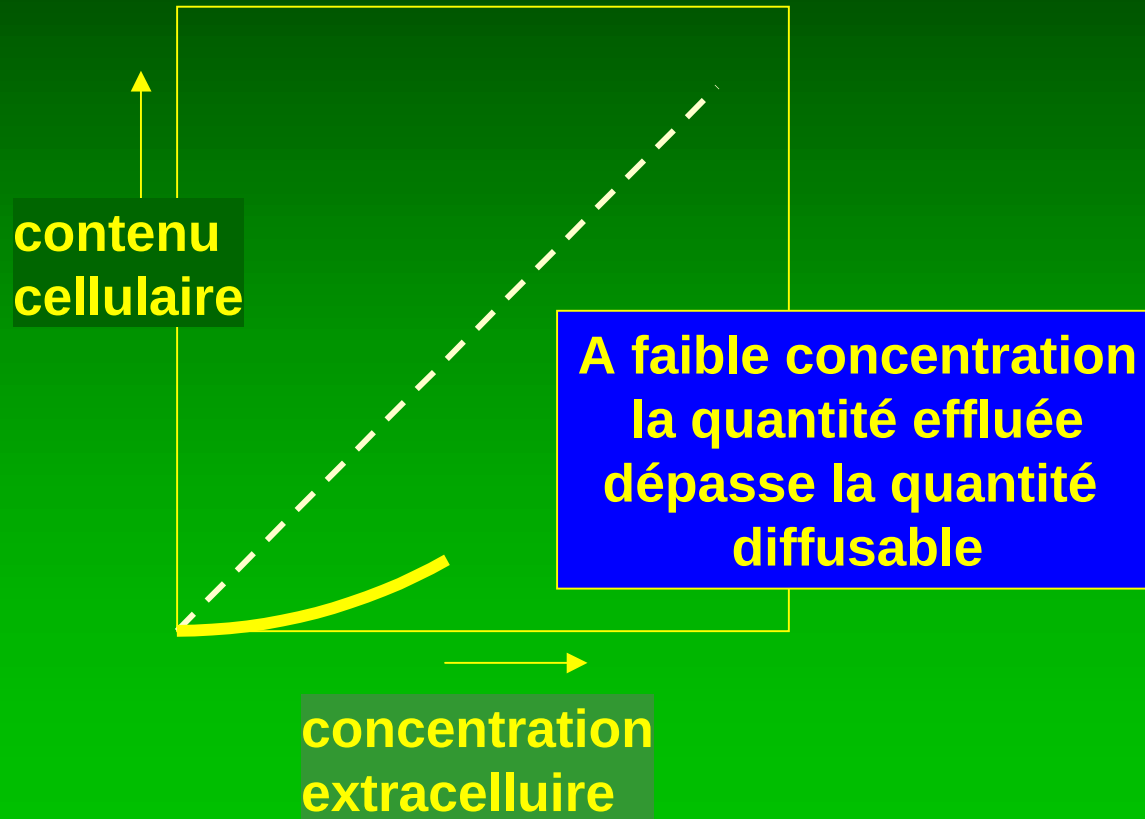
Mettre l'efflux en évidence ...

Cinétique d'accumulation non-linéaire ...

