



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

T H E S E

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 28 juin 2012

par

Mlle SAURAT Dominique

Elève de l'Ecole de Santé des Armées

Née le 24 novembre 1989

à Cluses (74)

**Etude *in vitro* du métabolisme d'un inhibiteur du transporteur ABCG2 : le MBLI-98
Intérêt de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem**

JURY

Mr GUITTON Jérôme, Professeur

Mme PAYEN Léa, Maître de conférences

Mr DI PIETRO Attilio, Directeur de recherches

Mr MULLOT Jean-Ulrich, Pharmacien en Chef

Mr PREVOSTO Jean-Michel, Pharmacien en Chef

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 28 juin 2012

par

Mlle SAURAT Dominique

Elève de l'Ecole de Santé des Armées

Née le 24 novembre 1989

à Cluses (74)

**Etude *in vitro* du métabolisme d'un inhibiteur du transporteur ABCG2 : le MBLI-98
Intérêt de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem**

JURY

Mr GUITTON Jérôme, Professeur

Mme PAYEN Léa, Maître de conférences

Mr DI PIETRO Attilio, Directeur de recherches

Mr MULLOT Jean-Ulrich, Pharmacien en Chef

Mr PREVOSTO Jean-Michel, Pharmacien en Chef

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université	M. François-Noël GILLY
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. Germain GILLET
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe LALLE

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : M. Jérôme ETIENNE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directeur : M. François-Noël GILLY
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directeur : M. Denis BOURGEOIS
Institut des Techniques de Réadaptation	Directeur : M. Yves MATILLON
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. Pierre FARGE

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Claude COLLIGNON
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)	Directeur : M. Pascal FOURNIER
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directrice : Mme Véronique MAUME-DESCHAMPS
I.U.F.M.	Directeur : M. Régis BERNARD

MAI 2012

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon

Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA

**Directeurs Adjointes : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS
Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD**

Directrice Administrative : Madame P. SILVEIRA

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

• **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Jean-François SABOT (Pr)
Monsieur Alain BANNIER (MCU)
Monsieur Philippe BERNARD (MCU)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Raphaël TERREUX (MCU – HDR)
Monsieur Pierre TOULHOAT (PAST)

• **PHARMACIE GALENIQUE - COSMETOLOGIE**

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Madame Joëlle BARDON (MCU - HDR)
Madame Valérie BERTHOLLE (MCU)
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU - HDR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU)
Monsieur Fabrice PIROT (MCU - PH - HDR)
Madame Karine PORET-PADOIS (MCU)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU - HDR)

• **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Monsieur Henri DECHAUD ((MCU - PH - HDR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

• **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU)

• **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAQUI MOUMJID (MCU)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

• **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **HYGIENE, ENVIRONNEMENT ET BIOSECURITE**

Monsieur Dominique TREPO (MCU - PH - HDR)

- **DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)

Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)

Monsieur François COMET (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)

Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)

Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)

Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)

Madame Christelle MARMINON (MCU)

Madame Sylvie RADIX (MCU - HDR)

Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Roland BARRET (Pr)

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)

Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Anne-Emmanuelle DE BETTIGNIES (MCU)

Madame Isabelle KERZAON (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Madame Christelle MOUCHOUX (AHU)

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)

Madame Catherine RIOUFOL (MCU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Madame Léa PAYEN (MCU - HDR)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (AHU)
- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
Monsieur Bernard RENAUD (Pr)
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Jean-Marie VAUGEOIS (Pr)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Madame Bernadette ASTIER (MCU - HDR)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL-CHATELAIN (MCU - HDR)
Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Paul ROUZAIRE (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)
- **MICROBIOLOGIE et MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)
Madame Emilie FROBERT (AHU)
Madame Marie-Andrée MAZOYER (MCU - HDR)
Mme Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
Madame Anne-Françoise PETAVY (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU)
Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (Pr)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Madame Marie VILLEDIEU (MCU)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU, chaire d'excellence)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)
Madame Valérie VOIRON (PAST)

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Madame Natalie CARTISER	85ème section
Monsieur Waël ZEINYEH	86ème section
Monsieur Antony ZOROPOGUI	87ème section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

ECOLE DE SANTE DES ARMEES

A Monsieur le Médecin Général Inspecteur J-L. PERRET

Professeur Agrégé du Val de Grâce

Chevalier de la Légion d'Honneur

Officier de l'Ordre National du Mérite

Commandant l'Ecole de Santé des Armées

A Monsieur le Médecin Chef des Services J-P. CHEVREAU

Chevalier de la Légion d'Honneur

Officier de l'Ordre National du Mérite

Commandant en second l'Ecole de Santé des Armées

A Monsieur le Médecin Chef des Services J-B. NOTTET

Chevalier de la Légion d'Honneur

Officier de l'Ordre National du Mérite

Directeur des Etudes et de la Formation de l'Ecole de Santé des Armées

A notre Président de thèse et directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Jérôme GUITTON

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury.

Nous avons eu le privilège de recevoir votre enseignement à la faculté.

Vous nous avez témoigné votre confiance en nous proposant ce travail ainsi que tout au long de sa réalisation.

Vos conseils et vos orientations nous ont été précieux.

Votre patience et votre disponibilité nous honorent.

Veillez recevoir l'expression de nos sincères remerciements et de notre profond respect.

Aux membres de notre jury,

Madame le Maître de conférences Léa PAYEN

Vous avez accepté de partager vos connaissances pour juger notre travail.

Votre participation à notre étude nous a été précieuse.

Soyez assurée de l'expression de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Directeur de recherches Attilio DI PETRO

Nous vous remercions d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Soyez assuré de l'expression de notre plus grand respect.

Monsieur le Pharmacien en Chef Jean-Ulrich MULLOT

Vous avez accepté d'apporter vos compétences à la critique de ce travail.

Votre présence parmi les membres du jury nous honore.

Veillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération.

Monsieur le Pharmacien en Chef Jean-Michel PREVOSTO

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Veillez recevoir l'expression de nos sincères remerciements.

A ma famille,

A mes parents, malgré notre différence d'hémisphère (et le décalage horaire !), vous avez toujours su vous montrer présents quand j'en ai eu besoin. Je vous remercie du fond du cœur pour tout l'amour et la confiance que vous me portez.

A mes deux sœurs, Marie-Annick et Agnès, merci pour votre amour et votre soutien.

A mes grands-parents maternels et paternels, à Denise, à mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines, merci pour votre amour, votre gentillesse et vos encouragements.

A mon amie d'enfance Elsa et à mes amies du lycée, Anaïs, Diane, Kim, merci pour les moments de complicité que nous partageons chaque fois que nous avons l'occasion de nous retrouver. Nos chemins prennent peu à peu des directions différentes mais j'ose espérer que nous resterons toujours en contact. (L) (L) (L)

A ma famille de la boîte,

A ma coth et cobiz' Sarah, nos soirées, nos voyages, nos ronéos, nos fous rires, nos questions existentielles, nos conversations sans fin, nos salades de fruits, nos chansons, nos bougies parfumées et nos coupes de champagne auront su pimenter ces cinq années passées à la boîte ! Mille mercis pour tout ce que tu as pu faire pour moi. Merci d'être là !

A ma marraine Elodie, merci pour tes précieux conseils, ta disponibilité, ton dynamisme et ton optimisme !

A ma marraine d'honneur Lucie, merci pour tes encouragements et ta gentillesse.

A ma bizute Charlotte, mon petit-bizuth Antoine, Héloïse, Béatrice, Wilfried, Laetitia et Lucie, merci pour la bonne ambiance de nos restos ! Sachez garder cet esprit "famille" qui nous plaît tant et continuez à profiter de vos années à la boîte (sans oublier de valider celles de la fac) !

Aux autres épauettes vertes,

Aux potardes de ma promo, Alexandra et Alice, merci pour votre soutien, vos conseils et votre esprit cohés'. J'espère qu'après le Val, nos futures affectations nous permettront de rester en contact !

Aux potardes et potards des autres promos, Emmanuelle, Anne-Laure, Mélissa, Tiphonie, Pierre-Henri, François, Claire, Eloi et Steffy soyez fiers d'être en pharma ! Bon courage pour la suite...

A mes amis de la Boîte,

Aux BGB 2007, Astrée, Dija, Anne-Charlotte, Héloïse, Yann, Jérémy, Marie, Claire, Amélie, Mélanie, Laurent, merci d'avoir su m'accorder une petite place entre votre stéthoscope et vos bouquins de médecine ! Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, en espérant nombreux ceux à venir !

A Sylvia, Hélène, Juliette, Sarah R., Matthieu, Mariane et Charlotte, merci pour vos encouragements tout au long de cette année ! J'espère que nos chemins se croiseront souvent.

A Daphné, ma pseudo-bizuthe d'honneur, d'une course de nuit (dans la neige !) entre Saint Etienne et Lyon à un raid en Bretagne, en passant par le stage para à Pau, nous avons partagé beaucoup d'émotions ! Merci pour ton soutien agrémenté de belles cartes postales, de chocolat noir et de footings !

A mes amis navalais, Laure, Guillaume, Camille et les autres, merci pour votre accueil chaleureux chaque fois que j'ai eu l'occasion de venir à Bordeaux !

A mes camarades de promo, merci pour les bons moments partagés, que ce soit en stage mili ou en soirées ! Tandis que se termine mon séjour à la Boîte, pour vous, une année intense commence ... Vous n'avez jamais été aussi près de la fin, courage !

A l'équipe de rugby féminin de la boîte, merci d'avoir réussi à garder une équipe jusqu'au bout ! La folle ambiance de nos entraînements me manquera ! Bonne continuation !

A mes amis de la fac,

Au mythique "groupe 2" et apparentés - Céline, Thibaut, Isaure, Michaël, Clémentine, Véronique, Florent, Chloé, Léa, Emilie, Justine, Ismaël, Clémence, Fatou, Clotilde et Baptiste ! Merci pour la bonne ambiance de nos TP et votre bonne humeur ! Nos soirées et nos week-ends resteront de très bons souvenirs. C'était bien, bien, bien, bien, bien ! J'aurai toujours plaisir à vous retrouver ! Je vous souhaite de vous épanouir quelle que soit la voie que vous avez choisie ! A votre tour maintenant de présenter votre thèse !!!

A Alexia, Charlotte, Alexandra C., Eléna, Marielle, Eurielle, merci pour les bons moments que nous avons passés ensemble ! J'espère qu'il y en aura encore beaucoup d'autres.

A l'ensemble du personnel de la Bibal et du service informatique, merci pour votre disponibilité, votre aide et votre sympathie !

A l'ensemble du personnel de la pharmacie et du laboratoire de l'HIAD, aux médecins séniors et internes des services dans lesquels je suis passée, merci pour votre enseignement, vos conseils et vos encouragements durant ma 5AHU !

A Bruno, Sylvie et aux autres techniciens du laboratoire de Lyon Sud, à Emilie, merci pour votre aide, vos conseils et votre disponibilité. Merci d'avoir agrémenté mes manip' de votre joie de vivre !

A Laurent Salphati, merci pour vos réponses toujours très complètes et vos suggestions. Votre aide m'a été précieuse.

A tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin dans la réalisation et dans la relecture de ce travail, je vous remercie infiniment.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	19
FIGURES	19
TABLEAUX	24
LISTE DES ABREVIATIONS	26
Introduction	30
1. Rappels historiques et bibliographiques	33
1.1. Métabolisme des médicaments (8,9)	33
1.1.1. Généralités	33
1.1.2. Les différentes voies métaboliques	33
1.1.2.1. Les réactions de phase I : fonctionnalisation.....	33
1.1.2.2. Les réactions de phase II : conjugaison.....	35
1.1.3. Les cytochromes P450 (CYPs)	36
1.1.3.1. Généralités sur les cytochromes P450.....	36
1.1.3.2. Structure des cytochromes P450	36
1.1.3.3. Propriétés catalytiques des cytochromes P450	37
1.1.3.4. Rôle dans le métabolisme des médicaments.....	40
1.1.3.5. Inhibition enzymatique des cytochromes P450	41
1.1.4. Modèles biologiques pour les études <i>in vitro</i> du métabolisme	42
1.1.4.1. Microsomes hépatiques (9).....	42
1.1.4.1.1. Généralités	42
1.1.4.1.2. Surexpression d'un isoforme de cytochrome P450.....	43
1.1.4.2. Fraction cytosolique (9).....	43
1.1.4.3. Culture cellulaire : hépatocytes et lignées cellulaires hépatiques	44

1.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)	45
1.2.1. Principes généraux	45
1.2.1.1. La chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	45
1.2.1.2. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	46
1.2.2. Le TSQ® Quantum mass spectrometer.....	47
1.2.2.1. Appareillage.....	47
1.2.2.1.1. La source d'ions.....	47
1.2.2.1.2. L'analyseur : triple quadripôle.....	48
1.2.2.2. Différents modes d'acquisition utilisés avec le TSQ® Quantum mass spectrometer	49
1.2.2.2.1. Mode de balayage complet « <i>Full Scan</i> »	50
1.2.2.2.2. Mode de suivi d'un ion sélectionné (<i>SIM</i>)	50
1.2.2.2.3. Mode de balayage des ions fils « <i>Product Ion Scan</i> »	51
1.2.2.2.4. Mode de balayage des ions parents « <i>Parent Ion Scan</i> »	51
1.2.2.2.5. Mode « <i>Multiple Reaction Monitoring</i> » (<i>MRM</i>)	52
1.3. Intérêt du MBLI-98	53
1.3.1. Généralités	53
1.3.2. Dosage du MBLI par spectrométrie de masse en tandem	57
1.3.2.1. MBLI-87.....	57
1.3.2.2. MBLI-98.....	58
1.4. Etude du métabolisme de molécules ayant des motifs structuraux similaires au MBLI-98	59
1.4.1. Métabolisme du resveratrol et du DMU-212.....	59
1.4.2. Métabolisme de l'émodyne.....	61
1.4.3. Métabolisme de la tectochrysin et du GF120918.....	62

2. Matériels et méthodes	67
2.1. Préparation des microsomes hépatiques de souris	67
2.1.1. Matériels	67
2.1.1.1. Animaux	67
2.1.1.2. Produits chimiques	67
2.1.1.3. Appareillages	67
2.1.2. Méthodes.....	68
2.1.2.1. Traitement inducteur des souris et sacrifice	68
2.1.2.2. Préparation des microsomes hépatiques et de la fraction cytosolique	68
2.1.2.2.1. Principe.....	68
2.1.2.2.2. Protocole.....	69
2.1.2.3. Quantification des protéines microsomales et cytosoliques	70
2.1.2.3.1. Principe.....	70
2.1.2.3.2. Protocole.....	70
2.2. Etude <i>in vitro</i> du métabolisme du MBLI-98	71
2.2.1. Matériels	71
2.2.1.1. Produits chimiques	71
2.2.1.2. Appareillages	72
2.2.2. Méthodes.....	73
2.2.2.1. Etude du métabolisme de l'irinotécan et du MBLI-98.....	73
2.2.2.1.1. Conditions d'incubation avec les microsomes	73
2.2.2.1.1.1. Pour l'étude du métabolisme de l'irinotécan	73
2.2.2.1.1.2. Pour l'étude du métabolisme du MBLI 98	74
2.2.2.1.1.3. Pour l'étude du métabolisme du composé M1	74
2.2.2.1.2. Conditions d'incubation avec les cellules HepaRG.....	75
2.2.2.1.3. Conditions pré-analytiques	75
2.2.2.1.3.1. Pour les échantillons de l'étude sur microsomes.....	75
2.2.2.1.3.2. Pour les échantillons de l'étude sur cellules HepaRG	75

2.2.2.1.4.	Conditions analytiques	76
2.2.2.1.4.1.	Chromatographie liquide haute performance	76
2.2.2.1.4.2.	Spectrométrie de masse	77
2.2.2.2.	Etude du métabolisme de l'ifosfamide et étude des propriétés inhibitrices du CYP 3A4 de la troléandomycine et du MBLI-98 vis-à-vis de la métabolisation de l'ifosfamide	77
2.2.2.2.1.	Conditions d'incubation	77
2.2.2.2.1.1.	Pour l'étude du métabolisme de l'ifosfamide	77
2.2.2.2.1.2.	Pour le calcul de l'IC50 de la troléandomycine (TAO) et du MBLI-98	78
2.2.2.2.2.	Conditions pré-analytiques	78
2.2.2.2.3.	Conditions analytiques	78
2.2.2.2.3.1.	Chromatographie liquide haute performance	78
2.2.2.2.3.2.	Spectrométrie de masse	79
3.	Résultats - Discussion.....	82
3.1.	Obtention des fractions subcellulaires.....	82
3.1.1.	Quantification des protéines microsomales et cytosoliques	82
3.1.2.	Vérification du fonctionnement des microsomes hépatiques	84
3.1.3.	Discussion.....	86
3.2.	Hypothèses préalables à l'étude du métabolisme du MBLI-98.....	87
3.2.1.	Hypothèses concernant la métabolisation du MBLI-98.....	87
3.2.2.	Hypothèses de fragmentation des potentiels métabolites du MBLI-98	91
3.3.	Recherche des métabolites du MBLI-98.....	92
3.3.1.	Résultats de l'identification des métabolites	92
3.3.2.	Résultats de l'analyse du composé M1	96
3.3.3.	Résultats de la cinétique de métabolisation du MBLI-98.....	97
3.3.4.	Discussion.....	99
3.4.	Cinétiques du MBLI-98 et de ses métabolites	102
3.4.1.	Résultats en présence du système régénérant complet	102
3.4.2.	Résultats sans ajout de G ₆ Pdh.....	104
3.4.3.	Discussion.....	106

3.5. Autres.....	110
3.5.1. Résultats de l'étude du métabolisme du MBLI-98 avec différentes concentrations de microsomes hépatiques de souris.....	110
3.5.2. Comparaison des aires entre le composé M1 et le MBLI-98	112
3.5.3. Résultats de l'étude du métabolisme du composé M1	112
3.5.4. Discussion.....	114
3.6. Etudes d'inhibition.....	117
3.6.1. Résultats de l'étude de l'inhibition enzymatique du métabolisme du MBLI-98.....	117
3.6.1.1. Par la troléandomycine (TAO)	117
3.6.1.2. Par le méthimazole (MTM)	120
3.6.1.3. Par le glutathion (GSH).....	120
3.6.2. Etude de l'inhibition enzymatique du métabolisme de l'ifosfamide par le MBLI-98	121
3.6.3. Discussion.....	125
3.7. Synthèse	127
<i>Conclusions.....</i>	<i>129</i>
<i>Références bibliographiques</i>	<i>132</i>

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Les différentes voies métaboliques envisageables pour un xénobiotique : réactions de phase I et/ou réactions de phase II.....	33
Figure 2 : Nomenclature des cytochromes P450	36
Figure 3 : Représentation schématique de la structure d'un cytochrome P450.....	37
Figure 4 : Réaction générale catalysée par les CYPs du réticulum endoplasmique.....	37
Figure 5 : Cycle catalytique des CYPs	38
Figure 6 : Exemple de chromatogramme obtenu par LC-MS/MS.....	46
Figure 7 : Schéma du couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse en tandem de type triple quadripôle d'après (28).....	46
Figure 8 : Schéma d'un quadripôle : 4 barres métalliques parallèles auxquelles sont appliquées des tensions alternatives et continues (28).....	49
Figure 9 : Représentation schématique du mode "Full Scan"	50
Figure 10 : Représentation schématique du mode "SIM"	50
Figure 11 : Représentation schématique du mode "Product Ion Scan"	51
Figure 12 : Représentation schématique du mode "Parent Ion Scan"	52
Figure 13 : Représentation schématique du mode "MRM"	52
Figure 14 : Structures de la tectochrysin, du GF120918 et structure générale des séries I et II (6).....	55
Figure 15 : Structure du MBLI-87.....	55
Figure 16 : Structure du MBLI-98.....	57
Figure 17 : Fragmentation du MBLI-87 avec une énergie de collision de 28 eV.....	58
Figure 18 : Spectre de masse du MBLI-98.....	58
Figure 19 : Structure chimique du resveratrol et d'un de ses métabolites, le piceatannol.....	59
Figure 20 : Schéma de métabolisation du DMU 212	60
Figure 21 : Schéma de métabolisation de l'émodyne	61
Figure 22 : Structure de la tectochrysin et lieu de métabolisation.....	62
Figure 23 : Structure et spectre de masse de l'élaclidar en mode d'ionisation positive.....	63
Figure 24 : Lieux de métabolisation identifiés de l'élaclidar	63