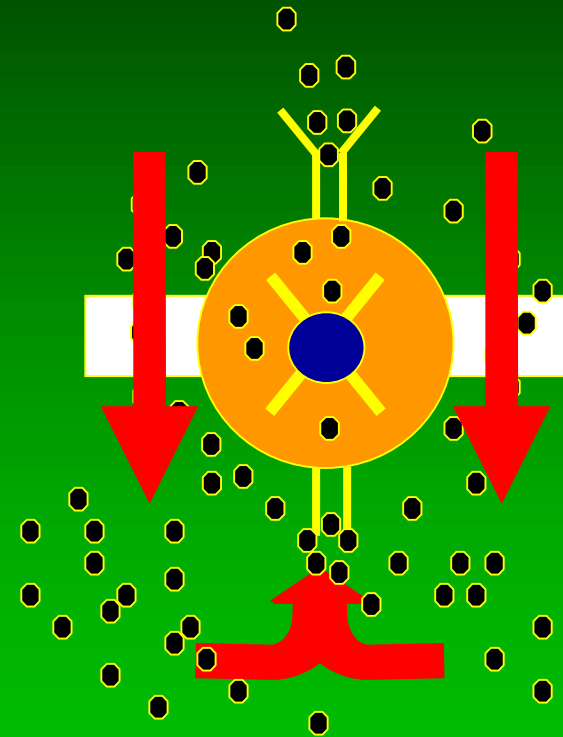
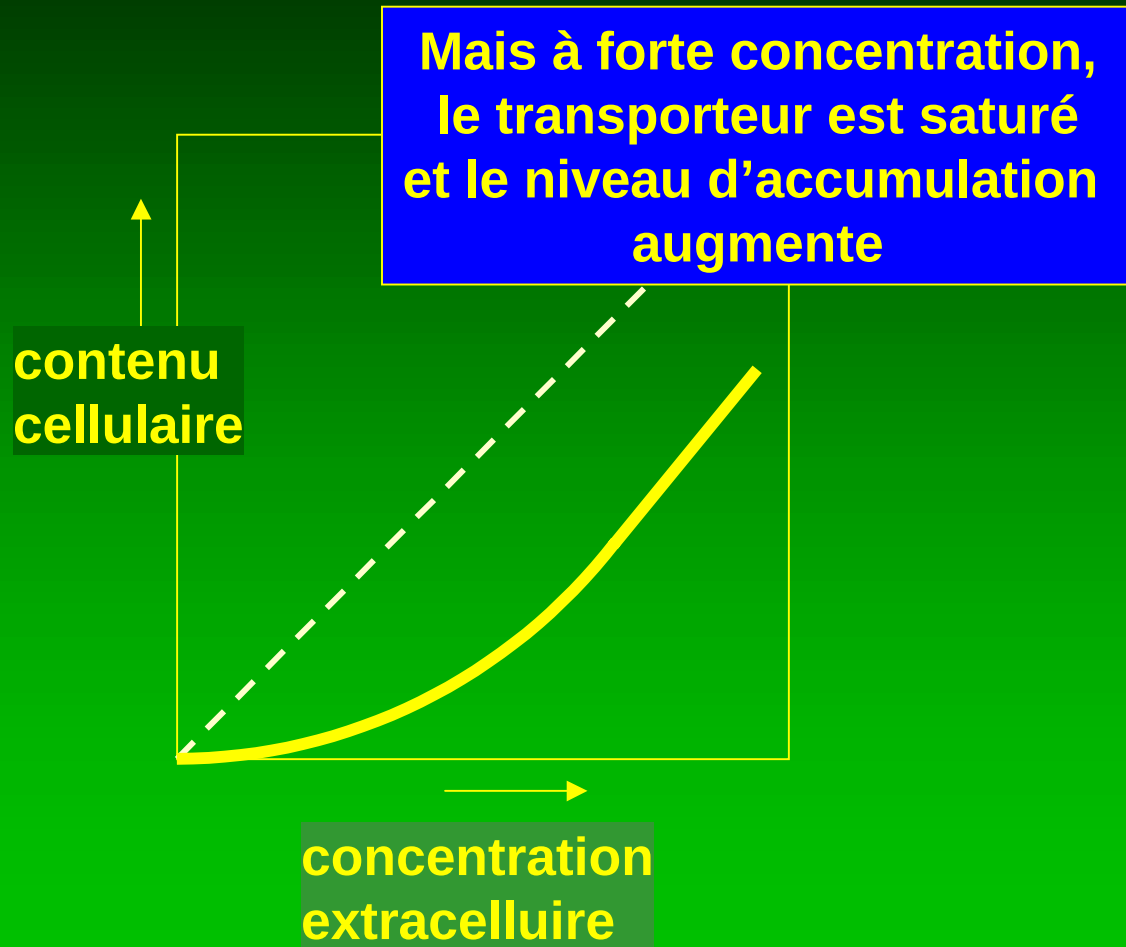


Une accumulation dont le niveau croît avec la concentration peut être l'indice d'un mécanisme d'efflux

Mettre l'efflux en évidence ...



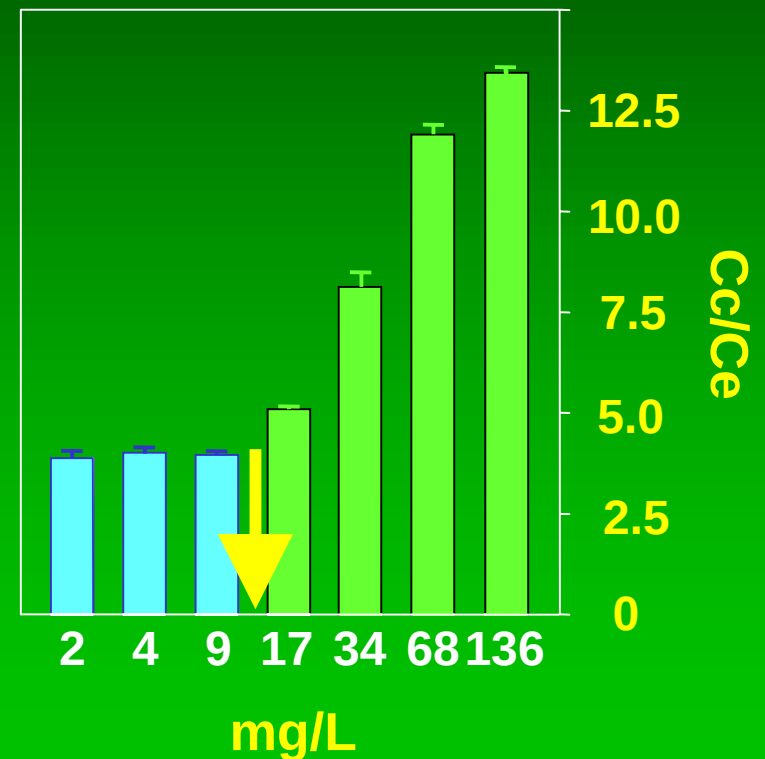
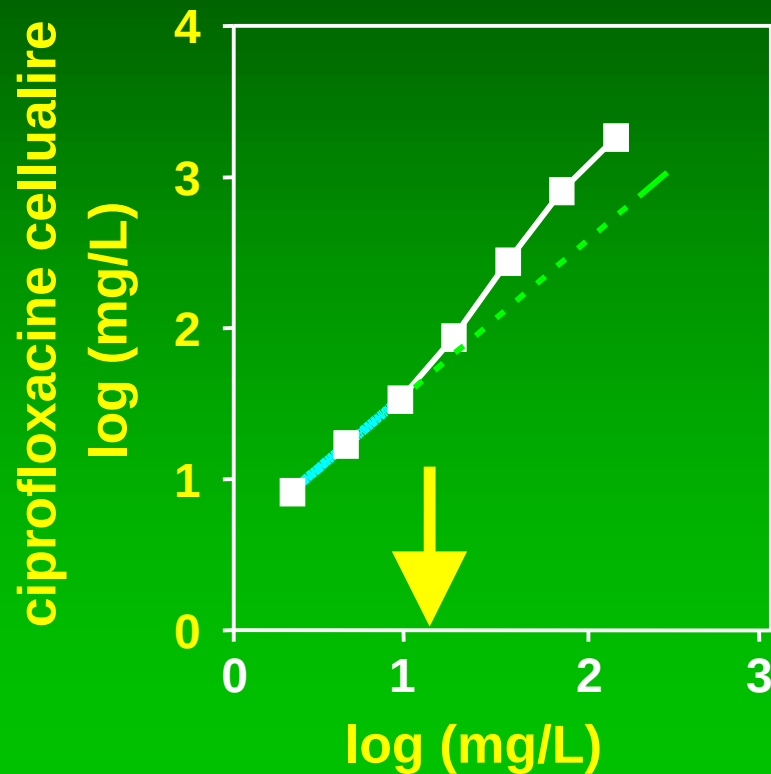
Mettre l'efflux en évidence ...