Figure 25 : Structure et spectre de masse du métabolite O-déméthylé de l'élacridar	64
Figure 26 : Structure et spectre de masse du métabolite hydroxylé de l'élacridar.....	64
Figure 27 : Protocole de préparation des microsomes hépatiques de souris et de la fraction cytosolique à partir du tissu hépatique de souris.....	69
Figure 28 : Gradient de solvant utilisé lors de la chromatographie liquide avec la colonne Hypersil GOLD 100 x 2,1 mm permettant l'élution de la camptothécine, de l'irinotécan, du MBLI et de leurs métabolites....	76
Figure 29 : Gradient de solvant utilisé lors de la chromatographie liquide avec la colonne WATERS SunFire C18 3,5 µm (2,1 x 100 mm) permettant l'élution du cyclophosphamide, de l'ifosfamide et de ses métabolites.	79
Figure 30 : Droite d'étalonnage pour la quantification des protéines microsomales et cytosoliques	83
Figure 31 : Structure chimique de l'irinotécan (CPT-11) et de ses métabolites majeurs (69).....	84
Figure 32 : Consommation de l'irinotécan (CPT-11) en présence de microsomes hépatiques de souris (sans prétraitement "TEMOIN", avec prétraitement par la dexaméthasone "DEX" ou par phénobarbital "PB")... 85	85
Figure 33 : Apparition du métabolite SN38 de l'irinotécan en présence de microsomes hépatiques de souris (sans prétraitement "TEMOIN", avec prétraitement par la dexaméthasone "DEX" ou par phénobarbital "PB").....	85
Figure 34 : Apparition du métabolite NPC de l'irinotécan en présence de microsomes hépatiques de souris (sans prétraitement "TEMOIN", avec prétraitement par la dexaméthasone "DEX" ou par phénobarbital "PB").....	85
Figure 35 : Apparition du métabolite APC de l'irinotécan en présence de microsomes hépatiques de souris (sans prétraitement "TEMOIN", avec prétraitement par la dexaméthasone "DEX" ou par phénobarbital "PB").....	85
Figure 36 : Structure chimique du MBLI-98 et différentes possibilités de métabolisation (O-déméthylation, hydroxylation, N-déalkylation ou réduction).....	87
Figure 37 : Hypothèses sur les rapports m/z retrouvés en Q1 dans le spectromètre de masse en tandem, pouvant correspondre à des métabolites du MBLI-98 (MH+ = 433,2).....	88
Figure 38 : Hypothèses sur les rapports m/z retrouvés en Q1 dans le spectromètre de masse en tandem, pouvant correspondre aux métabolites secondaires d'un métabolite O-déméthylé du MBLI-98 (MH+ = 419)	89

Figure 39 : Hypothèses sur les rapports m/z retrouvés en $Q1$ dans le spectromètre de masse en tandem, pouvant correspondre aux métabolites secondaires d'un métabolite hydroxylé du MBLI-98 ($MH^+ = 449$)..	89
Figure 40 : Hypothèses sur les rapports m/z retrouvés en $Q1$ dans le spectromètre de masse en tandem, pouvant correspondre aux métabolites secondaires du métabolite du MBLI-98 dont la fonction cétone a été réduite en alcool ($MH^+ = 435$)	90
Figure 41 : Hypothèses sur les rapports m/z retrouvés en $Q1$ dans le spectromètre de masse en tandem, pouvant correspondre aux métabolites secondaires du métabolite N-déalkylé du MBLI-98 ($MH^+ = 433,2$)	90
Figure 42 : Schéma de fragmentation du MBLI-98 détecté en LC-MS/MS par la transition $433,2 \rightarrow 252,1$.	91
Figure 43 : Hypothèses de schéma de fragmentation des potentiels métabolites du MBLI-98	91
Figure 44 : Spectres de masse des ions détectés par LC-MS/MS en mode Product Ion Scan après incubation du MBLI-98 avec des microsomes hépatiques de souris de type « TEMOIN » en présence de $NADPH, H^+$...	93
Figure 45 : Chromatogrammes obtenus à 3 min après incubation du MBLI-98 avec des microsomes hépatiques de souris de type "TEMOIN", en présence de $NADPH, H^+$	94
Figure 46 : Hypothèses d'ions fils provenant de la fragmentation de métabolites du MBLI-98	95
Figure 47 : Evolution de la concentration de MBLI-98 au cours du temps en présence de microsomes hépatiques de souris de type « TEMOIN » en présence ou non de $NADPH, H^+$ ou de G_6Pdh	98
Figure 48 : Chromatogramme de l'analyse du MBLI-98 et de ses métabolites après incubation en présence de microsomes hépatiques de souris de type « TEMOIN », en l'absence de $NADPH, H^+$	98
Figure 49 : Chromatogramme de l'analyse du MBLI-98 et de ses métabolites après incubation en présence de microsomes hépatiques de souris type « TEMOIN » et de $NADPH, H^+$	99
Figure 50 : Schéma de fragmentation des métabolites du MBLI-98 détectés par LC-MS/MS	100
Figure 51 : Evolution de la concentration du MBLI-98 au cours du temps en présence de microsomes hépatiques de souris de type « PB » et de $NADPH, H^+$	103
Figure 52 : Evolution de la concentration des métabolites du MBLI-98 au cours du temps en présence de microsomes hépatiques de souris de type « PB » et de $NADPH, H^+$	103
Figure 53 : Evolution de la concentration des métabolites du MBLI-98 lors d'une incubation avec des microsomes hépatiques de souris de type « TEMOIN », en présence de $NADP$ et de G_6P , sans ajout de G_6Pdh	105

Figure 54 : Evolution des concentrations de MBLI-98 et de deux de ses métabolites après 1, 2 ou 3 injections de MBLI-98 espacées de 4h à des souris. Les rapports des aires correspondent aux moyennes des rapports obtenus avec les souris sacrifiées de chacun des groupes.....	107
Figure 55 : Schéma de métabolisation du MBLI-98 : formation des métabolites M1, M2, M3, M4 et M5...	108
Figure 56 : Evolution des concentrations des métabolites en présence de microsomes hépatiques de souris de type « PB » à la concentration de 0,9 mg de protéines /mL ou 0,18 mg de protéines /mL dans le milieu d'incubation, en présence de NADPH,H ⁺	111
Figure 57 : Hypothèses de structure et de fragmentation des métabolites issus du composé M1	113
Figure 58 : Evolution de la concentration du métabolite N-déalkylé du MBLI-98 (composé M1) lors d'une incubation avec des microsomes hépatiques de souris de type « PB », en présence de NADPH,H ⁺	113
Figure 59 : Evolution de la concentration des potentiels métabolites secondaires du métabolite N-déalkylé du MBLI-98 (composé M1) lors d'une incubation avec des microsomes hépatiques de souris de type « PB », en présence de NADPH,H ⁺	114
Figure 60 : Schéma de métabolisation du composé M1 (métabolite N-déalkylé du MBLI-98) : formation des métabolites M6, M7 et M8.....	116
Figure 61 : Evolution de la quantité de MBLI-98 au cours du temps en présence ou non de troléandomycine (TAO) à la concentration de 10 µM dans le milieu d'incubation.	117
Figure 62 : Evolution des concentrations des métabolites au cours du temps en présence ou non de troléandomycine (TAO) à la concentration de 10 µM dans le milieu d'incubation contenant des microsomes hépatiques de souris de type « TEMOIN » et du NADPH,H ⁺	119
Figure 63 : Evolution de la quantité de métabolite N-déalkylé au cours du temps en présence ou non de glutathion (GSH) à la concentration de 7,4 mM dans le milieu d'incubation.	120
Figure 64 : Voies métaboliques principales de l'ifosfamide (73).....	121
Figure 65 : Evolution de la quantité d'ifosfamide (IF) au cours du temps dans le milieu d'incubation.	122
Figure 66 : Evolution de la quantité de 3-déchloroéthylifosfamide (3-déchloroIF) au cours du temps dans le milieu d'incubation.....	122
Figure 67 : Evolution de la quantité de 4-hydroxyifosfamide (4-hydroxyIF) au cours du temps dans le milieu d'incubation.	122
Figure 68 : Comparaison de la concentration des métabolites de l'ifosfamide en présence ou non de troléandomycine (TAO) à la concentration de 6 µM après 30 minutes d'incubation.	123

Figure 69 : Graphique permettant de déterminer l'IC50 de la troléandomycine (TAO) vis-à-vis de la métabolisation in vitro de l'ifosfamide au bout de 30 minutes. La valeur de 100% de métabolisation est prise pour l'échantillon sans troléandomycine. 123

Figure 70 : Comparaison de la concentration des métabolites de l'ifosfamide en présence ou non de MBLI-98 à la concentration de 20 μ M après 90 minutes d'incubation. 124

Figure 71 : Graphique permettant de déterminer l'IC50 du MBLI vis-à-vis de la métabolisation in vitro de l'ifosfamide au bout de 90 minutes. La valeur de 100% de métabolisation est prise pour l'échantillon sans troléandomycine. 124

Figure 72 : Schéma de métabolisation du MBLI-98..... 127

TABLEAUX

Tableau I : Résumé des différentes réactions de phase I : type de réaction, enzymes impliquées, localisation cellulaire et spécificité de substrat.....	34
Tableau II : Résumé des différentes réactions de phase II.....	35
Tableau III : Principales réactions chimiques réalisables par les cytochromes P450.....	39
Tableau IV : Spécificités de substrats des principales isoenzymes des cytochromes P450 (16).....	40
Tableau V : Gradient de solvant utilisé lors de la chromatographie liquide avec la colonne Hypersil GOLD 100 x 2,1 mm permettant l'élution de la camptothécine, de l'irinotécan, du MBLI et de leurs métabolites....	76
Tableau VI : Transitions MRM utilisées en LC-MS/MS pour la détection de l'irinotécan et de ses métabolites (APC, NPC et SN-38)	77
Tableau VII : Transitions MRM utilisées en LC-MS/MS pour la détection de la camptothécine, du MBLI-98 et de son métabolite N-déalkylé	77
Tableau VIII : Gradient de solvant utilisé lors de la chromatographie liquide avec la colonne WATERS SunFire C18 3,5 µm (2,1 x 100 mm) permettant l'élution du cyclophosphamide, de l'ifosfamide et de ses métabolites.	79
Tableau IX : Transitions MRM utilisées en LC-MS/MS pour la détection du cyclophosphamide, de l'ifosfamide et de ses métabolites (2-déchloroifosfamide, 3-déchloroifosfamide, isophosphoramidate, 4-kétoifosfamide, carboxyifosfamide, 4-hydroxyifosfamide).....	80
Tableau X : Absorbance de la gamme d'étalonnage.....	82
Tableau XI : Concentrations protéiques des échantillons des protéines microsomales et cytosoliques	83
Tableau XII : Evolution de la concentration de MBLI-98 au cours du temps en présence de microsomes hépatiques de souris de type "PB" à la concentration de 0,9 mg de protéines / mL ou 0,18 mg de protéines / mL.....	110
Tableau XIII : Comparaison du rapport des aires entre le MBLI -98 et son métabolite N-déalkylé sur l'aire de l'étalon interne (CPT).	112

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC = *ATP-Binding Cassette*

ABCB1 = Glycoprotéine P

ABCC1 = MRP1 (= *Multidrug Resistance Protein 1*)

ABCG2 = BCRP (= *Breast Cancer Resistant Protein*) = ABCP = MXR

ABCP = transporteur ABCG2

ATP = Adénosine Tri Phosphate

BCRP = *Breast Cancer Resistant Protein* = transporteur ABCG2

BSA= *Bovine Serum Albumine*

CBS = Centre Biologie Sud

CLB = Centre Léon Bérard

CD-1 = Cluster de Différenciation 1

CPT = Camptothécine

CPT-11 = Irinotécan

CYPs = Cytochromes P450

DEX = Dexaméthasone

DMSO = Diméthyl sulfoxyde

EDTA = Acide Ethylène Diamine Tétracétique

ESI = *Electrospray Ionization*

Fe²⁺ = Fer ferreux

Fe³⁺ = Fer ferrique

FMO = Flavine Mono Oxygénase

G₆P = Glucose-6-phosphate

G₆Pdh = Glucose-6-phosphate déshydrogénase

GSH = Glutathion

GST = Glutathion-S-transférase

HPLC = Chromatographie Liquide Haute Performance

IBCP = Institut de Biologie et Chimie des Protéines

IF = Ifosfamide

INSERM = Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale

LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

MDR = *MultiDrug Resistance*

MT = Méthyltransférase

MTM = Méthimazole

MRM = *Multiple Reaction Monitoring*

MRP1 = *Multidrug Resistance Protein 1* = transporteur ABCC1

MXR = transporteur ABCG2

NADP = Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NADPH,H⁺ = Forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NAT = N-acétyl-transférase

PB = Phénobarbital

PBS = *Phosphate Buffered Saline*

QSAR = *Quantitative Structure-Activity Relationships*

SIM = *Single Ion Monitoring*

SULT = Sulfotransférase

TAO = Troléandomycine

Tris = Trishydroxyméthylaminométhane

TSQ = *Triple Stage Quadrupole*

UGT = Uridine Diphosphoglucuronyltransférase

UV = Ultra-Violet

INTRODUCTION

Introduction

La résistance cellulaire aux médicaments est un obstacle majeur de la lutte anticancéreuse. Les cellules tumorales peuvent acquérir une résistance à un seul médicament, à une classe de médicament ou, à un large spectre de médicaments. Ce dernier phénomène, découvert en 1976 par *Juliano et Ling* (1), est nommé *multidrug resistance* (MDR). Il se caractérise par la résistance à de nombreux cytotoxiques n'ayant le plus souvent, aucune similitude structurale ou fonctionnelle entre eux (2). Actuellement, il constitue l'une des causes majeures d'échec de la chimiothérapie. Dans la majorité des cas, ce phénomène résulte du transport actif des médicaments hors de la cellule par les transporteurs ABC (ATP-binding cassette), rendant impossible leur action cytotoxique (3). Les trois principaux transporteurs identifiés dans ce type de résistance sont ABCB1, ABCC1 et ABCG2 (4).

Depuis la découverte de ce phénomène de résistance, de nombreuses équipes de recherche travaillent sur la mise au point de molécules capables d'inhiber le mécanisme d'efflux de ces transporteurs (5). C'est donc dans cette optique que le MBLI-98 a été développé (6). Il montre des résultats encourageants dans les études *in vitro* et *in vivo* concernant l'inhibition spécifique du transporteur ABCG2 (7).

Néanmoins, la mise sur le marché d'un médicament est un processus long et complexe nécessitant un travail pluridisciplinaire. Lors des premiers stades du processus de recherche de nouvelles molécules d'intérêt, la connaissance des paramètres pharmacocinétiques, notamment du métabolisme, est essentielle pour la suite du développement. En effet, la détermination du profil métabolique d'une molécule, c'est-à-dire l'identification de ses métabolites et la connaissance du ou des systèmes enzymatiques

responsables de sa métabolisation, permettent, par la suite, de prévoir certaines interactions médicamenteuses.

Parmi les techniques analytiques actuellement utilisées pour la recherche de métabolites, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est la plus fréquemment employée. En effet, la chromatographie liquide haute performance permet la séparation de composés de polarités et de masses très variables. Parmi les systèmes de détection qui lui sont habituellement associés, la spectrométrie de masse est le seul offrant des informations structurales nécessaires à l'identification des métabolites.

Devant l'intérêt suscité par le MBLI-98, l'étude de son métabolisme a ainsi été entreprise. L'objectif de ce travail expérimental a été d'identifier les potentiels métabolites du MBLI-98 formés *in vitro*, après incubation sur des microsomes hépatiques de souris ou sur cellules hépatiques HepaRG. Dans un premier temps, après avoir défini différentes hypothèses de voie de métabolisation du MBLI-98 par les cytochromes P450, notre travail a consisté à vérifier la présence des métabolites envisagés. Dans un second temps, diverses conditions d'incubation ont été appliquées dans le but de mieux comprendre le métabolisme du MBLI-98. Pour la détection des composés, une méthode d'analyse couplant la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse en tandem a été utilisée.

RAPPELS HISTORIQUES ET BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rappels historiques et bibliographiques

1.1. Métabolisme des médicaments (8,9)

1.1.1. Généralités

Le métabolisme des médicaments est un processus d'élimination englobant l'ensemble des réactions chimiques conduisant à la formation d'un ou plusieurs métabolites hydrosolubles, plus facilement éliminés hors de l'organisme via les urines, la bile, la salive ou la sueur.

Il a lieu principalement dans le foie, mais, de nombreux organes et tissus tels que les reins, les poumons ou encore les intestins présentent également une activité métabolique.

1.1.2. Les différentes voies métaboliques

Le processus de métabolisation se divise en 2 grandes phases (Cf. Figure 1) :

- les réactions de phase I, dites de fonctionnalisation,
- les réactions de phase II, dites de conjugaison.

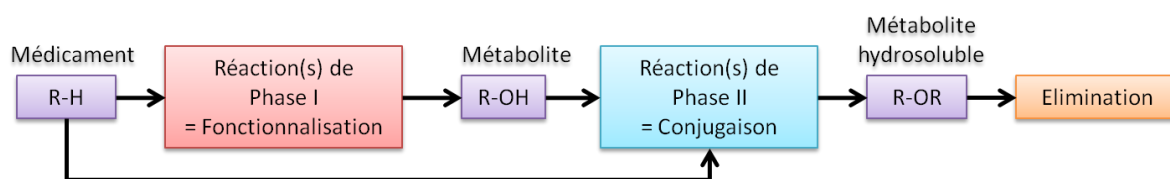


Figure 1 : Les différentes voies métaboliques envisageables pour un xénobiotique : réactions de phase I et/ou réactions de phase II

1.1.2.1. Les réactions de phase I : fonctionnalisation

Les réactions de phase I (Tableau I) sont réalisées par différents types d'enzymes ayant chacune une spécificité plus ou moins large de substrats.

Il s'agit de réactions :

- d'oxydation, ayant principalement lieu au niveau des microsomes hépatiques, impliquant :
 - des monooxygénases, auxquelles appartiennent les cytochromes P450 et les monooxygénases à flavines,
 - des déshydrogénases,
 - des monoamines oxydases,
- de réduction, peu courantes mais possibles via le cytochrome P450 Fe^{2+} , un puissant réducteur,
- d'hydrolyse, ayant lieu au niveau des organes mais aussi du plasma, faisant intervenir des enzymes telles que les estérases, les amidases, les peptidases et les époxyde-hydroxylases.

Les métabolites ainsi formés auront des groupes fonctionnels tels que des hydroxyles (-OH), des amines (-NH₂) ou encore des carboxyles (-COOH), permettant leur conjugaison à des composés endogènes lors des réactions de phase II.

Tableau I : Résumé des différentes réactions de phase I : type de réaction, enzymes impliquées, localisation cellulaire et spécificité de substrat

Types de réactions	Enzymes		Substrats
	Nom	Localisation cellulaire	
Oxydation	Monooxygénases à cytochrome P450	Réticulum endoplasmique Mitochondries	Chaînes aliphatiques, aromatiques, amines, alcanes...
	Monooxygénases à Flavines	Réticulum endoplasmique	Présence d'un hétéroatome (N, S, P)
	Déshydrogénases	Mitochondries Cytosol	Alcools et aldéhydes aliphatiques ou aromatiques...
	Monoamine oxydase	Mitochondries	Amines
Réduction	Cytochrome P450 Fe^{2+}	Réticulum endoplasmique Cytosol	Cétones...
Hydrolyse	Estérases, amidases, peptidases, époxyde hydroxylase	Réticulum endoplasmique Cytosol	Esters, amides, peptides, époxydes...

1.1.2.2. Les réactions de phase II : conjugaison

Le but de cette étape est d'aboutir à la formation de substances conjuguées hydrosolubles et facilement éliminées par les milieux aqueux. Il existe six types de réactions de conjugaison dont les caractéristiques sont regroupées dans le Tableau II.

Tableau II : Résumé des différentes réactions de phase II

Types de réactions	Co-substrats	Enzymes		Substrats
		Nom	Localisation cellulaire	
Glucuroconjugaison	Acide glucuronique	Uridine Diphosphoglucuronyl transférase (UGT)	Réticulum endoplasmique	Fonction nucléophile : -OH -COOH -NH ₂ -NHR -SH
Glutathion conjugaison	Glutathion	Glutathion-S-transférase (GST)	Cytosol Réticulum endoplasmique	C électrophile (plus rarement N, O, S)
Sulfoconjugaison	-SO ₂ H	Sulfotransférase (SULT)	Cytosol	Fonction nucléophile : -OH -COOH -NH ₂ -NHR -SH
Acétylconjugaison	-COCH ₃	N-acétyl-transférase (NAT)	Cytosol Mitochondries	R-NH ₂ R-NH-NH ₂ R-SO ₂ -NH ₂
Méthylconjugaison	-CH ₃	Méthyl-transférase (MT)	Cytosol Mitochondries	Phénol -NH ₂ -SH Arsenic
Conjugaison aux acides aminés	1 acide aminé	Aminoacide-transférase	Réticulum endoplasmique Mitochondries	-COOH -NH ₂

1.1.3. Les cytochromes P450 (CYPs)

1.1.3.1. Généralités sur les cytochromes P450

La superfamille des cytochromes P450 humains comprend 57 gènes codant des enzymes membranaires classées en familles, sous-familles et isoformes. Leur nomenclature actuelle est définie telle que sur la Figure 2 (10).

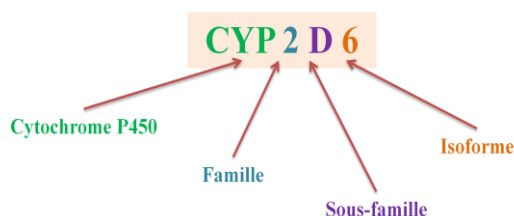


Figure 2 : Nomenclature des cytochromes P450

Les CYPs constituent une superfamille d'hémaprotéines initialement identifiées comme des pigments dans des microsomes de foie de rats (11). Le nom « P450 » provient de la propriété de ces pigments d'émettre un spectre spécifique à 450 nm (12).

Ces enzymes jouent un rôle important dans les biotransformations oxydatives de substrats endogènes divers et de xénobiotiques, dont les médicaments (13,14).

1.1.3.2. Structure des cytochromes P450

Les CYPs sont formés d'environ 500 acides aminés. Ce sont des hémaprotéines : elles contiennent une molécule d'hème par apoprotéine. Le fer héminique est toujours lié à une cystéine localisée près de la région carboxy-terminale de l'apoprotéine. La région N-terminale contient le site catalytique. Il s'agit d'une zone riche en acides aminés hydrophobes (Cf Figure 3) (15).

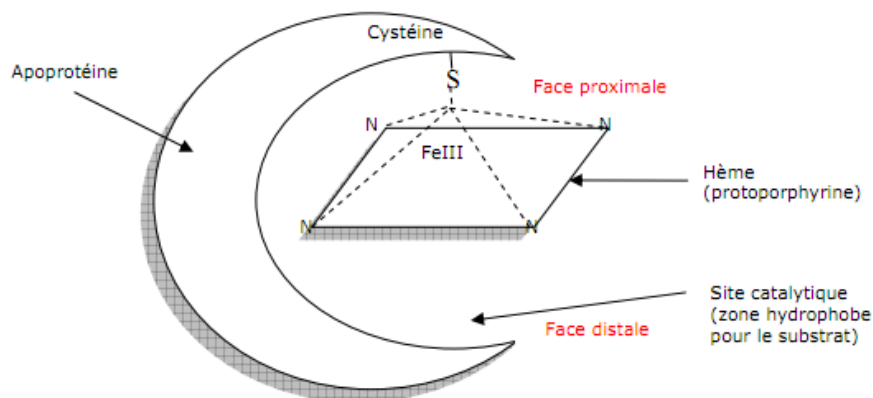


Figure 3 : Représentation schématique de la structure d'un cytochrome P450

1.1.3.3. Propriétés catalytiques des cytochromes P450

Ces enzymes sont appelées monooxygénases car elles incorporent un atome d'oxygène à partir d'oxygène moléculaire. Certains CYPs catalysent le métabolisme d'un nombre limité de structures chimiques alors que d'autres présentent des spécificités de substrats plus large. Cette variation dans les propriétés catalytiques d'oxydo-réduction des CYPs est due à la nature de leur apoprotéine. (16)

Pour fonctionner, les CYPs ont besoin à la fois d'oxygène et d'une source d'électrons (voir Figure 4). Ceux-ci lui sont apportés par une autre protéine : la NADPH-P450-réductase lorsque le cytochrome P450 est situé dans le réticulum endoplasmique, ou la ferrédoxine s'il est situé dans les mitochondries (17).

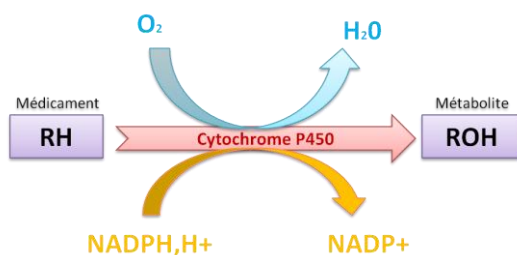


Figure 4 : Réaction générale catalysée par les CYPs du réticulum endoplasmique

Le cycle détaillé des cytochromes P450 est présenté dans la Figure 5.

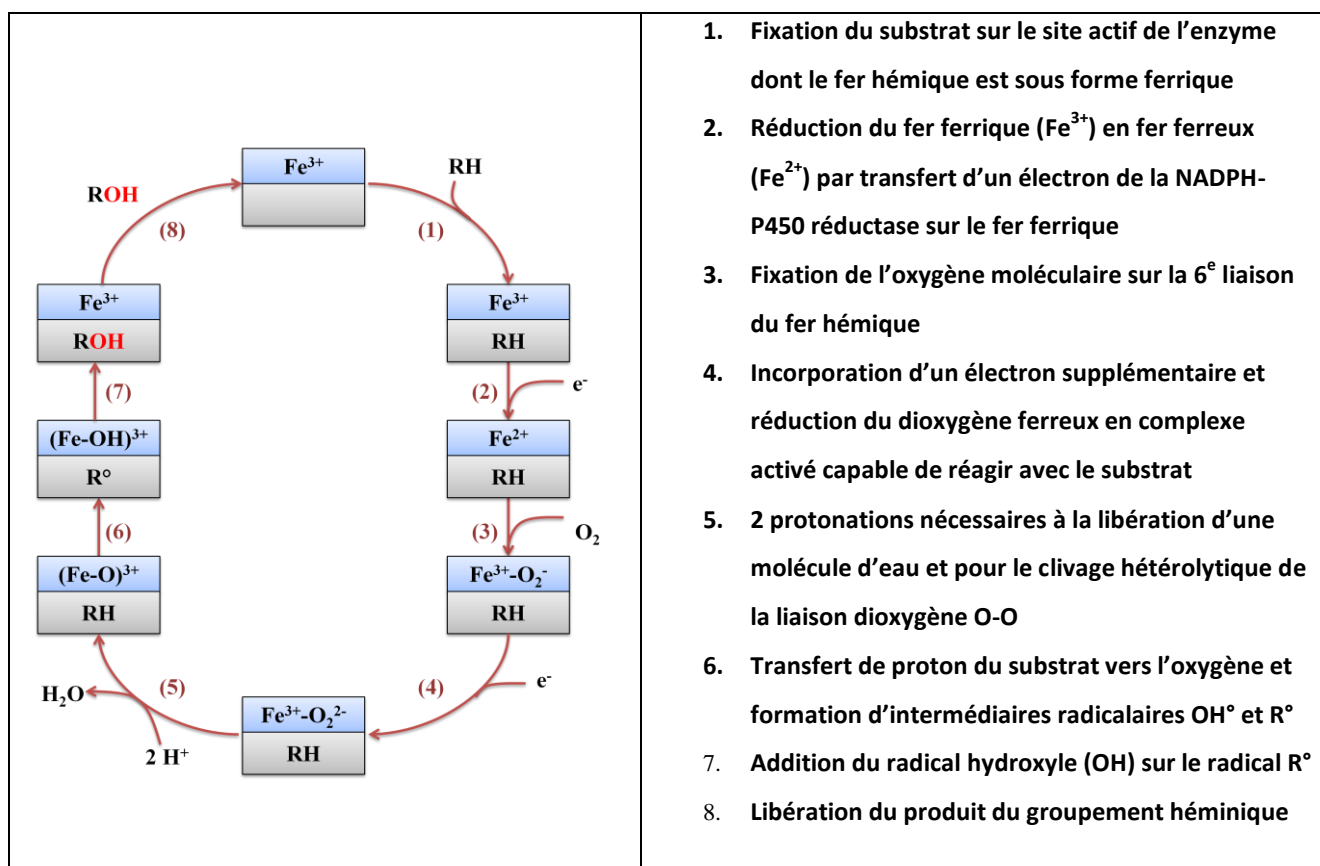
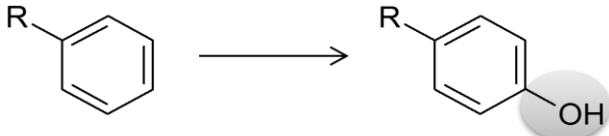
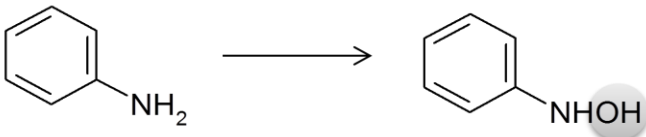


Figure 5 : Cycle catalytique des CYPs

Un grand nombre de réactions chimiques sont catalysées par les CYPs. Les principales sont regroupées dans le Tableau III.

Tableau III : Principales réactions chimiques réalisables par les cytochromes P450

Hydroxylation aliphatique	$R-CH_3 \longrightarrow R-CH_2OH$
Hydroxylation aromatique	
O-déalkylation	$R-O-R' \longrightarrow R-OH$
N-déalkylation	$R-\underset{H}{N}-R' \longrightarrow R-NH_2$
S-déalkylation	$R-S-R' \longrightarrow R-SH$
N-hydroxylation	
N-oxydation	$R-\underset{H}{N}-R' \longrightarrow R-\underset{H}{N}-R'-O$
S-oxydation	$R-S-R' \longrightarrow R-S-R'-O$
Epoxydation	$R-\underset{H}{C}=\underset{H}{C}H_2 \longrightarrow R-\underset{H}{C}-\underset{O}{\underset{H}{\text{C}}}-CH_2$
Azoréduction	$R-N-N-R' \longrightarrow R-NH_2$
Nitrorréduction	$R-NO_2 \longrightarrow R-NH_2$
Carbonylréduction	$R-\underset{O}{\underset{ }{C}}-R' \longrightarrow R-\underset{OH}{\underset{ }{C}}-R'$
Hydrolyse des esters	$R-\underset{O}{\underset{ }{C}}-O-R' \longrightarrow R-\underset{O}{\underset{ }{C}}-OH$
Hydrolyse des amides	$R-\underset{O}{\underset{ }{C}}-NH_2 \longrightarrow R-\underset{O}{\underset{ }{C}}-OH$

1.1.3.4. Rôle dans le métabolisme des médicaments

Parmi les 57 cytochromes P450 humains, 15 sont impliqués dans le métabolisme des médicaments. Ils appartiennent essentiellement aux familles 1, 2 et 3. Les CYPs interviennent dans plus de 90% du métabolisme des médicaments. Plus de 2000 substrats ont déjà été identifiés. Les isoenzymes les plus impliquées dans le métabolisme des médicaments chez l'homme sont les CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 et 3A4 avec plus de 50% des médicaments métabolisés par le CYP3A4 (18).

Les spécificités de substrats des principales isoenzymes sont regroupées dans le Tableau IV ci-dessous.

Tableau IV : Spécificités de substrats des principales isoenzymes des cytochromes P450 (16)

Famille	Isoforme	% dans le foie	Substrats types	Exemples
CYP1	1A2	12%	Composés arylamines Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Paracétamol, Caféine, Clozapine
CYP2	2C9	20%	Substrats faiblement anioniques (pour établir une liaison ionique avec un site cationique de la protéine) et modérément lipophiles	Anti-inflammatoires non stéroïdiens Hypoglycémifiants
	2C19		Substrats neutres ou faiblement basiques et modérément lipophiles + capables de faire une liaison hydrogène	Oméprazole, (R)-warfarine
	2D6	4%	Petites amines à distance de 5 à 7 Å d'un noyau aromatique ou d'une zone hydrophobe	β-bloquants Antidépresseurs tricycliques
CYP3	3A4	30%	Molécules volumineuses avec plusieurs noyaux aromatiques	Irinotécan Ifosfamide

La biodisponibilité de médicaments substrats des CYPs peut être affectée par des interactions médicamenteuses via l'induction ou l'inhibition des cytochromes P450, pouvant alors entraîner une toxicité ou une inefficacité thérapeutique (19). C'est pourquoi, avant la mise sur le marché d'un médicament, des études de métabolisme doivent être réalisées.

1.1.3.5. Inhibition enzymatique des cytochromes P450

Il existe deux classes principales d'inhibiteurs des cytochromes P450 : les inhibiteurs réversibles et les inhibiteurs irréversibles.

Les inhibiteurs réversibles peuvent être classés en différentes catégories (compétitifs, non compétitifs ou mixtes) selon leur site d'action. Les inhibiteurs compétitifs agissent au niveau du site actif de l'enzyme tandis que les inhibiteurs non compétitifs se lient au niveau d'un autre site entraînant une modification conformationnelle du site actif. L'inhibiteur réversible n'a nul besoin d'être métabolisé par le cytochrome P450 pour exercer son inhibition. Très souvent utilisé dans les études *in vitro* du métabolisme, le kétoconazole est un inhibiteur puissant du CYP3A4 agissant par compétition (20).

A l'inverse, les inhibiteurs irréversibles sont des substrats des cytochromes P450. Ils sont métabolisés en intermédiaires réactifs, lesquels formeront une liaison covalente au niveau du site actif, empêchant toute activité enzymatique. L'inhibition est donc NADPH,H⁺ dépendante (21). A titre d'exemple, la troléandomycine est un substrat suicide des CYP3A4 (22).

1.1.4. Modèles biologiques pour les études in vitro du métabolisme

Bien que faisant partie intégrante des études pharmacocinétiques, les études de métabolisme représentent une activité à part entière dans le processus de recherche et de développement de nouveaux médicaments. Pour recréer *in vitro* ce qui pourrait se passer *in vivo*, deux types de modèles biologiques sont envisageables : (i) les fractions subcellulaires obtenues par centrifugation différentielle tels que les microsomes hépatiques et la fraction cytosolique, (ii) les systèmes de culture cellulaire.

1.1.4.1. Microsomes hépatiques (9)

1.1.4.1.1. Généralités

Les microsomes hépatiques constituent le système d'essai le plus utilisé pour l'étude du métabolisme d'un nouveau médicament, notamment pour les réactions de biotransformation de phase I.

Les microsomes sont des vésicules résultantes de la fragmentation des membranes du réticulum endoplasmique lisse. Les principales enzymes présentes dans cette fraction tissulaire comprennent des enzymes membranaires dont la superfamille des cytochromes P450, les monooxygénases à flavine, les époxydes hydroxylases et diverses transférases.

L'utilisation de cofacteurs particuliers ou de conditions expérimentales spécifiques permet la sélection d'une enzyme particulière. Ainsi, les monooxygénases nécessitent un co-substrat de type NADPH,H+. Les UGT requièrent quant à elles, de l'acide UDP-glucuronique, ainsi qu'une activation rendant accessible le site actif de l'enzyme.

La préparation de microsomes est assez simple à réaliser mais des préparations commerciales sont également disponibles. Les microsomes peuvent être conservés à -80°C pendant plusieurs années sans variation notable de l'activité enzymatique.

1.1.4.1.2. Surexpression d'un isoforme de cytochrome P450

Certaines molécules sont capables d'augmenter la synthèse des cytochromes P450, on parle alors d'inducteurs enzymatiques. Ceux-ci peuvent être utilisés lors de la préparation des microsomes hépatiques, permettant ainsi d'avoir une quantité plus importante d'une isoenzyme que celle physiologiquement retrouvée dans le foie. Lors des études de métabolisme *in vitro*, cette technique est très répandue car elle permet à la fois d'avoir une activité enzymatique plus importante, mais aussi, dans certains cas, d'orienter la détermination des isoenzymes impliquées dans le métabolisme du médicament.

Par exemple, le phénobarbital, molécule appartenant aux barbituriques, induit la synthèse des CYP2B de façon majoritaire, mais aussi d'autres isoformes, dont le 3A (23). La dexaméthasone est, quand à elle, un corticoïde synthétique, induisant principalement la synthèse des CYP3A, notamment le 3A4 et le 3A1 mais aussi, de façon moindre des CYP2C9 (24).

1.1.4.2. Fraction cytosolique (9)

Le surnageant restant après ultracentrifugation correspond au cytosol. Cette fraction a l'avantage de contenir trois enzymes solubles de phase II : les N-acétyltransférases, les glutathion-S-transférases et les sulfo-transférases. Il est possible d'étudier spécifiquement l'activité de chacune d'entre elle, après apport de leur co-substrat respectif.

De même que pour les microsomes, la fraction cytosolique peut être conservée à -80°C pendant plusieurs années sans variation notable de l'activité enzymatique.

1.1.4.3. Culture cellulaire : hépatocytes et lignées cellulaires hépatiques

Les hépatocytes contiennent à la fois les enzymes de phase I et de phase II, permettant ainsi une étude globale du métabolisme. De plus, contrairement aux fractions subcellulaires, des études d'induction enzymatique sont également possibles (25). Cependant, la courte durée de vie des hépatocytes limite leur utilisation. En alternative, des lignées d'hépatocytes humains, d'origine tumorale ou immortalisés par transfection d'oncogènes, ont été développées. En 2002, l'INSERM a obtenu une nouvelle lignée de cellules hépatiques humaines, appelée HepaRG, dérivée d'un carcinome hépatocellulaire (26). Ces cellules, capables d'exprimer les principaux CYPs impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques, ainsi que les récepteurs nucléaires permettant l'induction, représentent un modèle d'étude *in vitro* du métabolisme très complet (27).

1.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

(LC-MS/MS) (28,29)

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (ou LC-MS/MS) est une technique analytique à la fois qualitative et quantitative. Elle couple la puissance séparative de la chromatographie liquide haute performance à la sensibilité et spécificité de la détection par spectrométrie de masse en tandem. Son application pour l'étude du métabolisme des médicaments est largement répandue (30).

1.2.1. Principes généraux

1.2.1.1. La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide haute performance est une technique analytique permettant la séparation des différents composés, contenus dans un mélange, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

Un fluide, appelé phase mobile, parcourt un tube appelé colonne, correspondant à la phase stationnaire. A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne. Là, il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne. En fonction de leur affinité, plus ou moins grande, pour la phase mobile et la phase stationnaire, les solutés seront élués plus ou moins rapidement. Le choix des phases dépend du type de composés à séparer.

Placé à la sortie de la colonne, un détecteur, couplé à un enregistreur, permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme (voir [Figure 6](#)). Ainsi, dans des conditions chromatographiques données, le temps de rétention, qui correspond au temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté, caractérise qualitativement une substance. La concentration du soluté dans un mélange est, quant à elle, proportionnelle à l'amplitude du pic chromatographique.

Dans le cas de la LC-MS/MS, le détecteur est un spectromètre de masse.

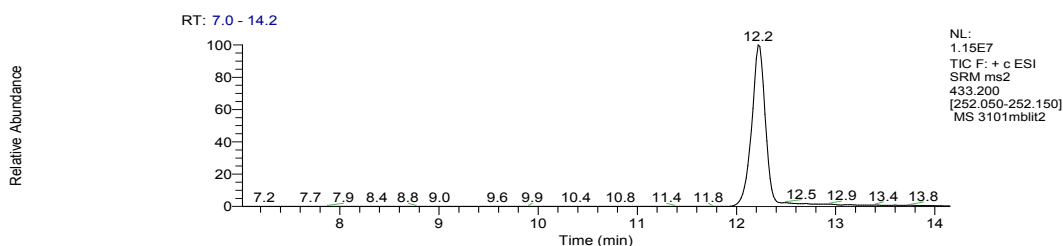


Figure 6 : Exemple de chromatogramme obtenu par LC-MS/MS.

1.2.1.2. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

La spectrométrie de masse en tandem constitue un apport très important en chimie analytique. Offrant des informations structurales sur les composés détectés, son couplage à l'HPLC (voir [Figure 7](#)) en fait une technique de référence dans les études de métabolisme.