Efflux de la ciprofloxacine

L'accumulation de la ciprofloxacine augmente avec sa concentration extracellulaire

Michot et al., ICAAC 2000



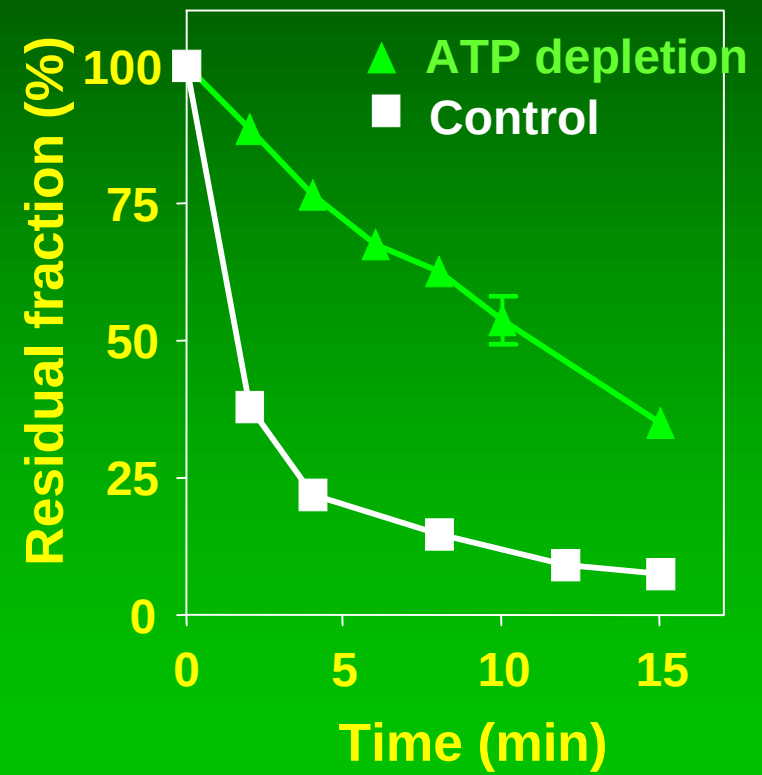
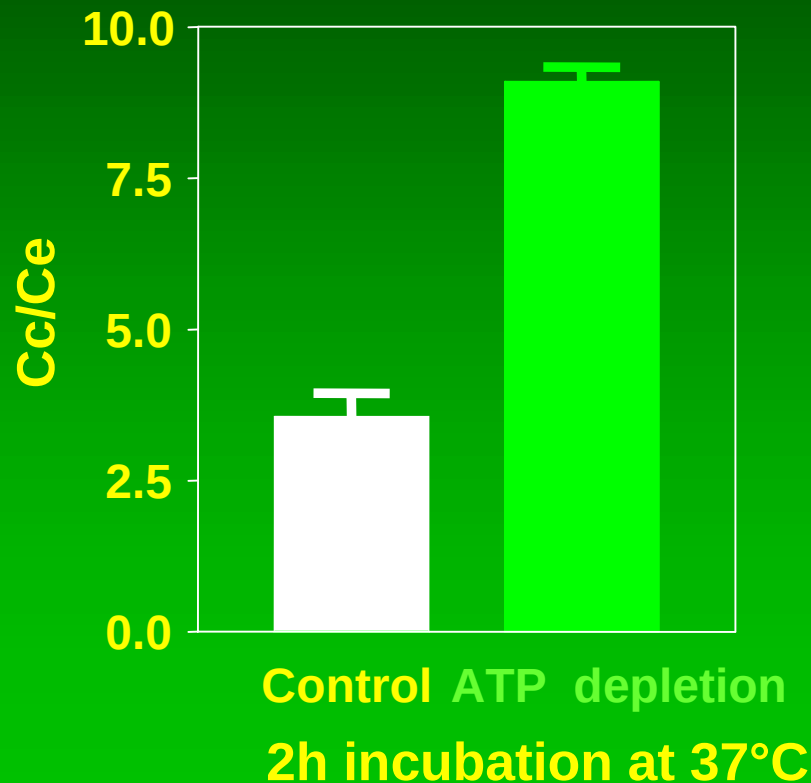
[ciprofloxacine] extracellulaire - incubation de 2h à 37°C