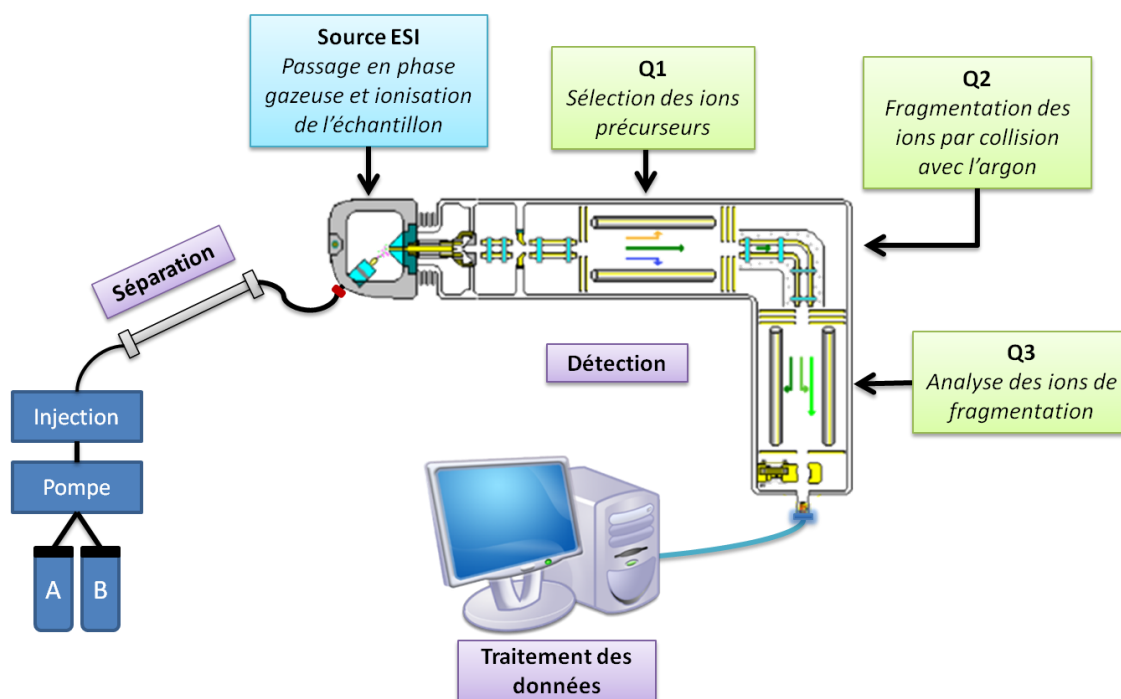


Figure 7 : Schéma du couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse en tandem de type triple quadripôle d'après (31)

Son principe repose sur l'ionisation et la fragmentation des molécules. Leur ionisation entraîne une accumulation d'énergie qui, en se dissipant, provoque la rupture des

liaisons interatomiques, donnant naissance à des fragments. Ceux-ci sont caractérisés par le rapport de leur masse à leur charge, noté m/z . Les différents fragments ainsi produits sont accélérés avant de parvenir à un analyseur, qui les sépare en fonction de ce rapport m/z . Un détecteur donne ensuite l'intensité du faisceau ionique obtenu, permettant l'établissement d'un spectre, caractéristique de la fragmentation d'un composé, appelé « spectre de masse ».

La spectrométrie de masse en tandem est une méthode comportant deux analyseurs successifs. Le premier permet de sélectionner un ou plusieurs ions stables particuliers, issus de la source d'ionisation, appelés « ions parents » ou « ions précurseurs ». Ce ou ces ions sont ensuite excités dans une cellule intermédiaire pour mener à leur fragmentation. Le deuxième analyseur permet alors l'analyse des ions issus de leur décomposition, appelés « ions fils », « ions produits » ou « ions de fragmentation ».

1.2.2. Le TSQ® Quantum mass spectrometer

Au Centre de Biologie Sud, le spectromètre de masse utilisé pour l'étude du métabolisme du MBLI-98 est le *Triple Stage Quadrupole® Quantum mass spectrometer* de la firme *Thermo*.

1.2.2.1. Appareillage

1.2.2.1.1. La source d'ions

La chambre d'ionisation est le premier composant d'un spectromètre de masse. Dans le cas de la LC-MS/MS, elle constitue l'interface avec la chromatographie liquide. Pour l'étude du métabolisme du MBLI-98 avec le TSQ® *Quantum mass spectrometer*, l'ionisation des molécules se fait par électronebulisation, à l'aide de la sonde ESI, en mode d'ionisation positive.

L'électrospray est produit à pression atmosphérique, à l'extrémité d'un fin capillaire porté à un potentiel élevé. Sous l'effet de ce champ électrique intense (obtenu par application d'une différence de potentiel de quelques kV entre ce capillaire et la contre-électrode) et grâce à l'assistance éventuelle d'un courant d'air coaxial, l'éluat est transformé en nuage de fines gouttelettes chargées positivement. Sous l'effet d'un second courant d'air chauffé, le solvant contenu dans ces gouttelettes s'évapore progressivement, jusqu'à ce que leur densité de charge devienne trop importante et provoque leur explosion, libérant ainsi des molécules protonées de l'analyte. Les ions ainsi formés sont ensuite guidés à l'aide de potentiels électriques vers l'analyseur.

1.2.2.1.2. L'analyseur : triple quadripôle

Dans le cas du TSQ® *Quantum mass spectrometer*, la détection repose sur la mise en série de trois quadripôles. Le premier et le troisième quadripôle fonctionnent comme analyseurs qui, selon le mode d'acquisition choisi, laissent passer tous les ions ou seulement ceux présélectionnés. Le second quadripôle est une chambre de collision où les ions provenant du premier quadripôle sont fragmentés. Ces fragments sont ensuite analysés par le troisième quadripôle. Ce système est caractérisé par une très grande rapidité de balayage.

Un quadripôle est un appareil qui utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon leur m/z . Il est constitué de quatre barres métalliques parallèles, disposées aux quatre angles d'un carré (voir [Figure 8](#)). Une tension ayant une composante continue et une composante alternative (radiofréquence) est appliquée entre les quatre barres. Les électrodes adjacentes sont portées à des potentiels opposés, tandis que les électrodes opposées sont aux mêmes potentiels. A l'intérieur du quadripôle, un champ électrodynamique est donc créé. En faisant varier de manière linéaire les tensions continues et alternatives appliquées aux électrodes, il est possible de séparer les ions en

fonction de leur masse et de leur charge. En effet, selon le potentiel appliqué, certains ions seront éliminés (« ions en non résonance »), et d'autres, auront une trajectoire leur permettant de passer entre les barres du quadripôle (« ions en résonance »). Ces derniers pourront alors atteindre le détecteur.

Dans le cas d'un triple quadripôle, le deuxième quadripôle (Q2) est uniquement soumis à un potentiel fixe de radiofréquence. Il n'a donc pas de fonction d'analyseur. L'introduction d'un gaz réactif à l'intérieur (l'argon dans le cas du TSQ® *Quantum mass spectrometer*) permet d'obtenir une pression élevée. Celle-ci favorise la collision des ions et donc, leur fragmentation.

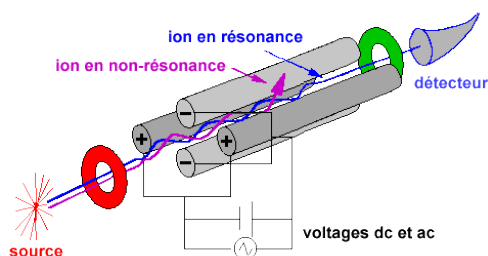


Figure 8 : Schéma d'un quadripôle : 4 barres métalliques parallèles auxquelles sont appliquées des tensions alternatives et continues (31)

1.2.2.2. Différents modes d'acquisition utilisés avec le TSQ® Quantum mass spectrometer

En spectrométrie de masse simple, deux modes d'acquisition des données sont disponibles : le mode balayage complet (« *Full scan* ») et le mode SIM (« *Single Ion monitoring* ») permettant de cibler l'acquisition sur un rapport m/z donné. En combinant ces deux modes, la spectrométrie de masse en tandem apporte ainsi la possibilité de modes d'acquisition supplémentaires, notamment le balayage des ions de fragmentation (« *Product Ion Scan* ») ou des ions parents (« *Parent Ion Scan* ») et le mode MRM (« *Multiple Reaction Monitoring* »). Pour l'étude du métabolisme du MBLI-98, nous avons utilisé les trois derniers modes cités.

1.2.2.2.1. Mode de balayage complet « Full Scan »

Lors d'une acquisition en mode balayage complet, un intervalle de rapport m/z est choisi. Tous les ions répondant à cet intervalle seront détectés (voir [Figure 9](#)). Dans ce cas, un seul quadripôle fonctionne, les autres sont inactifs. La recherche de métabolites est réalisée sans critère de sélection *a priori*, mais l'analyse des résultats est délicate.

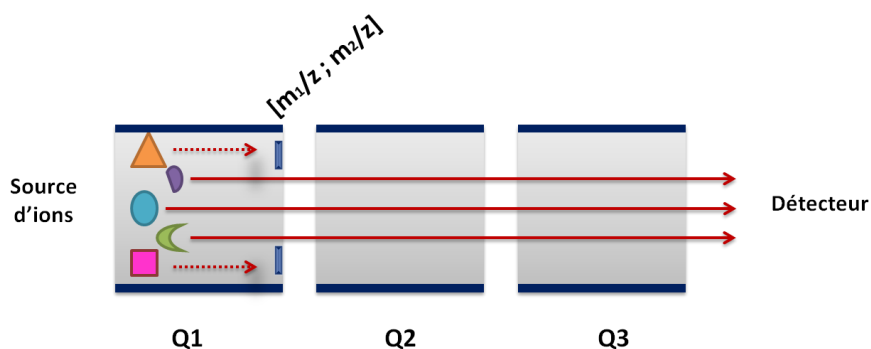


Figure 9 : Représentation schématique du mode "Full Scan"

1.2.2.2.2. Mode de suivi d'un ion sélectionné (SIM)

Lors d'une acquisition en mode *SIM*, ne seront détectés, pendant un temps de balayage donné, que les ions ayant un rapport m/z défini (voir [Figure 10](#)). Ici aussi, seul un quadripôle fonctionne. Ce mode permet d'augmenter la sélectivité et, par conséquent, la sensibilité du signal. Lors de la recherche de métabolites, les ions suivis seront définis selon les hypothèses de métabolisation envisagées.

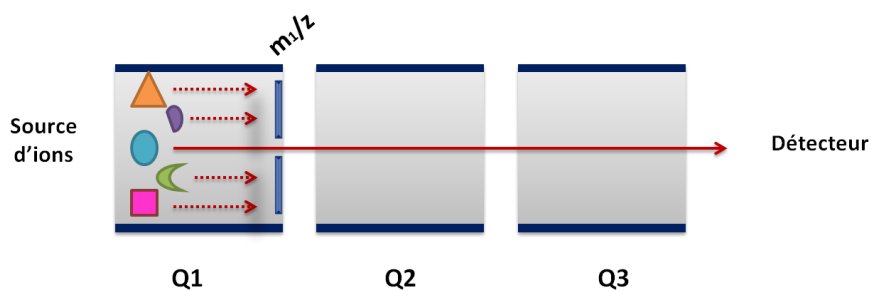


Figure 10 : Représentation schématique du mode "SIM"

1.2.2.2.3. Mode de balayage des ions fils « *Product Ion Scan* »

Lors d'une acquisition en mode « *Product Ion Scan* », ne seront détectés, pendant un temps de balayage donné, que les ions présents en Q3 appartenant à un intervalle m/z défini, provenant de la fragmentation d'un ion précurseur particulier choisi par son rapport m/z en Q1. Ce mode d'acquisition permet d'obtenir des spectres de fragmentation spécifiques des métabolites, fournissant ainsi des informations sur leur structure.

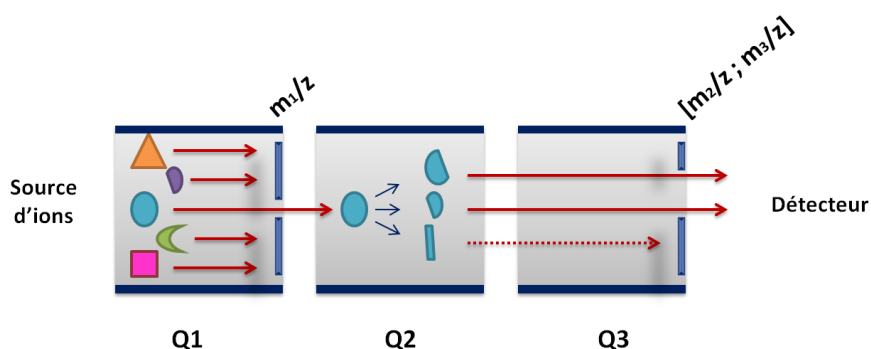


Figure 11 : Représentation schématique du mode "Product Ion Scan"

1.2.2.2.4. Mode de balayage des ions parents « *Parent Ion Scan* »

Lors d'une acquisition en mode « *Parent Ion Scan* », encore appelé « *Precursor Ion Scan* », ne seront détectés, pendant un temps de balayage donné, que les ions en Q3 ayant un rapport m/z défini provenant, lors de la fragmentation en Q2, de rapports m/z appartenant à l'intervalle défini pour le premier quadripôle. Ce mode permet de rechercher les ions parents capables de se fragmenter en un ion fils donné. Ce type d'acquisition, bien que plus couramment utilisée pour la recherche de métabolites de phase II, peut aussi être mis à profit pour la recherche de métabolites de phase I, en se basant sur les similitudes de fragmentation pouvant exister entre la molécule et ses métabolites.

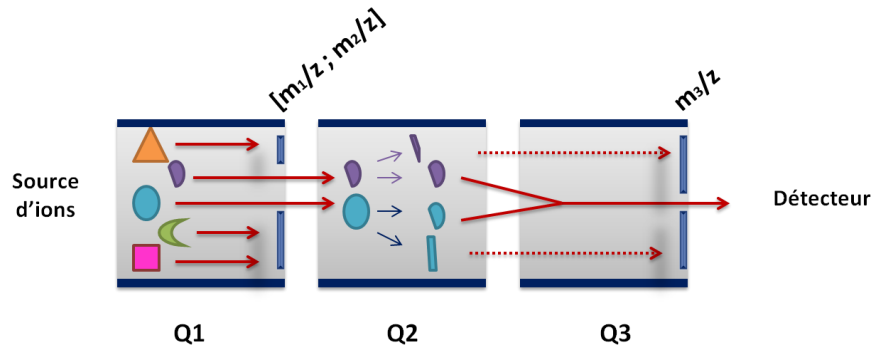


Figure 12 : Représentation schématique du mode "Parent Ion Scan"

1.2.2.2.5. Mode « *Multiple Reaction Monitoring* » (MRM)

Lors d'une acquisition en mode *MRM*, ne seront détectés que les ions en Q1 ayant un rapport m/z donné, puis, donnant, après fragmentation, un ion en Q3 de rapport m/z déterminé. Cet ion fils correspond généralement à l'ion majoritaire provenant de la fragmentation de l'ion sélectionné en Q1. Par conséquent, il est possible de suivre des transitions particulières se rapportant à des métabolites. Ce mode, extrêmement sélectif, est mis à profit dans la détermination des cinétiques du médicament et de ses métabolites.

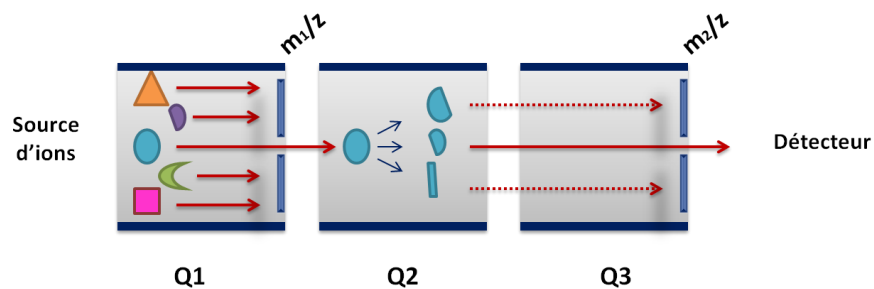


Figure 13 : Représentation schématique du mode "MRM"

1.3. Intérêt du MBLI-98

1.3.1. Généralités

Le nom « MBLI » correspond à une série de molécules synthétisées par l'équipe de *Ahcène Boumendjel* (6). Le but était de concevoir des modulateurs de pompes à efflux impliquées dans la *multidrug resistance* des cancers, et plus particulièrement des inhibiteurs d'ABGG2.

Dans la lutte anticancéreuse, le phénomène de multirésistance est un enjeu majeur. Il correspond à la résistance à différents cytotoxiques n'ayant, le plus souvent, aucune similitude structurale ou fonctionnelle entre eux (2). Ce phénomène constitue actuellement l'une des causes majeures d'échec de la chimiothérapie. Il est, le plus souvent, la conséquence du transport actif des médicaments hors de la cellule par les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) (3). Les médicaments n'ont alors pas le temps d'atteindre leur cible pour exercer leur action cytotoxique.

Les trois principaux transporteurs identifiés dans ce type de résistance sont : (i) ABCB1, plus connu sous le nom de Glycoprotéine P, (ii) ABCC1, plus connu sous le nom de MRP1, (iii) ABCG2 (4). Ce dernier est aussi nommé BCRP (*Breast Cancer Resistant Protein*) en raison de sa découverte en 1998 par *Doyle et al* (32) dans une lignée cancéreuse du sein résistante à la chimiothérapie. Dans certains cas, il peut être aussi nommé ABCP en raison de son abondance dans le placenta (33) ou MXR en raison de sa capacité à conférer une résistance cellulaire à la mitoxantrone (34).

ABCG2 est un transporteur de la famille ABC, localisé au niveau de la membrane plasmatique de la cellule, capable de transporter de manière active une grande variété de substrats : molécules hydrophobes, molécules chargées positivement ou négativement, etc. (35–37). Cela comprend l'efflux de composés cytotoxiques tels que la mitoxantrone, le

topotécan , l'étoposide, l'irinotécan, le SN-38, l'imatinib, le flavopiridol, la doxorubicine ou encore le méthotrexate, hors de la cellule cancéreuse (34,38–46). Physiologiquement présent chez l'Homme dans de nombreux tissus tels que le placenta, le foie ou encore le petit intestin, il permet de protéger les cellules contre l'accumulation de substances toxiques (35,41). Sa surexpression a cependant été identifiée comme la cause de résistances tumorales, notamment dans des cancers du sein, de l'intestin, du colon, du poumon ou de l'ovaire (32,38,39,47–50). C'est pourquoi, la mise au point d'inhibiteurs spécifiques d'ABCG2 constitue l'une des perspectives actuelles concernant la chimiothérapie anticancéreuse (51–53). Ainsi, de nombreux composés ont été identifiés comme inhibiteurs d'ABCG2. C'est le cas, entre autres, du GF120918 (élaclidar), du tariquidar, de la tectochrysin, de la fumitremorgine C et de ses analogues, d'inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'imatinib et le gefitinib ou encore de la novobiocine (54–59).

S'inspirant de la structure de deux molécules déjà connues pour leurs propriétés inhibitrices d'ABCG2, l'équipe d'*Ahcène Boumendjel* (6) a donc synthétisé deux séries de molécules dérivées des flavones et des acridones :

- une série ayant pour référence la tectochrysin (56), appelée série I
- une série ayant pour référence le GF120918 (60–63), appelée série II.

La structure générale de ces molécules est représentée à la [Figure 14](#) .

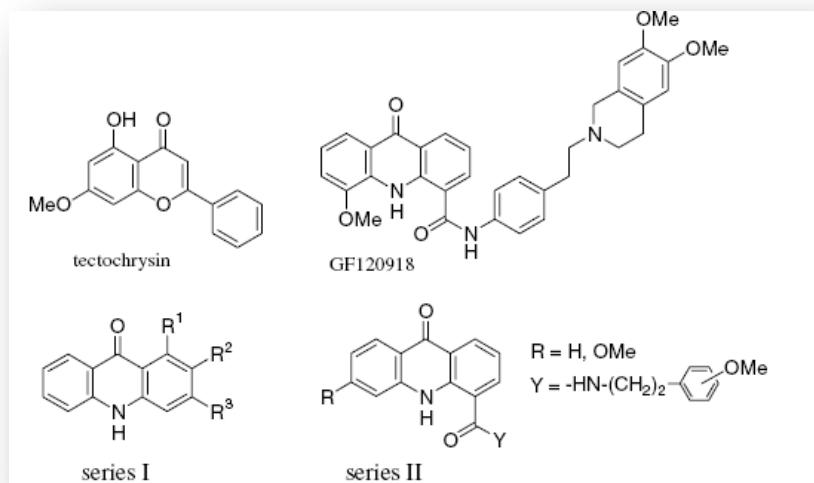


Figure 14: Structures de la tectochrysin, du GF120918 et structure générale des séries I et II (6)

Dans un premier temps, des expériences de compétition concernant l'inhibition de l'efflux de la mitoxantrone par ABCG2, montrèrent des propriétés intéressantes de certaines molécules de la série II. Ce fut notamment le cas du MBLI-87 (9-oxo-9,10-dihydroacridine-4-carboxylic acid-3,4-diméthoxyphénéthylamide ; voir [Figure 15](#)) et du MBLI-98 (6-méthoxy-9-oxo-9,10-dihydroacridine-4-carboxylic acid-3,4-diméthoxyphénéthylamide ; voir [Figure 16](#)) qui se montrèrent *in vitro* aussi efficaces que la molécule de référence GF120918 contre l'efflux de mitoxantrone médié par ABCG2 (6).

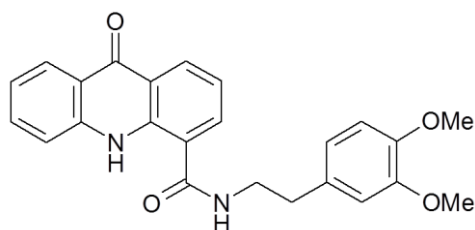


Figure 15 : Structure du MBLI-87

Dans un second temps, grâce à des études de relation structure-activité (QSAR), il a été mis en évidence une spécificité de ces molécules pour l'inhibition de la protéine

ABCG2. En effet, contrairement au GF120918, avec le MBLI-87 ou 98, ni la protéine ABCB1, ni la protéine ABCC1 ne sont touchées par l'inhibition (64).

Dans un troisième temps, des études *in vitro* et *in vivo* (7) ont été réalisées avec le MBLI-87 utilisant cette fois-ci l'irinotécan comme substrat d'ABCG2.

Lors des expériences *in vitro*, il a été montré qu'en présence de MBLI-87, l'irinotécan s'accumulait 1,7 fois plus dans la tumeur exprimant ABCG2 qu'en l'absence de MBLI-87. Par ailleurs, alors que l'irinotécan seul augmente l'expression d'ABCG2, augmentant alors le phénomène de résistance, le MBLI-87 utilisé seul ne provoque pas ce phénomène.

Concernant les études *in vivo* réalisées chez la souris, il a été démontré que le MBLI-87 seul n'avait pas d'effet sur le développement de la tumeur. Cependant, utilisé en association avec l'irinotécan en traitement discontinu (15 jours de traitement suivi de 15 jours de récupération), le MBLI-87 permet d'observer un retard de développement significatif de la tumeur durant la 2^e cure de chimiothérapie. Néanmoins, il a été relevé une augmentation de la vitesse de développement de la tumeur pendant la période sans chimiothérapie lui succédant. Ce phénomène a déjà été observé, avec le bevacizumab (Avastin[®]) lors de traitements en discontinu (65). Il semblerait qu'il n'y ait pas de bénéfice permanent lors d'un traitement discontinu. D'autre part, lors des études *in vivo*, le MBLI-87 n'a présenté aucun effet sur la pharmacocinétique de l'irinotécan et de son principal métabolite actif le SN-38.

En dehors de ces résultats encourageants, un problème de solubilité s'est posé avec le MBLI-87, nécessitant la préparation d'une suspension colloïdale afin de permettre l'injection de la molécule aux souris. Le MBLI-98 (voir [Figure 16](#)), par la présence d'un

méthoxy supplémentaire sur le noyau acridone, se montre quant à lui, beaucoup plus soluble et donc plus maniable que son analogue. C'est pourquoi, actuellement, le MBLI-98 semble plus approprié au développement d'un inhibiteur d'ABCG2.

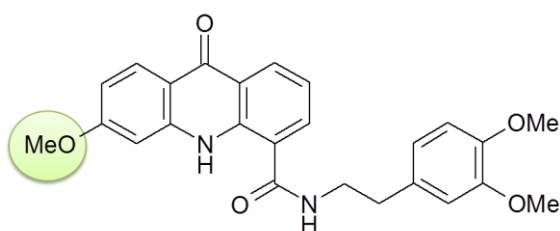


Figure 16 : Structure du MBLI-98

Si la non toxicité de cette molécule se confirmait, le MBLI-98 constituerait donc un bon candidat pour le développement futur d'une molécule permettant d'améliorer la biodisponibilité de médicaments substrats de la protéine ABCG2, leur pénétration dans le système nerveux central et leur accumulation dans des tissus cibles, notamment des tissus cancéreux (7). C'est pourquoi, une analyse plus approfondie a été entreprise, notamment l'étude de son métabolisme.

1.3.2. Dosage du MBLI par spectrométrie de masse en tandem

1.3.2.1. MBLI-87

Le MBLI-87 a une masse molaire de 402 g/mol. Il a déjà fait l'objet d'analyses par LC-MS/MS au Centre de Biologie Sud (CBS). La transition retenue est 403,2 → 222,1, en mode d'ionisation positive, pour une énergie de collision de 28 eV. La fragmentation du MBLI-87 est telle que représentée Figure 17.

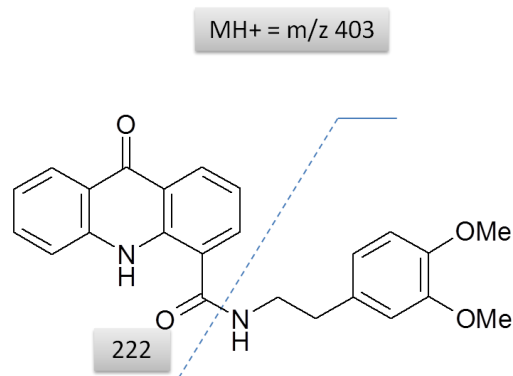


Figure 17 : Fragmentation du MBLI-87 avec une énergie de collision de 28 eV

1.3.2.2. MBLI-98

Le MBLI-98 a, lui aussi, déjà fait l'objet d'analyses par LC-MS/MS au CBS. La transition retenue est 433,2 → 252,1 en mode d'ionisation positive, pour une énergie de collision de 28 eV. La fragmentation du MBLI-98 est telle que représentée [Figure 18](#).

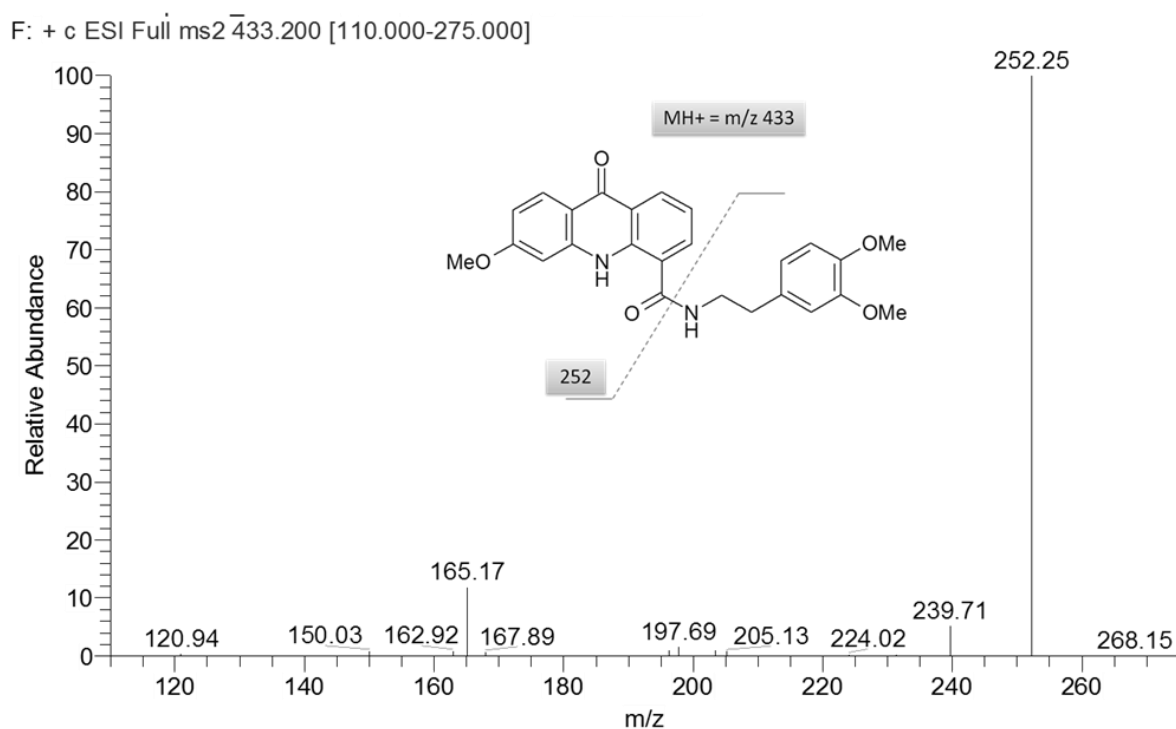


Figure 18 : Spectre de masse du MBLI-98

1.4. Etude du métabolisme de molécules ayant des motifs structuraux similaires au MBLI-98

Notre but étant d'identifier les métabolites du MBLI-98 par LC-MS/MS, nous nous sommes intéressés au métabolisme de quelques molécules structurellement similaires, notamment le resveratrol, le DMU-212, la tectochrysin et le GF120918.

1.4.1. Métabolisme du resveratrol et du DMU-212

Tout comme le MBLI-98, le resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) possède deux noyaux aromatiques, lieux de réactions du métabolisme de phase I.

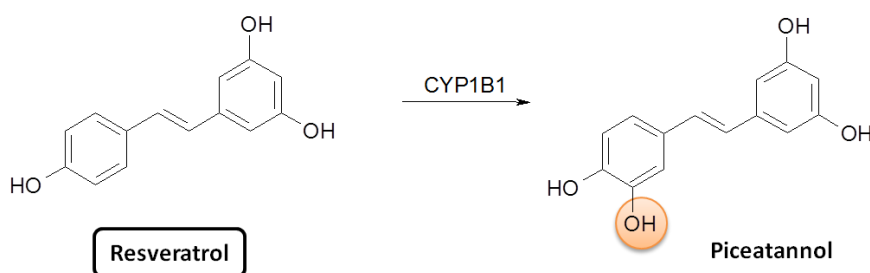


Figure 19 : Structure chimique du resveratrol et d'un de ses métabolites, le piceatannol

L'étude du métabolisme du resveratrol a été réalisée *in vitro* avec une préparation microsomale humaine surexprimant le CYP1B1 (66). Après analyse par HPLC et détection par fluorescence, deux métabolites majeurs et un mineur ont été mis en évidence. Le métabolite majeur a été identifié comme le piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxystilbène). Il proviendrait d'une hydroxylation en ortho de l'hydroxyle déjà présent sur le noyau monohydroxylé (voir [Figure 19](#)). Les autres métabolites n'ont pas pu être strictement identifiés. Il semblerait s'agir du 3,4,5,4'-tétrahydroxystilbène, provenant d'une hydroxylation sur l'autre noyau aromatique, et du 3,4,5,3',4'-pentahydroxystilbène provenant de trois hydroxylations au niveau des noyaux benzéniques.

Analogue du resveratrol, le DMU 212 (3,5,5,4'-tétraméthoxystilbène) ressemble d'avantage au MBLI-98 puisqu'ils ont un motif structural commun : le noyau benzénique substitué par des méthoxyles.

L'étude du métabolisme du DMU 212 a été réalisée *in vivo* chez la souris, et *in vitro* avec des microsomes hépatiques de souris (67). Après analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, cinq métabolites ont pu être identifiés. Ils proviennent soit d'une hydroxylation, soit d'une simple ou double O-déméthylation (voir Figure 20). Après étude sur des préparations de cytochromes P450 spécifiques d'une isoenzyme, ces métabolites ont été identifiés comme produits des cytochromes de la famille des CYP1.

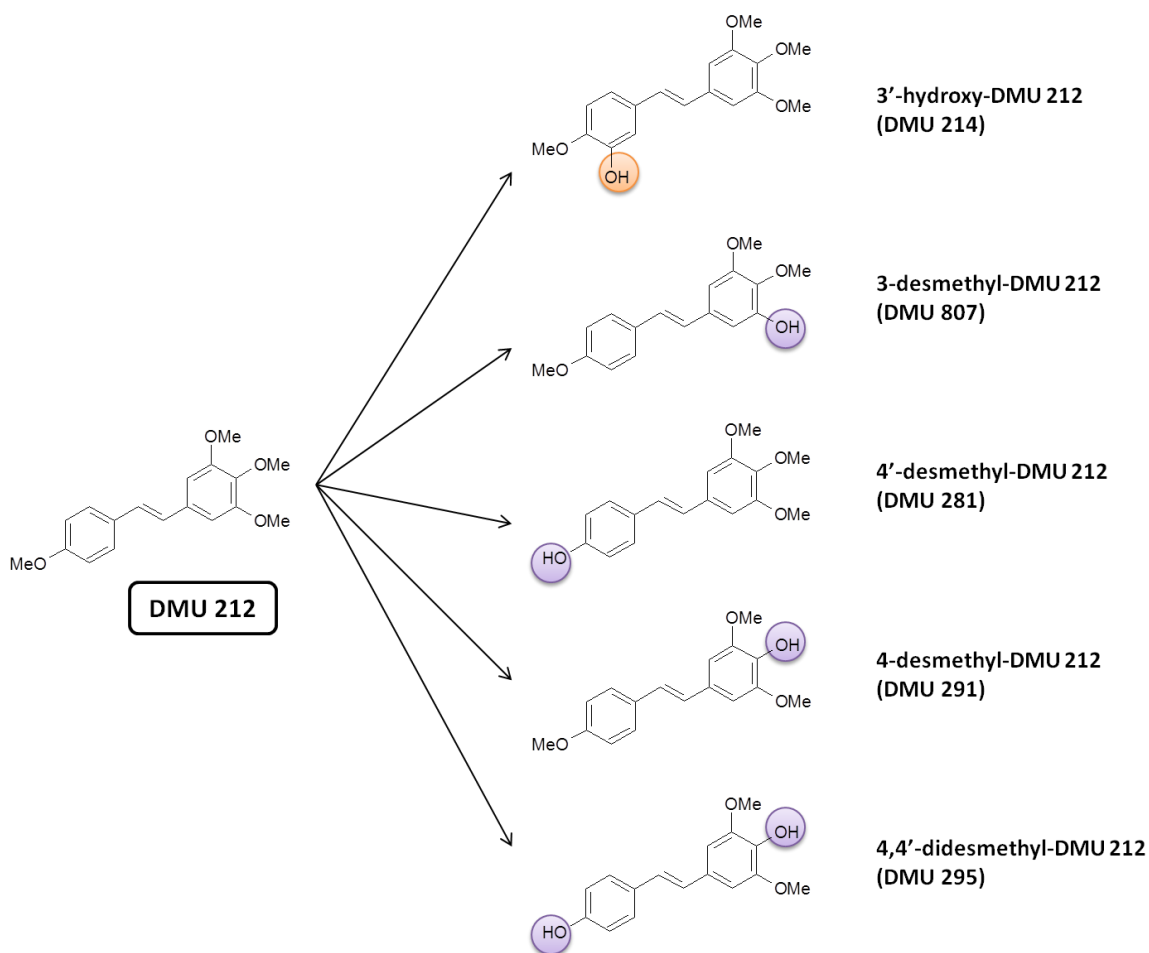


Figure 20 : Schéma de métabolisation du DMU 212

1.4.2. Métabolisme de l'émودية

La structure anthraquinone de l'émودية (1,3,8-trihydroxy-6-méthylantraquinone) est similaire au noyau acridone du MBLI-98.

L'étude du métabolisme de l'émودية a été réalisée avec des microsomes hépatiques de rats (68). Elle a permis de mettre en évidence deux métabolites (voir [Figure 21](#)) provenant pour l'un, d'une hydroxylation sur le méthyle, et pour l'autre, d'une hydroxylation sur le noyau aromatique. Concernant le deuxième métabolite, le 2-hydroxyémودية, après incubations avec différents inhibiteurs enzymatiques spécifiques, il semblerait que le cytochrome P450 1A2 soit majoritairement impliqué dans sa formation.

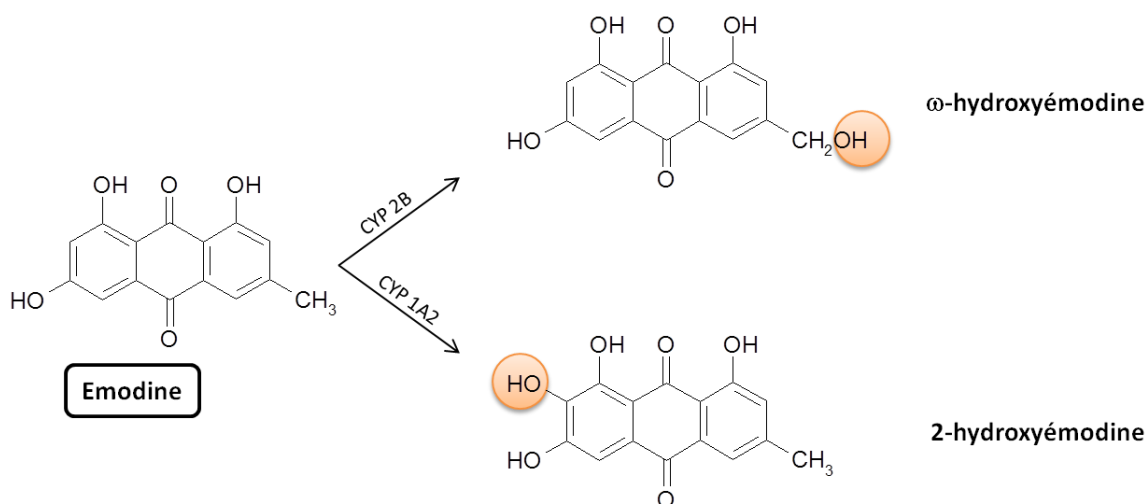


Figure 21 : Schéma de métabolisation de l'émودية

1.4.3. Métabolisme de la tectochryisine et du GF120918

La structure de la tectochryisine (5-hydroxy-7méthoxyflavone) et du GF120918 (9,10-dihydro-5-methoxy-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tétrahydro-6,7-dimethoxy-2-isoquinoliny)ethyl]phenyl]-4-acridine-carboxamide) ont tous deux inspiré la synthèse des dérivés acridones dont fait partie le MBLI-98 (6).

L'étude du métabolisme de différentes méthoxyflavones (69) avec des microsomes hépatiques humains a montré que la tectochryisine (voir [Figure 22](#)) était le composé le moins stable de toutes les méthoxyflavones testées, disparaissant entièrement après 20 minutes d'incubation (demi-vie de 4,4 minutes). Elle est soumise à un métabolisme de type oxydatif, faisant notamment intervenir les cytochromes P450 1A1, 1A2 et 3A4.