L'accumulation et l'efflux de la ciprofloxacine sont ATP-dépendant

accumulation

efflux

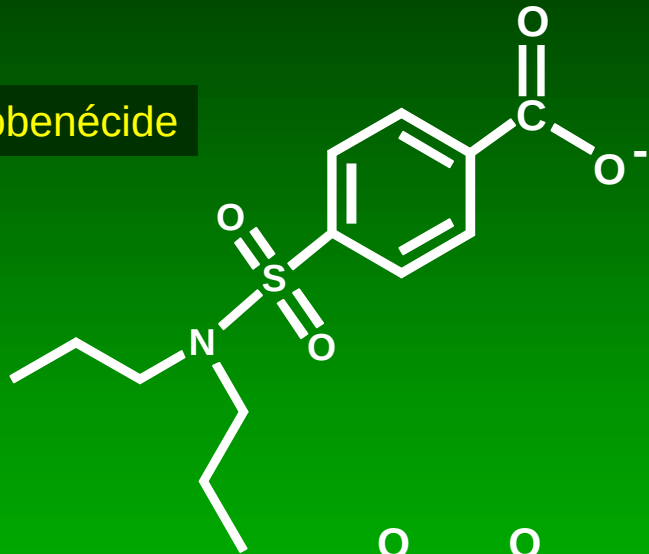
$C_e = 50 \mu\text{M}$ (17 $\mu\text{g/ml}$)



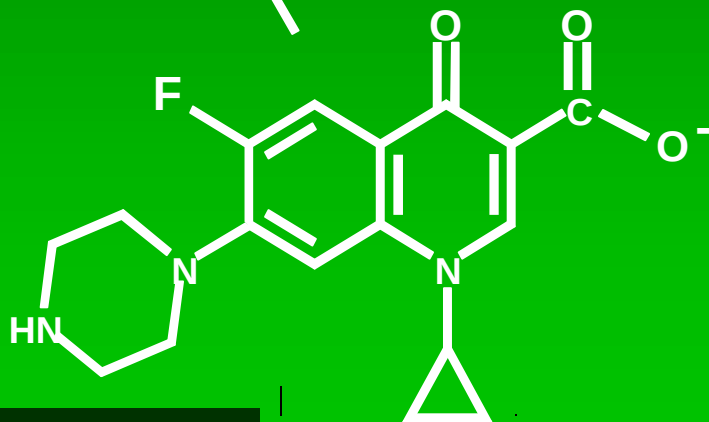
Michot et al., ICAAC 2000

Le probénécide, un inhibiteur d'efflux *, augmente l'accumulation de la ciprofloxacine ...