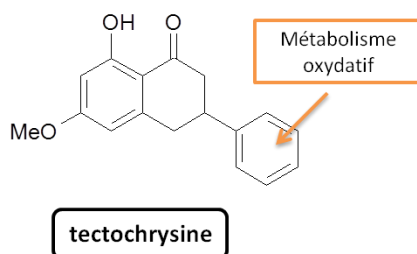


Figure 22 : Structure de la tectochryisine et lieu de métabolisation

Le GF120918 ou élacridar, est la molécule structurellement la plus proche du MBLI-98, dont le métabolisme ait été étudié. Son spectre de masse est représenté [Figure 23](#)

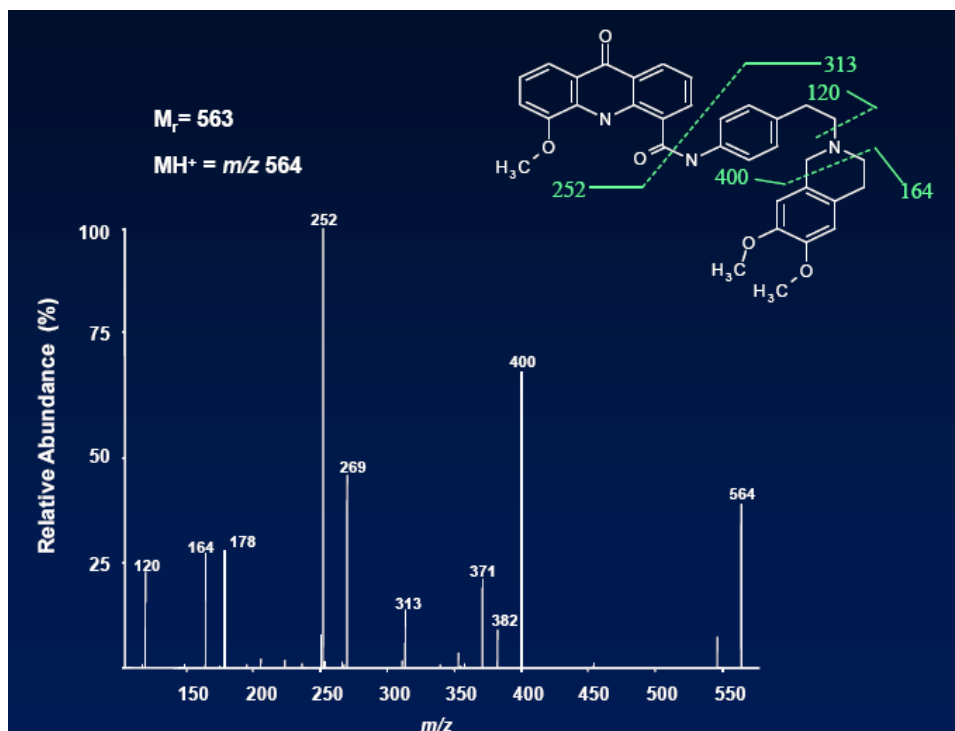


Figure 23 : Structure et spectre de masse de l'élacridar en mode d'ionisation positive

L'élacridar a été incubé avec des microsomes hépatiques humains pendant 20 minutes en présence ou absence d'inhibiteurs ou d'anticorps sélectifs d'isoenzymes (70). La formation des métabolites a été suivie par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Ainsi, la formation NADPH,H⁺-dépendante de métabolites hydroxylés et O-déméthylés a été mise en évidence (voir [Figure 24](#), [Figure 25](#) et [Figure 26](#)).

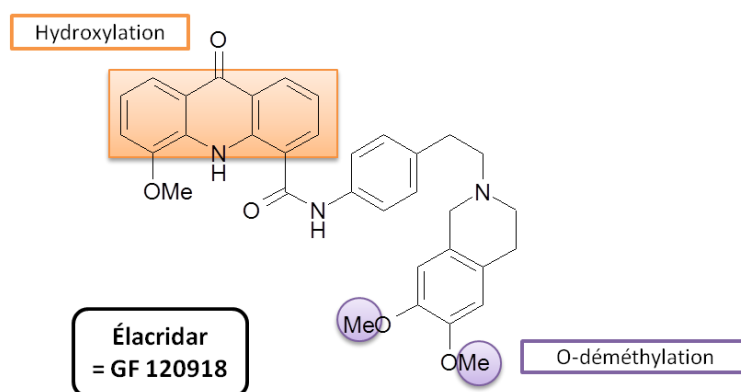


Figure 24 : Lieux de métabolisation identifiés de l'élacridar

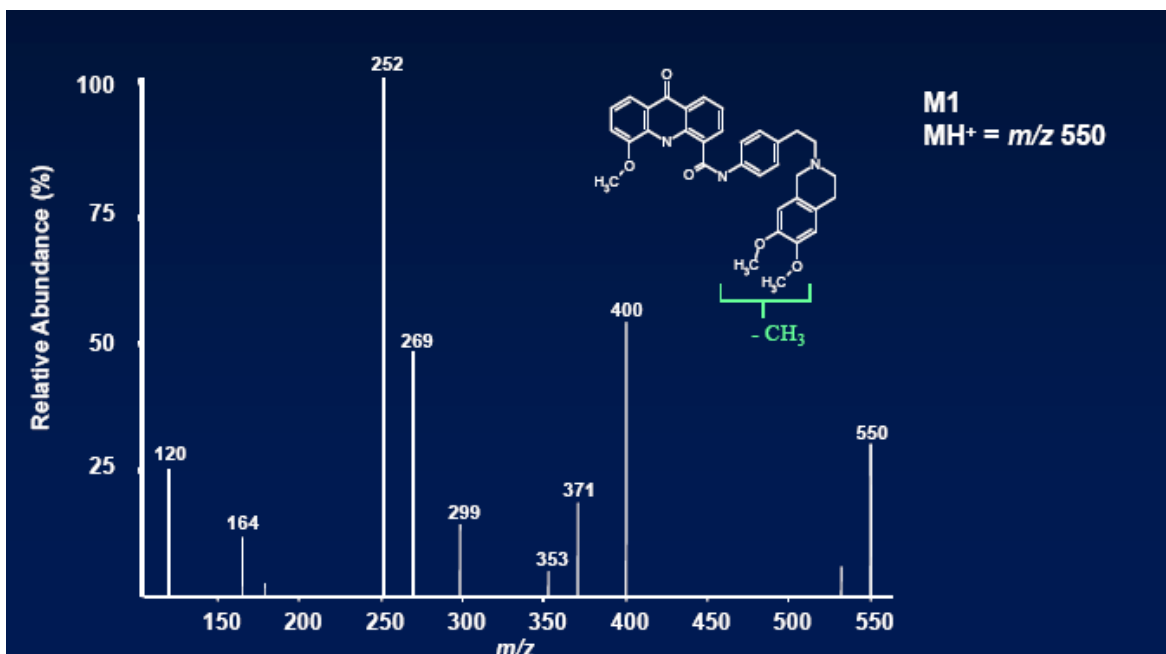


Figure 25 : Structure et spectre de masse du métabolite O-déméthylé de l'élacridar

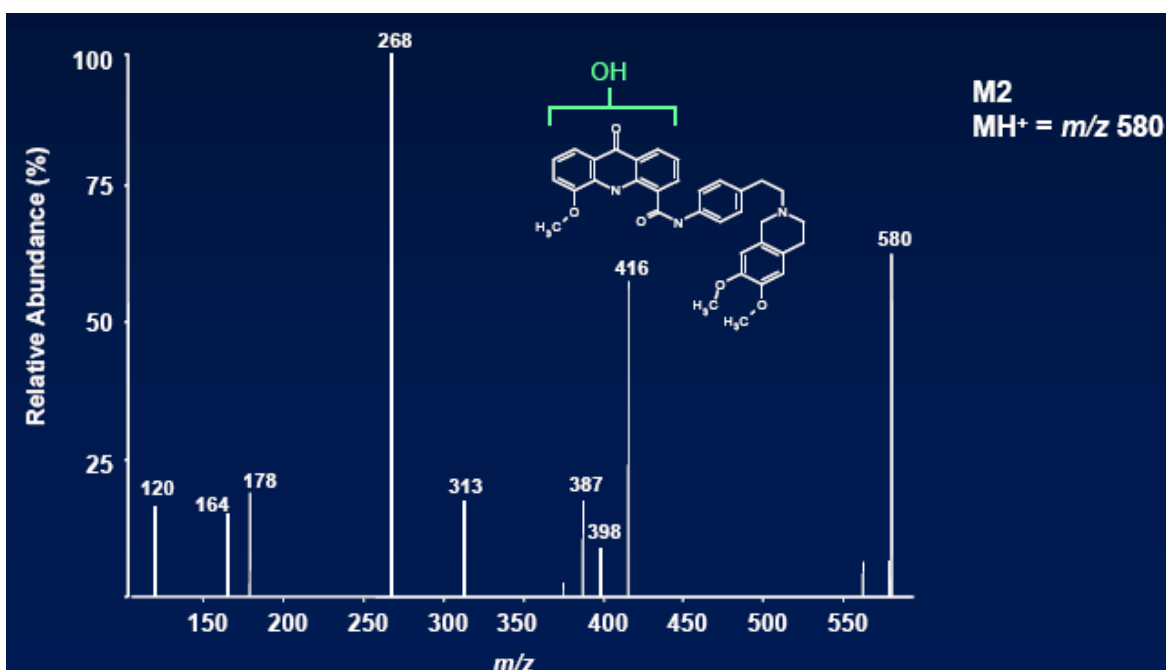


Figure 26 : Structure et spectre de masse du métabolite hydroxylé de l'élacridar

L'inhibition du CYP3A4 diminue la formation de ces métabolites alors que l'inhibition des CYP1A2, CYP2D6 et CYP2C9 n'a pas de conséquence sur la métabolisation de l'élacridar (70). L'élacridar s'est révélé, *in vitro*, inhibiteur compétitif de certaines isoenzymes P450 humaines avec des valeurs d'IC50 respectivement de 22,4 µM pour le CYP1A2, 18,5 µM pour le 2C9, 38,5 µM pour le 2C19, 49,9 µM pour le 2D6. La valeur la plus faible est de 10,5 µM pour le CYP3A4 (71).

Il a par ailleurs été mis en évidence une décroissance des concentrations d'élacridar au cours de 24h d'incubation à 37°C dans un tampon phosphate à pH 7,4. Au bout de deux heures, il était retrouvé moins de 20% de la concentration initiale, suggérant une instabilité, une insolubilité ou une liaison non spécifique de l'élacridar au verre ou au plastique (71)

MATERIELS ET METHODES

2. Matériels et méthodes

2.1. Préparation des microsomes hépatiques de souris

2.1.1. Matériels

2.1.1.1. Animaux

Pour la préparation des microsomes hépatiques, six souris CD-1 ont été sacrifiées. Il s'agissait de femelles âgées de 4 semaines et pesant environ 20 grammes.

2.1.1.2. Produits chimiques

Les produits utilisés pour l'induction enzymatique chez les souris, à savoir « GARDENAL® 40 mg/2mL, lyophilisat et solution pour usage parentéral » et « DEXAMETHASONE MYLAN® 20 mg/5mL, solution injectable » ont été fournis par la pharmacie centrale du Centre de Biologie Sud (CBS).

Le tampon d'homogénéisation a été préparé de façon à obtenir une solution contenant 1 mM de Tris HCl à pH 7,4 (référence Sigma T5941), 1 mM d'EDTA (référence Sigma ED2SS) et 0,25 M de sucrose (référence Sigma 0389).

Le tampon de stockage a été préparé de façon à obtenir une solution contenant 0,1 M de tampon phosphate (Na_2HPO_4 , KH_2) à pH 7,4, 1 mM d'EDTA et 20% de glycérol.

Pour la quantification des protéines microsomales, la solution « Biorad Protein Assay » a été utilisée, ainsi qu'une solution de BSA (= *Bovin Serum Albumine*) à 0,1%.

2.1.1.3. Appareillages

Pour l'obtention des microsomes hépatiques et de la fraction cytosolique ont été utilisées la centrifugeuse et l'ultracentrifugeuse de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP).

Pour la quantification des protéines microsomales et cytosoliques, a été utilisé le spectromètre UV du Centre Léon Bérard (CLB).

2.1.2. Méthodes

2.1.2.1. Traitement inducteur des souris et sacrifice

Afin d'induire l'expression des différents types de cytochromes et ainsi augmenter l'activité enzymatique des microsomes, un traitement sélectif a été effectué sur les souris réparties en trois groupes, 24h avant leur sacrifice. Les deux souris du groupe « TEMOINS » ont reçu chacune 100 µL d'eau par voie intrapéritonéale, les 2 souris du groupe « DEX » ont reçu chacune 1 mg de dexaméthasone (soit 250 µL de DEXAMETHASONE MYLAN® 20 mg/5mL) et les deux souris du groupe « PB » ont reçu chacune 2 mg de phénobarbital (soit 100 µL de GARDENAL® 40mg/2mL).

Au cours des 24h, aucune toxicité n'ayant été observée, les souris ont donc pu être sacrifiées afin de procéder au prélèvement du foie.

2.1.2.2. Préparation des microsomes hépatiques et de la fraction cytosolique

Cette étape a été réalisée à l'IBCP (Institut de Biologie et Chimie des Protéines) à Gerland (Lyon).

2.1.2.2.1. Principe

Le principe de la préparation des fractions microsomales et cytosoliques est basé sur une centrifugation différentielle.

Il s'agit, après plusieurs centrifugations, de récupérer dans le culot, les microsomes contenant principalement des enzymes de phase I, et, dans le surnageant, le cytosol contenant principalement des enzymes de phase II.

Les échantillons hépatiques sont ensuite aliquotés et stockés à -80°C , leur permettant de garder leur activité catalytique.

2.1.2.2.2. Protocole

La préparation des microsomes hépatiques s'est réalisée à partir des 10 g de tissu hépatique prélevés sur les six souris préalablement réparties en 3 groupes. Le protocole représenté sur le schéma suivant (voir [Figure 27](#)) a été suivi.

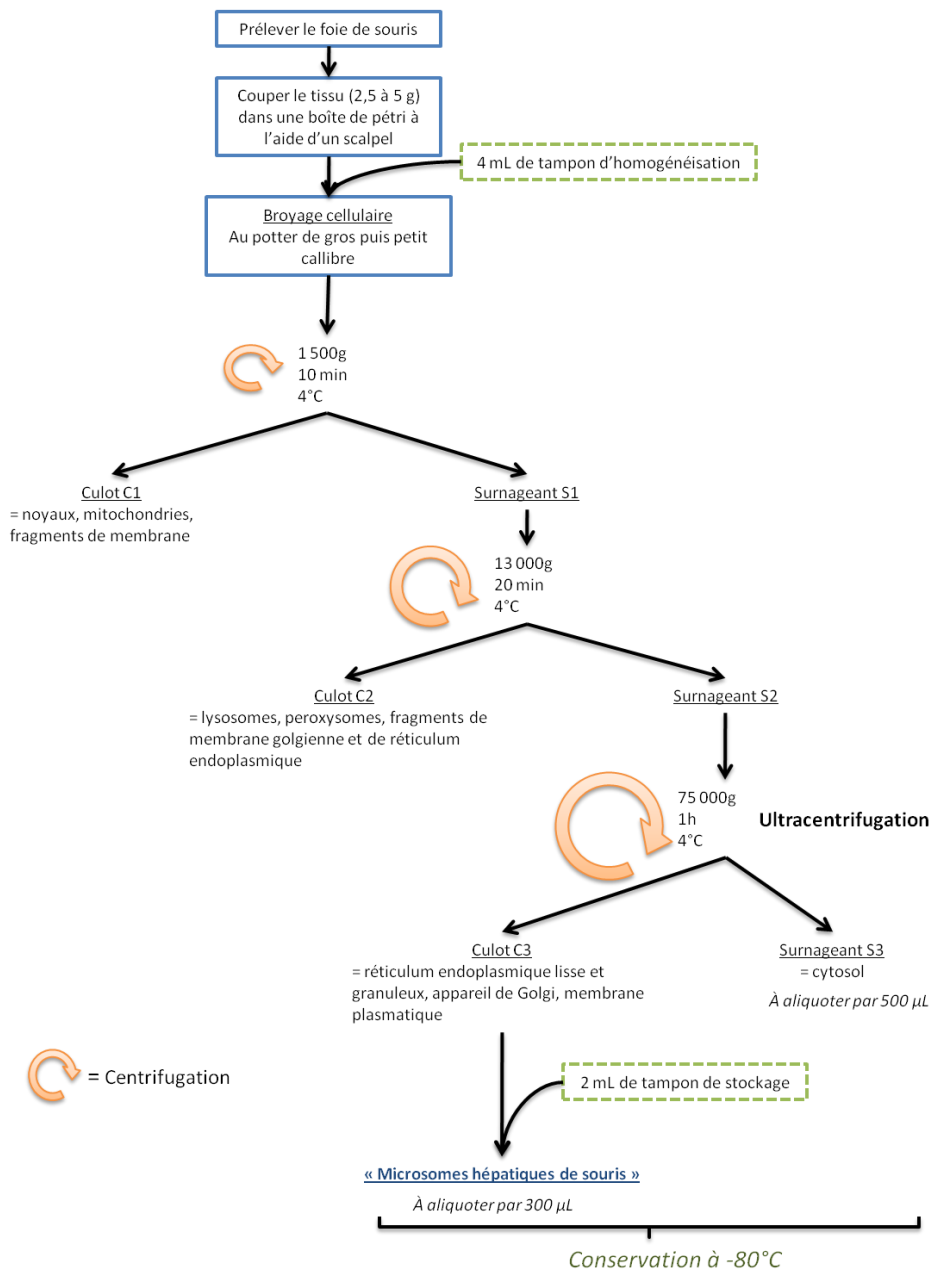


Figure 27 : Protocole de préparation des microsomes hépatiques de souris et de la fraction cytosolique à partir du tissu hépatique de souris

2.1.2.3. Quantification des protéines microsomales et cytosoliques

Cette étape a été réalisée au CLB.

2.1.2.3.1. Principe

Le principe de la quantification est basé sur la technique colorimétrique de Bradford.

Il s'agit d'un dosage colorimétrique utilisant le bleu de Coomassie. En solution, il est sous une forme cationique rouge absorbant à 470 nm. En présence de protéines, il se complexe avec les chaînes latérales des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine) ainsi que sur les fonctions amines libres de la chaîne polypeptidique, formant alors un complexe chromogène absorbant à 595 nm. Il y a donc une corrélation entre l'absorbance et la concentration protéique.

2.1.2.3.2. Protocole

Afin de réaliser la gamme d'étalonnage, les échantillons ont été préparés avec 1 mL de la solution « Biorad Protein Assay » diluée au 1/5^e dans l'eau et 0, 2, 4, 8, 12, 16 ou 20 µL de BSA 0,1%.

Pour les solutions à quantifier, les échantillons ont été préparés avec 1 mL de la solution « Biorad Protein Assay » diluée au 1/5^e dans l'eau et 2 µL de nos aliquots contenant soit la fraction microsomale, soit la fraction cytosolique.

Puis, l'ensemble des échantillons a été laissé 20 minutes dans le noir avant de lire l'absorbance à 595 nm sur l'automate du CLB (cuve de 1 mL).

2.2. Etude in vitro du métabolisme du MBLI-98

2.2.1. Matériels

2.2.1.1. Produits chimiques

L'irinotécan (CPT-11) provenant du laboratoire Pfizer est conservé à 7°C dans du méthanol. La concentration de sa solution est de 1 mg/mL (soit 1,7 mM). Le MBLI-98 et son métabolite N-déalkylé (6-méthoxy-9-oxo-9,10-dihydro-acridine-carboxamide) ont été synthétisés par l'équipe de Grenoble d'*O. Arnaud*. Ces deux composés sont conservés à 7°C dans un mélange méthanol/diméthylsulfoxyde. La concentration de ces deux solutions est de 1 mg/mL (soit 2,3 mM pour le MBLI-98 et 3,7 mM pour le métabolite). La solution de camptothécine provenant du laboratoire Fluka est conservée à 7°C. La concentration de sa solution est de 1 µg/mL (soit 2,8 µM). La solution d'ifosfamide provenant du laboratoire Sigma est conservée à 7°C. Sa concentration est de 1 mg/mL (soit 3,8 mM). La solution de cyclophosphamide provenant du laboratoire Sigma est conservée à 7°C. Sa concentration est de 1 mg/mL (soit 3,8 mM).

La troléandomycine (TAO) et le méthimazole (MTM), provenant du laboratoire Sigma sont conservés en poudre. La TAO est reconstituée dans du méthanol juste avant utilisation. Le MTM est reconstitué dans l'eau juste avant utilisation. Le glutathion (GSH) provient du laboratoire Sigma. Sa solution à 20 mM est conservée en aliquots à -80°C.

Les microsomes hépatiques de souris sont conservés à -80°C. Ils ont été obtenus en suivant le protocole détaillé dans la partie précédente (Cf. 2.1). Les concentrations des microsomes des groupes de souris « TEMOIN », « DEX » et « PB » sont respectivement de 8,93 mg/mL, 6,98 mg/mL et 9,00 mg/mL.

Les cellules hépatiques humaines HepaRG proviennent du laboratoire de culture cellulaire du Centre de Biologie Sud. Elles sont conservées à l'étuve à 37°C dans des boîtes de pétri.

Le système régénérant (*préparé avec 304 mg de G₆P et 79 mg de NADP dans 100 mL de tampon phosphate 0,2 M de pH 7,4*) est conservé à -20°C. Il contient 10 mM de Glucose-6-Phosphate (G₆P), 1 mM de NADP et une solution de tampon phosphate permettant de conserver un pH à 7,4.

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G₆Pdh), provenant du laboratoire Sigma-Aldrich est conservée à -20°C dans des aliquots de 30µL. Sa concentration est de 1,27 mg de protéines/mL.

Différentes solutions tampons ont été utilisées : la solution tampon phosphate de pH 7,4 (*préparée avec 1,34 g de KH₂PO₄ et 7,147g de Na₂HPO₄ dans 250 mL d'eau*) de concentration de 0,2 M ainsi que la solution tampon au formate d'ammonium de pH 5,7 de concentration de 2 mM. Ces deux solutions sont conservées à 7°C.

Le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'acétonitrile viennent du laboratoire Carlo Erba. L'acide formique vient du laboratoire Fluka.

Le milieu de culture utilisé pour l'incubation avec les cellules hépatiques HepaRG est le milieu « *710 growth medium* » (référence ADD710).

Nous avons par ailleurs utilisé de l'eau distillée obtenue grâce à un système Millipore Milli Q.

2.2.1.2. Appareillages

Lors des expériences, ont été utilisés le bain-marie, les centrifugeuses et l'évaporateur sous azote du CBS.

Concernant la partie analytique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, ont été utilisés :

- 2 types de colonnes : la colonne THERMO Hypersil GOLD 100 x 2,1 mm pour l'étude du métabolisme de l'irinotécan et du MBLI-98, et la colonne WATERS SunFire C18 3,5 µm 2,1 x 100 mm pour l'étude du métabolisme de l'ifosfamide,
- le *TSQ® Quantum Ultra mass spectrometer* de la firme Thermo Electron Corporation, associé au logiciel de traitement de données Xcalibur®.

2.2.2. Méthodes

2.2.2.1. Etude du métabolisme de l'irinotécan et du MBLI-98

2.2.2.1.1. Conditions d'incubation avec les microsomes

2.2.2.1.1.1. Pour l'étude du métabolisme de l'irinotécan

Le milieu d'incubation est mis au bain-marie à 37°C avec agitation élevée. Il contient 1 µg/mL (1,7 µM) d'irinotécan, entre 0,7 et 0,9 mg/mL de protéines microsomales hépatiques selon le type de microsomes utilisés (« TEMOIN », « PB » ou « DEX »), 0,4 mM de NADP, 4 mM de G₆P et 12,7 µg/mL de G₆Pdh. La réaction est démarrée par l'ajout de la G₆Pdh. Après prélèvement d'un échantillon de 1 mL dans le milieu d'incubation à différents temps, la réaction est stoppée par précipitation des protéines avec du méthanol glacé (1,8 mL de méthanol pour 1 mL de milieu d'incubation). Les échantillons sont alors placés dans la glace. Pour obtenir l'échantillon « t = 0 min », l'irinotécan est ajouté après précipitation des protéines par le méthanol.

2.2.2.1.1.2. Pour l'étude du métabolisme du MBLI 98

Le milieu d'incubation est mis au bain-marie à 37°C avec agitation élevée. Il contient 0,2 µg/mL (0,46 µM) de MBLI-98, entre 0,7 et 0,9 mg/mL de protéines microsomales hépatiques selon le type de microsomes utilisés (« TEMOINS », « PB » ou « DEX »), 0,4 mM de NADP, 4 mM de G₆P et 12,7 µg/mL de G₆Pdh. La réaction est démarrée par l'ajout simultané du MBLI-98 et de la G₆Pdh. Dans certains cas, le système régénérant et la G₆Pdh sont remplacés par une solution de tampon phosphate pH 7,4. Dans ce cas, l'incubation est démarrée lors de l'ajout du MBLI-98. Pour certaines expériences, de la troléandomycine (10 µM), du méthimazole (1 mM) ou du glutathion (7,4 mM) sont présents dans le milieu d'incubation. Lors de l'utilisation de la troléandomycine, une incubation de 10 minutes est faite avant l'ajout du MBLI-98. Après prélèvement d'un échantillon de 500 µL dans le milieu d'incubation à différents temps, la réaction est stoppée par précipitation des protéines avec du méthanol glacé (1,5 mL de méthanol pour 0,5 mL de milieu d'incubation). Les échantillons sont alors placés dans la glace. A ce moment là, 0,2 ng de camptothécine – jouant le rôle d'étalon interne – sont ajoutés. Pour obtenir l'échantillon « t = 0 min », le MBLI-98 est ajouté après précipitation des protéines par le méthanol.

2.2.2.1.1.3. Pour l'étude du métabolisme du composé M1

Le milieu d'incubation est mis au bain-marie à 37°C avec agitation élevée. Il contient 0,2 µg/mL (0,74 µM) de composé M1, 0,9 mg/mL de protéines microsomales hépatiques « PB », 0,4 mM de NADP, 4 mM de G₆P et 12,7 µg/mL de G₆Pdh. La réaction est démarrée par l'ajout de la G₆Pdh. Après prélèvement d'un échantillon de 500 µL dans le milieu d'incubation à différents temps, la réaction est stoppée par précipitation des protéines avec du méthanol glacé (1,5 mL de méthanol pour 0,5 mL de milieu d'incubation). Les échantillons sont alors placés dans la glace. A ce moment là, 0,2 ng de

camptothécine – jouant le rôle d'étalon interne – sont ajoutés. Pour obtenir l'échantillon « t = 0 min », le métabolite N-déalkylé du MBLI-98 est ajouté après précipitation des protéines par le méthanol.

2.2.2.1.2. Conditions d'incubation avec les cellules HepaRG

Pour étudier le métabolisme de l'irinotécan ou du MBLI-98, la molécule est ajoutée au milieu de culture de façon à obtenir une concentration de 5 µM. La durée d'incubation est de 1h pour l'irinotécan (témoin positif) et 30 min pour le MBLI-98. Pour stopper la réaction enzymatique, les cellules sont sorties de l'étuve et déposées sur un tapis de glace. Après prélèvement du milieu de culture, les cellules sont lavées avec 1 mL de PBS froid. Puis, 250 mL de PBS froid sont déposés dans les puits pour permettre de gratter les cellules à l'aide d'un cône en plastique. Ces 250 mL de cellules en suspension dans le PBS sont récupérés dans un eppendorff. Il est à nouveau ajouté 250 mL de PBS froid qui sont récupérés dans le même eppendorff. En attente de leur analyse, les échantillons sont conservés à -20°C.

2.2.2.1.3. Conditions pré-analytiques

2.2.2.1.3.1. Pour les échantillons de l'étude sur microsomes

Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13 000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est évaporé sous azote, permettant la reprise du résidu sec dans 500 µL d'un mélange 50/50 méthanol : eau. L'analyse chromatographique se fait sur ces solutions.

2.2.2.1.3.2. Pour les échantillons de l'étude sur cellules HepaRG

Les échantillons contenant les cellules en suspension dans le PBS sont ensuite centrifugés à 13 000g pendant 2 min à 10°C. Le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est repris dans 100 µL de méthanol. Après une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions, le surnageant est évaporé sous azote, permettant la reprise du résidu sec dans

500 µL d'un mélange 50/50 méthanol : eau. L'analyse chromatographique se fait sur ces solutions.

2.2.2.1.4. Conditions analytiques

2.2.2.1.4.1. Chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide se fait sur une colonne Hypersil GOLD 100 x 2,1 mm utilisée à basse pression (0 à 7000 psi) avec un débit de 200 µL/min. La pression minimale est fixée à 0 bar, la pression maximale à 400 bars et la pression stable est de 10 bars. L'analyse chromatographique dure 30 min.

Pour l'élution des composés, il est utilisé un solvant A contenant 0,1% d'acide formique dans l'eau ainsi qu'un solvant B contenant 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile, selon le gradient décrit ci-dessous (voir Tableau V et Figure 28).

Tableau V : Gradient de solvant utilisé lors de la chromatographie liquide avec la colonne Hypersil GOLD 100 x 2,1 mm permettant l'élution de la camptothécine, de l'irinotécan, du MBLI et de leurs métabolites.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Débit (µL/min)
0	95	5	200
2	95	5	
13	10	90	
17,5	10	90	
17,6	95	5	
30	95	5	
	100	0	

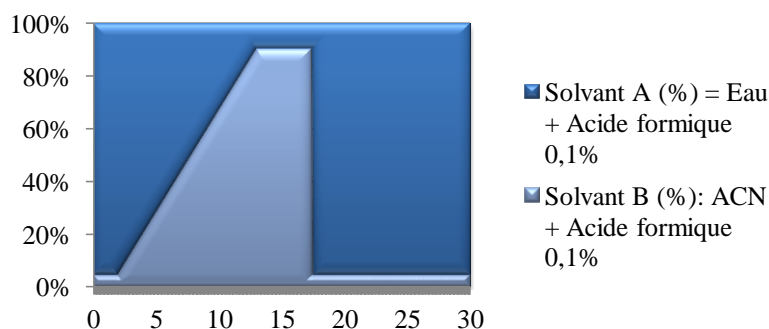


Figure 28 : Gradient de solvant utilisé lors de la chromatographie liquide avec la colonne Hypersil GOLD 100 x 2,1 mm permettant l'élution de la camptothécine, de l'irinotécan, du MBLI et de leurs métabolites

2.2.2.1.4.2. Spectrométrie de masse

La détection des composés se fait par spectrométrie de masse en tandem. La source de type ESI ainsi que le mode d'ionisation positive sont utilisés.

Les transitions *MRM* permettant d'identifier l'irinotécan et ses métabolites (APC, NPC et SN-38) sont résumées dans le tableau suivant (voir Tableau VI).

Tableau VI : Transitions *MRM* utilisées en LC-MS/MS pour la détection de l'irinotécan et de ses métabolites (APC, NPC et SN-38)

Molécule	Q1		Q3	Energie de collision (eV)
Irinotécan	587,3	→	124,0	40
APC	619,3	→	393,1	35
NPC	519,2	→	393,1	35
SN-38	393,0	→	349,1	30

Les transitions *MRM* permettant d'identifier la camptothécine (étalon interne) et le MBLI-98 sont résumées dans le tableau suivant (voir Tableau VII).

Tableau VII : Transitions *MRM* utilisées en LC-MS/MS pour la détection de la camptothécine, du MBLI-98 et de son métabolite N-déalkylé

Molécule	Q1		Q3	Energie de collision (eV)
Camptothécine	349,1	→	305,1	30
MBLI-98	433,2	→	252,1	28
Métabolite N-déalkylé du MBLI-98	269	→	252	28

2.2.2.2. Etude du métabolisme de l'ifosfamide et étude des propriétés inhibitrices du CYP 3A4 de la troléandomycine et du MBLI-98 vis-à-vis de la métabolisation de l'ifosfamide

2.2.2.2.1. Conditions d'incubation

2.2.2.2.1.1. Pour l'étude du métabolisme de l'ifosfamide

Le milieu d'incubation est mis au bain-marie à 37°C avec agitation élevée. Il contient 2 mg/mL (soit 77 µM) d'ifosfamide, 0,9 mg/mL de protéines microsomales

hépatiques (microsomes « PB »), 0,4 mM de NADP, 4 mM de G₆P et 12,7 µg/mL de G₆Pdh. La réaction est démarrée par l'ajout de l'ifosfamide. Après prélèvement d'un échantillon de 500 µL dans le milieu d'incubation à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 minutes), la réaction est stoppée par précipitation des protéines avec de l'acétonitrile glacé (1 mL d'acétonitrile pour 0,5 mL de milieu d'incubation). Les échantillons sont alors placés dans la glace. A ce moment là, 5 µg de cyclophosphamide – jouant le rôle d'étalon interne – sont ajoutés.

2.2.2.2.1.2. Pour le calcul de l'IC₅₀ de la troléandomycine (TAO) et du MBLI-98

Le milieu d'incubation est le même que précédemment. Selon le cas, est ajouté une solution de TAO permettant d'obtenir, lors de l'incubation à 37°C, des concentrations de TAO entre 0,07 et 6,1 µM ou une solution de MBLI-98 afin d'obtenir, lors de l'incubation, des concentrations entre 0,04 et 20 µM.

2.2.2.2.2. Conditions pré-analytiques

Après ajout de l'étalon interne, 4 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés à chacun des échantillons qui sont ensuite agités lentement pendant 15 minutes. Les échantillons sont centrifugés à 2643 rpm pendant 10 min à 4°C. La phase d'acétate d'éthyle est récupérée et mise à évaporer sous azote, permettant la reprise du résidu sec dans 500 µL d'un tampon au formate d'ammonium de pH 5,7. L'analyse chromatographique se fait sur ces solutions.

2.2.2.2.3. Conditions analytiques

2.2.2.2.3.1. Chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide se fait sur une colonne WATERS SunFire C18 3,5 µm (2,1 x 100 mm) utilisée à basse pression (0 à 7000 psi) avec un débit de 200 µL/min. La

pression minimale est fixée à 0 bar, la pression maximale à 400 bars et la pression stable est de 10 bars. L'analyse chromatographique dure 17 min.

Pour l'élution des composés, il est utilisé comme solvant A une solution de formate d'ammonium à 2 mM de pH 5,7 et comme solvant B du méthanol, selon le gradient décrit ci-après (voir [Tableau VIII](#) et [Figure 29](#)).

Tableau VIII : Gradient de solvant utilisé lors de la chromatographie liquide avec la colonne WATERS SunFire C18 3,5 µm (2,1 x 100 mm) permettant l'élution du cyclophosphamide, de l'ifosfamide et de ses métabolites.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Débit (µL/min)
0	95	5	200
3	95	5	
8	10	90	
11	10	90	
11,1	95	5	
17	95	5	
	100	0	

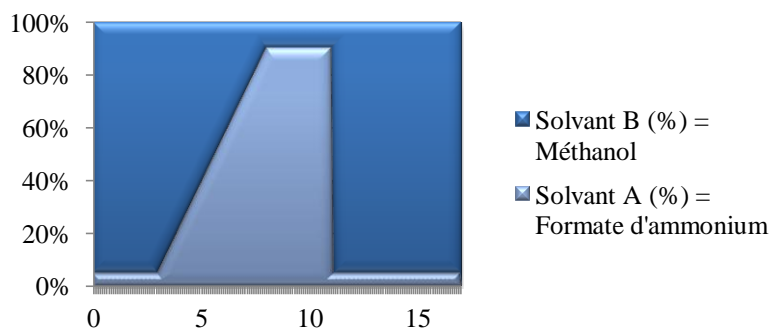


Figure 29 : Gradient de solvant utilisé lors de la chromatographie liquide avec la colonne WATERS SunFire C18 3,5 µm (2,1 x 100 mm) permettant l'élution du cyclophosphamide, de l'ifosfamide et de ses métabolites.

2.2.2.2.3.2. *Spectrométrie de masse*

La détection des composés se fait par spectrométrie de masse en tandem. La source de type ESI ainsi que le mode d'ionisation positive sont utilisés.

Les transitions *MRM* permettant d'identifier l'ifosfamide et ses métabolites (2-déchloroifosfamide, 3-déchloroifosfamide, isophosphoramidate, 4-kétoifosfamide, carboxyifosfamide, 4-hydroxyifosfamide) sont résumées dans le [Tableau IX](#).

Tableau IX : Transitions *MRM* utilisées en LC-MS/MS pour la détection du cyclophosphamide, de l'ifosfamide et de ses métabolites (*2-déchloroifosfamide*, *3-déchloroifosfamide*, *isophosphoramide*, *4-kétoifosfamide*, *carboxyifosfamide*, *4-hydroxyifosfamide*)

Molécule	Q1		Q3	Energie de collision (eV)
Cyclophosphamide	261	→	140	20
Ifosfamide	261	→	232,8	25
<i>2-déchloroifosfamide</i>	199	→	92	26
	199	→	154	23
	199	→	171	18
<i>3-déchloroifosfamide</i>	199	→	171	20
	199	→	78	23
<i>Isophosphoramide</i>	221	→	80	20
<i>4-kétoifosfamide</i>	275	→	221	20
	277	→	223	20
<i>4-hydroxyifosfamide</i>	279	→	221	15
<i>Carboxyifosfamide</i>	293	→	221	17
	295	→	223	17

RESULTATS - DISCUSSION

3. Résultats - Discussion

3.1. Obtention des fractions subcellulaires

3.1.1. Quantification des protéines microsomales et cytosoliques

La gamme, réalisée avec l'albumine sérique bovine (BSA), dont la concentration en protéines est connue, a donné les résultats d'absorbance, regroupés dans le Tableau X.

Tableau X : Absorbance de la gamme d'étalonnage

Volume total (mL)	Volume de BSA à 0,1% (µL)	Concentration de BSA dans l'échantillon dilué (µg/mL)	Absorbance
1	0	0	0
1	2	2	0,0931
1	4	4	0,1839
1	8	8	0,3797
1	12	12	0,5894
1	16	16	0,7512
1	20	20	0,9215

Ainsi, nous avons obtenu la droite d'étalonnage (voir Figure 30) donnant la relation entre l'absorbance et la concentration en protéines dans l'échantillon dilué. Son coefficient de corrélation est proche de 1. La détermination des concentrations en protéines est réalisable selon l'équation $y = 0,047x - 0,0010194$ (y étant l'absorbance et x la concentration en protéines exprimée en µg/mL dans l'échantillon dilué).

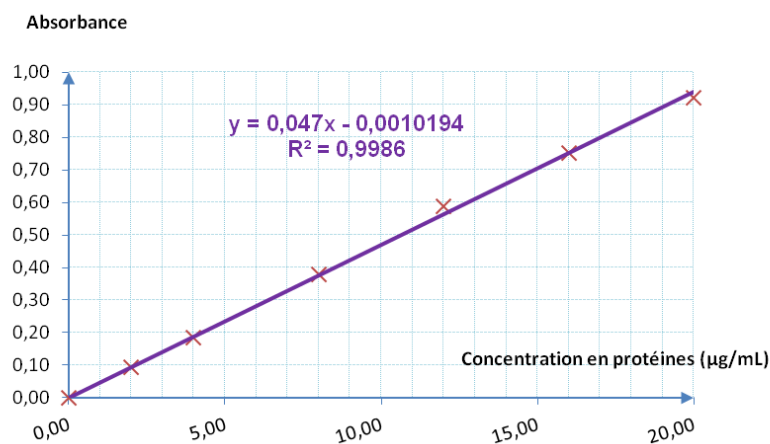


Figure 30 : Droite d'étalonnage pour la quantification des protéines microsomales et cytosoliques

Les absorbances des six échantillons dilués ainsi que les concentrations des aliquots des fractions microsomales et cytosoliques sont regroupées dans le Tableau XI.

Tableau XI : Concentrations protéiques des échantillons des protéines microsomales et cytosoliques

Echantillons	Volume total (mL)	Volume des échantillons (µL)	Absorbance	Concentration (mg/mL)
Microsomes « TEMOIN »	1	2	0,8363	8,93
Microsomes « DEX »	1	2	0,6542	6,98
Microsomes « PB »	1	2	0,8428	9,00
Cytosol « TEMOIN »	1	2	1,3030	13,98
Cytosol « DEX »	1	2	1,3464	14,37
Cytosol « PB »	1	2	1,1898	12,69

Les concentrations en protéines des microsomes et du cytosol de nos trois types d'échantillons « TEMOIN, DEX et PB » sont du même ordre de grandeur, aux alentours de 7-8 mg/mL pour les microsomes et 13-14 mg/mL pour le cytosol.

3.1.2. Vérification du fonctionnement des microsomes hépatiques

Afin de vérifier le fonctionnement des microsomes hépatiques de souris préparés précédemment, des expériences ont été réalisées en prenant pour substrat l'irinotécan (CPT-11).

Pour rappel, le métabolisme de l'irinotécan est représenté [Figure 31](#).