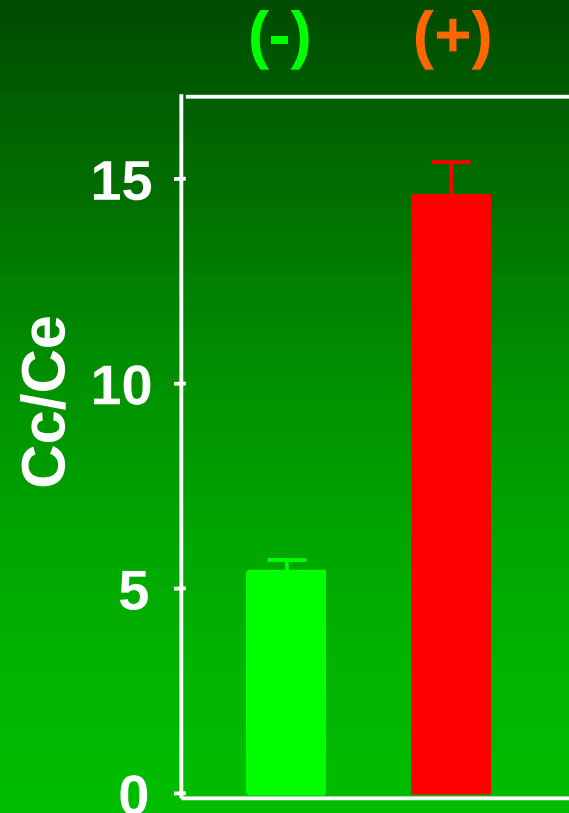
probenécide



ciprofloxacine



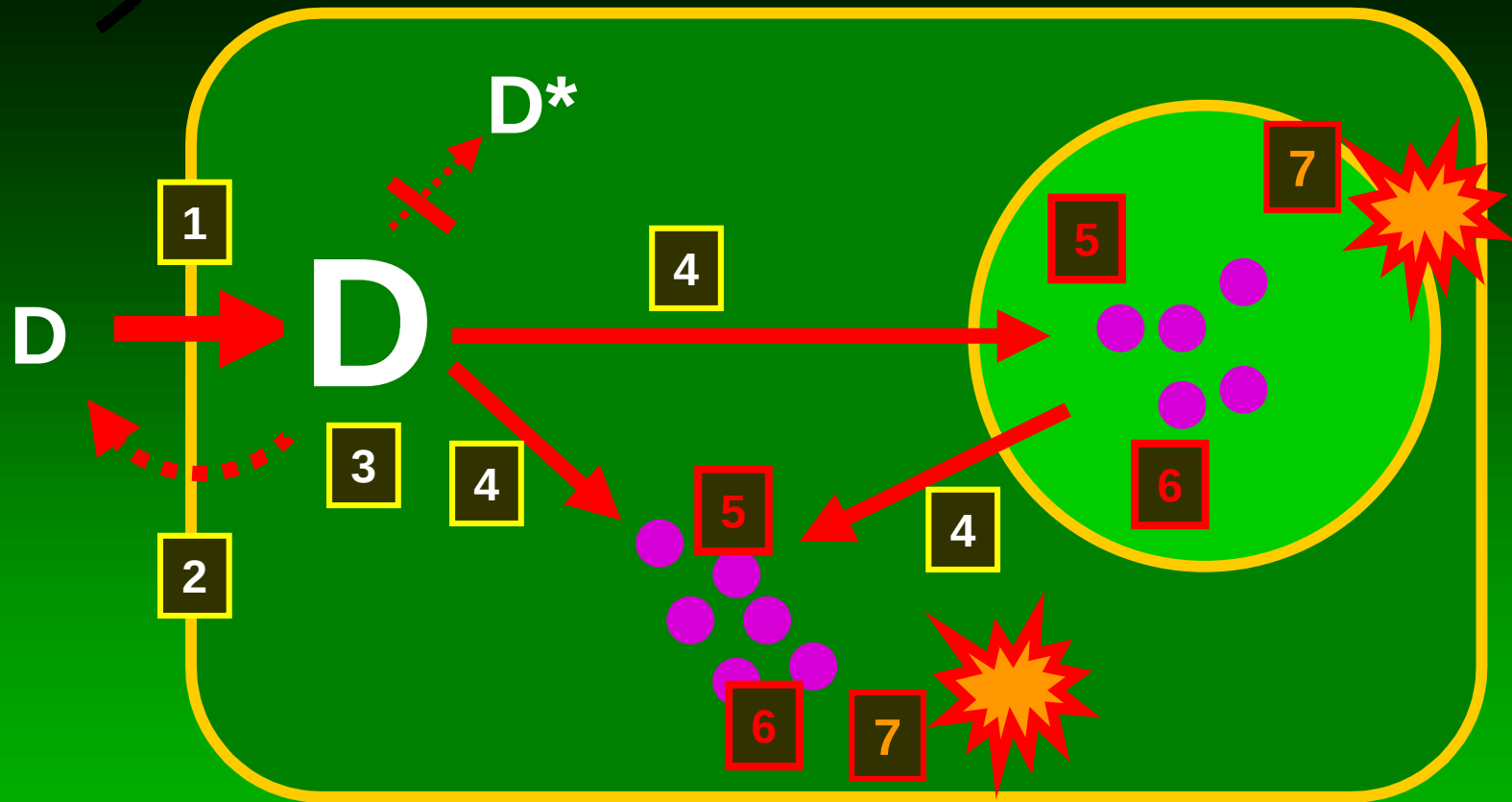
Probénécide 5 mM **



* Cao et al., 1992

** Michot et al., ICAAC 2000

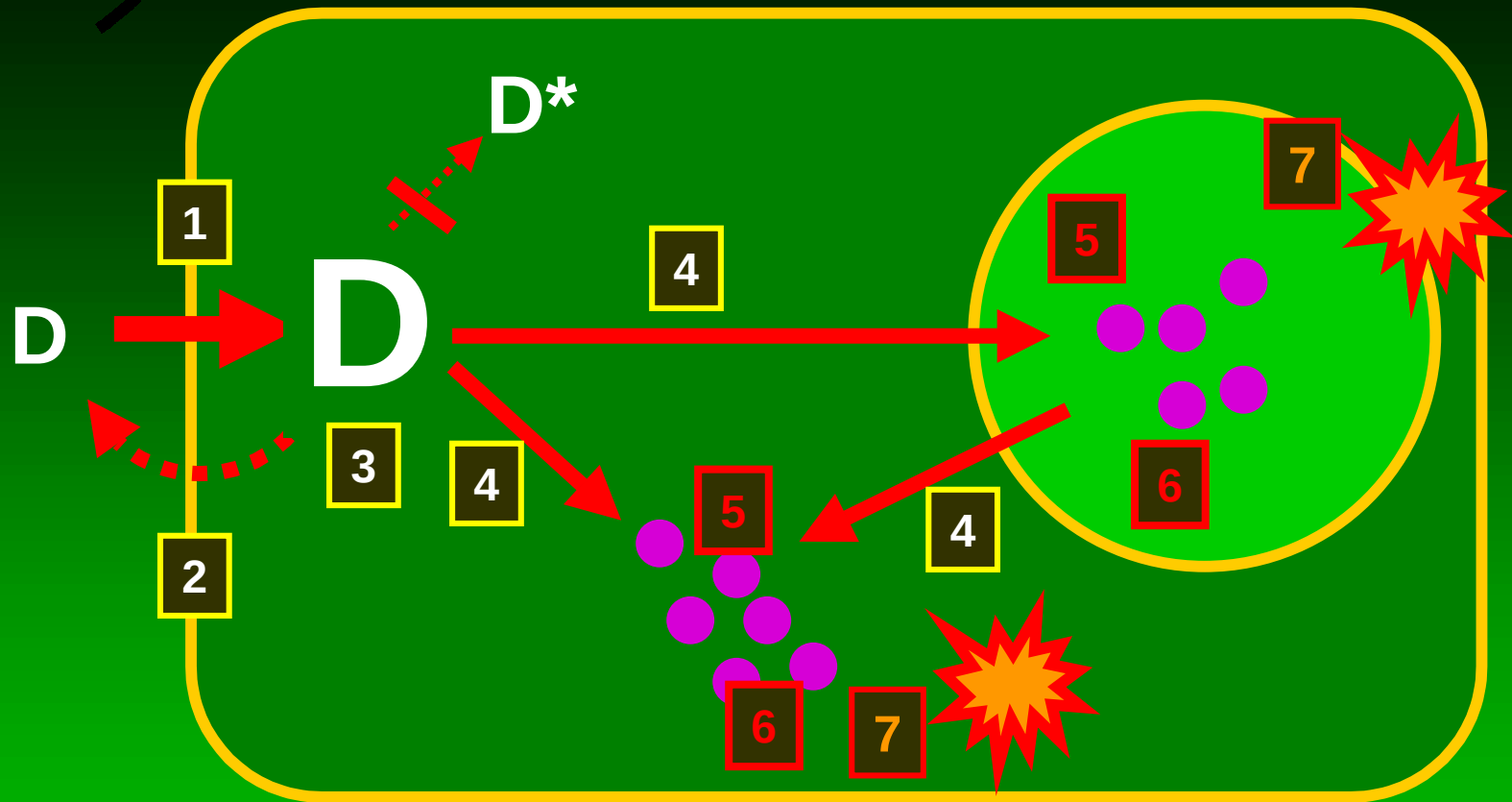
Les sept piliers de l'activité intracellulaire des antibiotiques ?



1. pénétration
2. absence d'efflux
3. accumulation
4. biodisponibil. subcell.

- 5. expression d'activité
- 6. pharmacodynamie
- 7. coopération avec les défenses de l'hôte

les vrais piliers des antibiotiques intracellulaires



M.P. Mingeot, D. Tyteca

J.M. Michot, C. Seral

M.B. Carlier, A. Zenebergh

Y.Chanteux, M. Bouvier d'Yvoire

C. Renard, H. Fan, E. Sonveaux
S. Carryn, F. Van Bambeke,
and ISAP...

B. Scorneaux, Y. Ouadrhiri,
I. Paternotte,