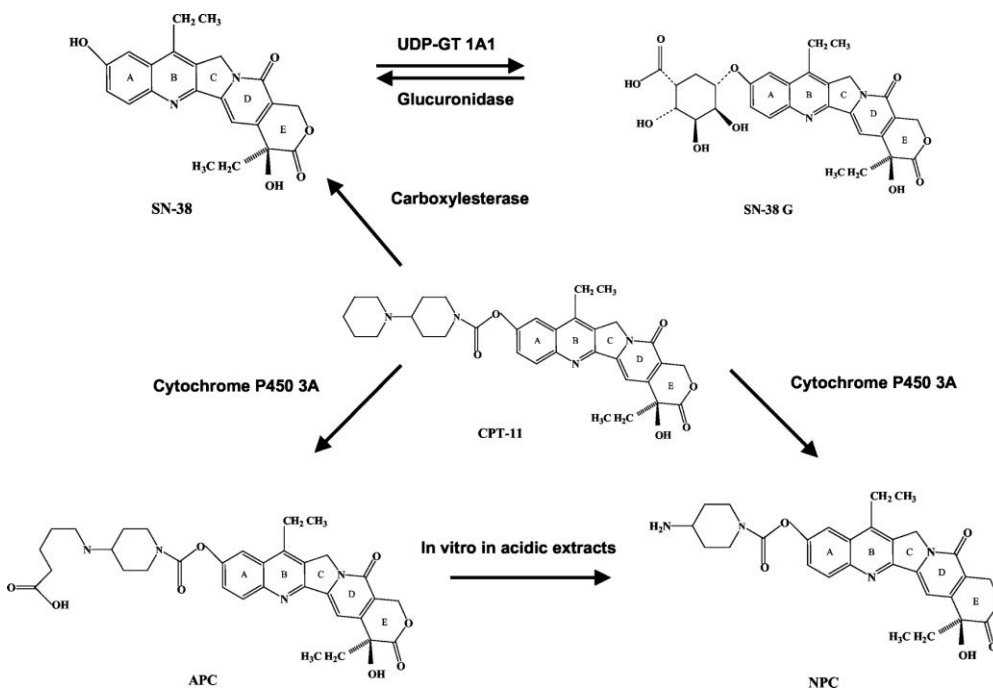


Figure 31 : Structure chimique de l'irinotécan (CPT-11) et de ses métabolites majeurs (72)

Quel que soit le type de microsomes utilisé, après apport de NADPH, H^+ au milieu d'incubation, une diminution de la concentration en substrat est observée (voir [Figure 32](#)). De même, nous avons observé une apparition croissante des métabolites de phase I : SN-38 (voir [Figure 33](#)), NPC (voir [Figure 34](#)) et APC (voir [Figure 35](#)). Le SN-38 est le métabolite majoritaire.

Par ailleurs, les résultats obtenus montrent une consommation plus rapide de l'irinotécan lors des incubations avec les microsomes prétraités par la dexaméthasone et par le phénobarbital.

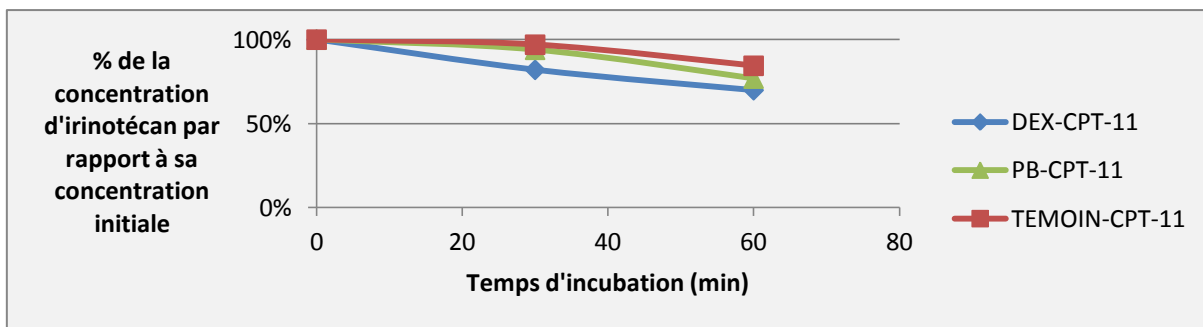


Figure 32 : Consommation de l'irinotécan (CPT-11) en présence de microsomes hépatiques de souris (sans prétraitement "TEMOIN", avec prétraitement par la dexaméthasone "DEX" ou par phénobarbital "PB")

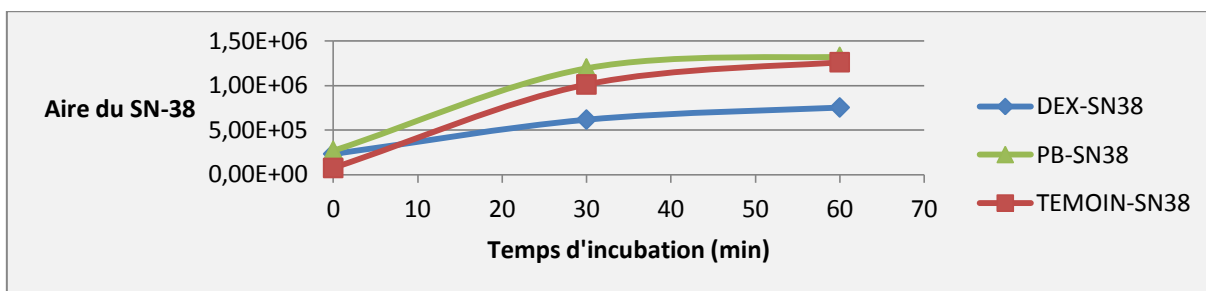


Figure 33 : Apparition du métabolite SN-38 de l'irinotécan en présence de microsomes hépatiques de souris (sans prétraitement "TEMOIN", avec prétraitement par la dexaméthasone "DEX" ou par phénobarbital "PB")

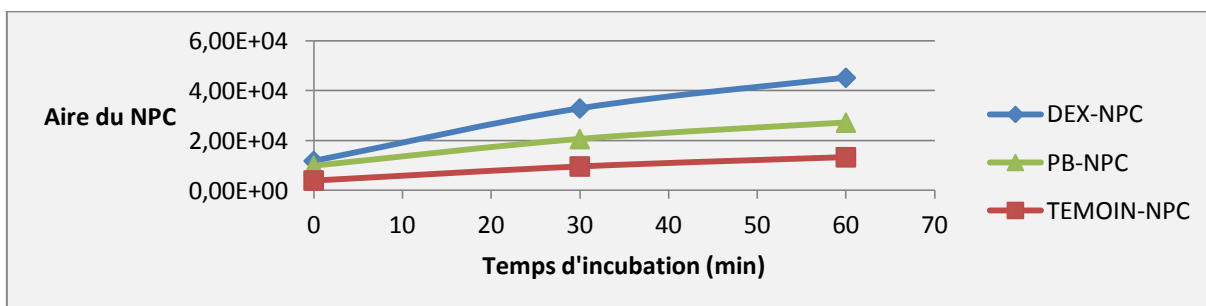


Figure 34 : Apparition du métabolite NPC de l'irinotécan en présence de microsomes hépatiques de souris (sans prétraitement "TEMOIN", avec prétraitement par la dexaméthasone "DEX" ou par phénobarbital "PB")

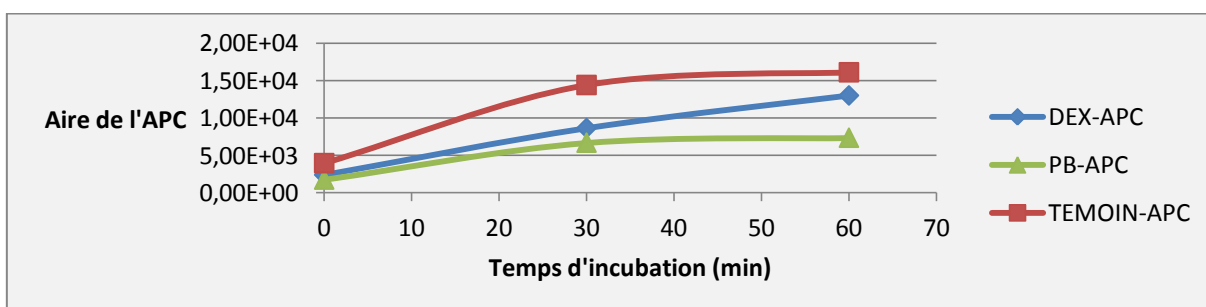


Figure 35 : Apparition du métabolite APC de l'irinotécan en présence de microsomes hépatiques de souris (sans prétraitement "TEMOIN", avec prétraitement par la dexaméthasone "DEX" ou par phénobarbital "PB")

3.1.3. Discussion

Les concentrations en protéines microsomales et cytosoliques de nos préparations sont du même ordre de grandeur que celles retrouvées dans la littérature (22,73). Les principales protéines retrouvées dans les fractions subcellulaires correspondent aux enzymes du métabolisme, notamment les cytochromes P450. Nos microsomes hépatiques de souris, sont donc utilisables, après ajout d'un système permettant la formation de NADPH,H⁺, pour étudier le métabolisme de phase I du MBLI-98. Les réactions de phase II pourraient, dans un second temps, être réalisées, en apportant les cofacteurs nécessaires aux enzymes de phase II présentes dans l'une ou l'autre des fractions subcellulaires.

En apportant du NADPH,H⁺, cofacteur des cytochromes P450, l'apparition des métabolites de l'irinotécan démontre le bon fonctionnement de nos microsomes. L'irinotécan étant métabolisé, en partie, par les CYP 3A (72), il est normal d'observer une consommation plus rapide du substrat avec les microsomes prétraités par la dexaméthasone, ayant préalablement induit une surexpression de l'isoforme 3A (24). De la même façon, le prétraitement par le phénobarbital induit lui aussi, de façon minoritaire, la surexpression de l'isoforme 3A (23). Ceci explique pourquoi la vitesse de métabolisation de l'irinotécan avec les microsomes « PB » est plus élevée qu'avec les microsomes non prétraités.

3.2. Hypothèses préalables à l'étude du métabolisme du MBLI-98

3.2.1. Hypothèses concernant la métabolisation du MBLI-98

Compte tenu de la structure du MBLI-98, différentes hypothèses de métabolisation ont été envisagées (voir Figure 36) :

- une O-déméthylation sur un ou plusieurs méthoxyles,
- une ou plusieurs hydroxylations sur un des 3 cycles benzéniques ou, éventuellement, sur la fonction amine secondaire (N-oxydation),
- une N-déalkylation,
- une réduction de la cétone en alcool.

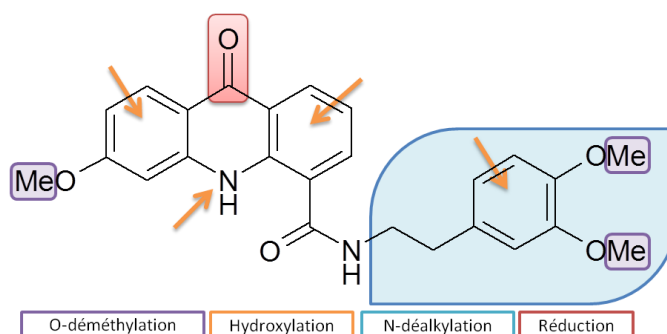


Figure 36 : Structure chimique du MBLI-98 et différentes possibilités de métabolisation (O-déméthylation, hydroxylation, N-déalkylation ou réduction)

Les métabolites du MBLI-98 sont analysés par spectrométrie de masse en tandem en mode d'ionisation positive après séparation par chromatographie liquide.

Dans le cas d'une **O-déméthylation**, le métabolite aura une masse de 418 g/mol, donnant un ion MH⁺ de rapport m/z égal à 419 lors de l'analyse.

Dans le cas d'une **hydroxylation**, le métabolite aura une masse de 448 g/mol, donnant un ion MH⁺ de rapport m/z égal à 449.

Dans le cas d'une **N-déalkylation**, le métabolite aura une masse de 268 g/mol, donnant un ion MH⁺ de rapport m/z égal à 269.

Enfin, dans le cas d'une **réduction** de la cétone en alcool, le métabolite aura une masse de 434 g/mol, donnant un ion MH⁺ de rapport m/z égal à 435 g/mol.

Les rapports m/z des métabolites envisagés après une première réaction de métabolisation, sont regroupés Figure 37.

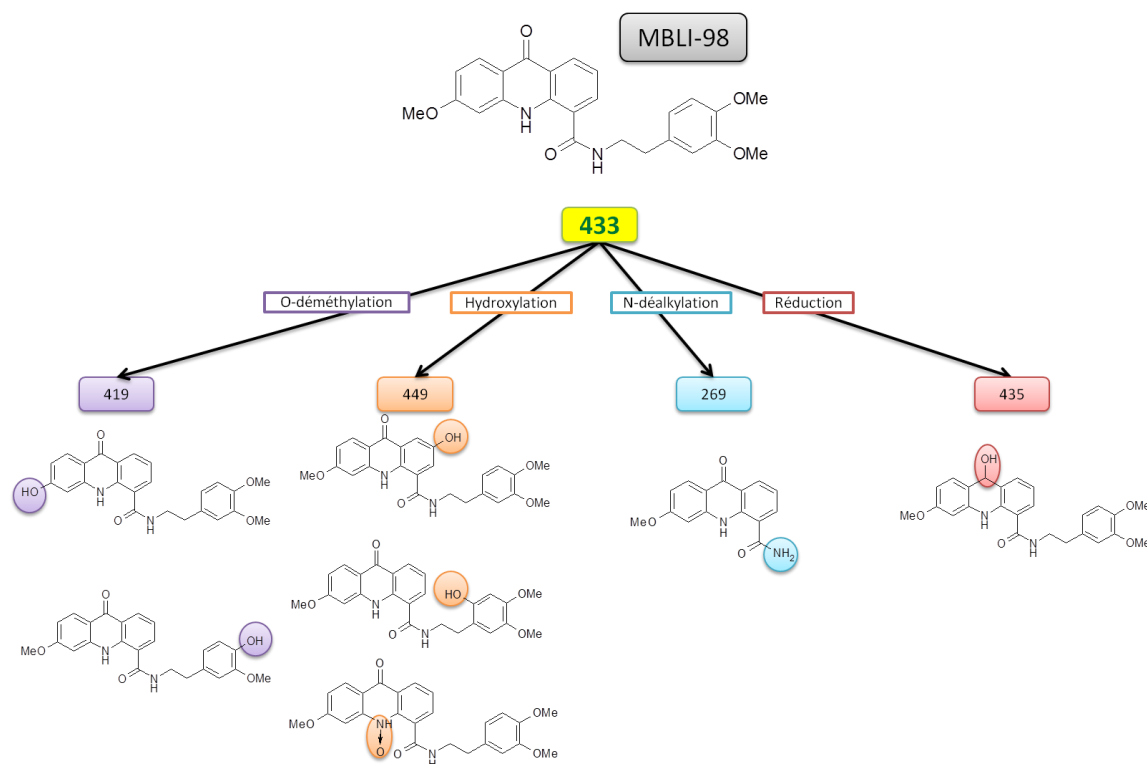


Figure 37 : Hypothèses sur les rapports m/z retrouvés en Q1 dans le spectromètre de masse en tandem, pouvant correspondre à des métabolites du MBLI-98 (MH⁺ = 433,2)

Les métabolites formés par cette première étape pourraient, dans un second temps, être à leur tour pris en charge par les cytochromes P450 pour former des métabolites secondaires.

Après une première O-déméthylation ou une première hydroxylation, il est à nouveau possible d'avoir une O-déméthylation, une hydroxylation, une N-déalkylation, ou une réduction de la cétone en alcool (voir Figure 38 et Figure 39).

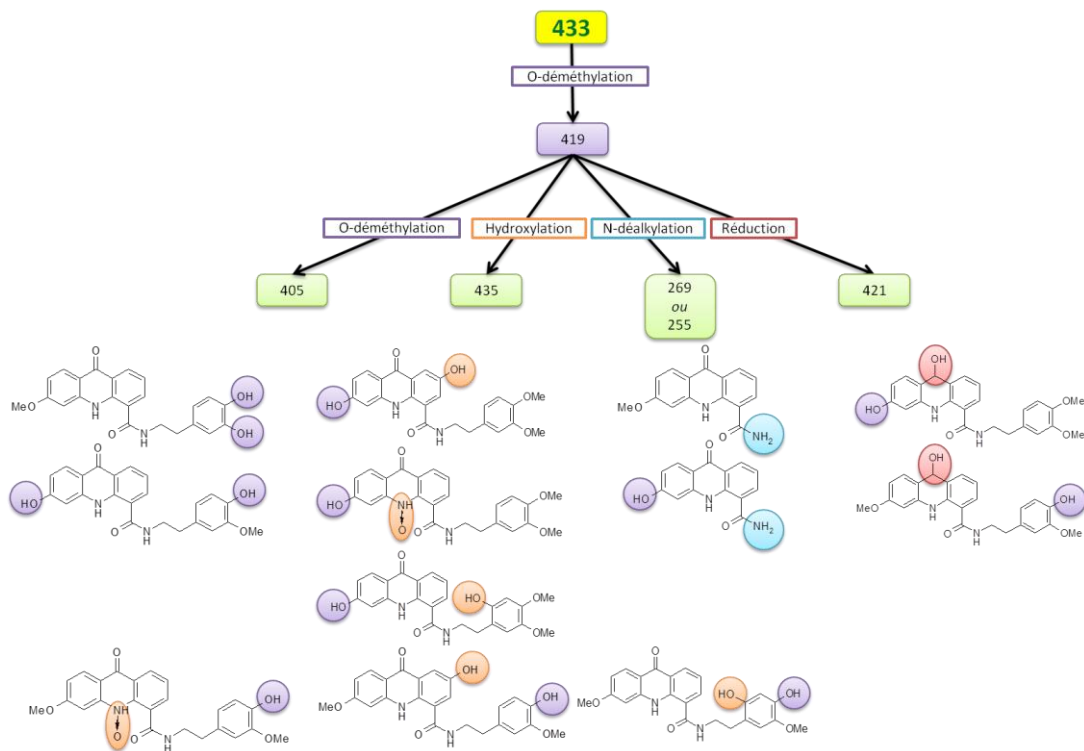


Figure 38 : Hypothèses sur les rapports m/z retrouvés en Q1 dans le spectromètre de masse en tandem, pouvant correspondre aux métabolites secondaires d'un métabolite O-déméthylé du MBLI-98 (MH+ = 419)

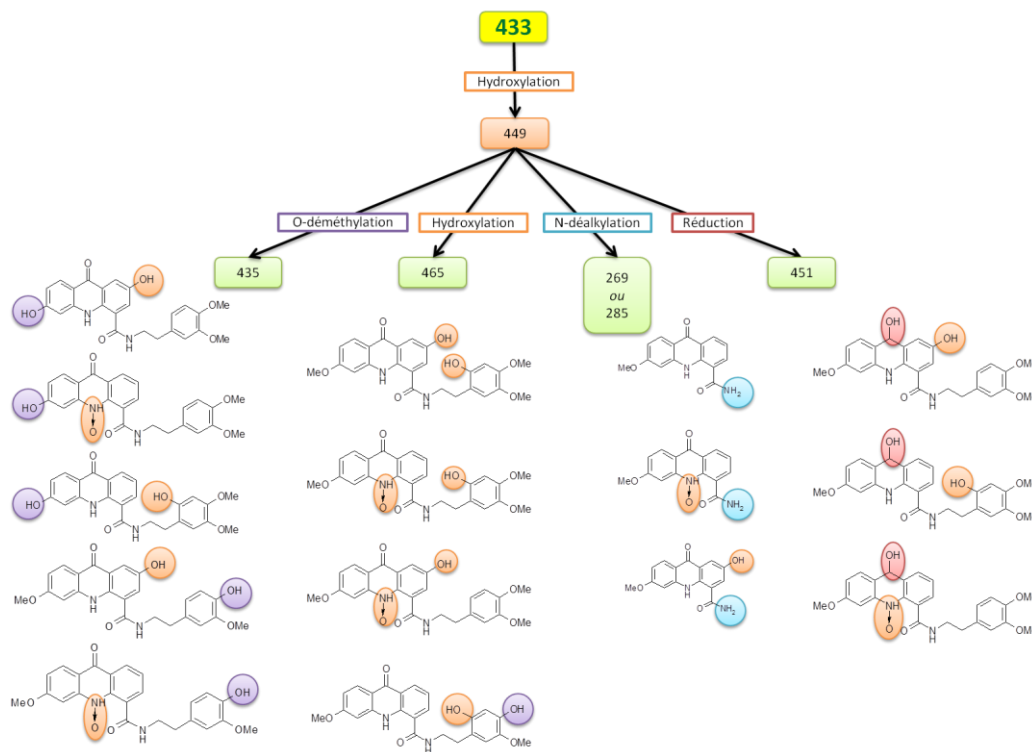


Figure 39 : Hypothèses sur les rapports m/z retrouvés en Q1 dans le spectromètre de masse en tandem, pouvant correspondre aux métabolites secondaires d'un métabolite hydroxylé du MBLI-98 (MH+ = 449)

Le métabolite N-déalkylé peut être O-déméthylé, hydroxylé ou réduit (voir [Figure 40](#)). Le métabolite provenant de la réduction de la fonction cétone en alcool peut, quant à lui, être O-déméthylé, hydroxylé ou N-déalkylé (voir [Figure 41](#)).

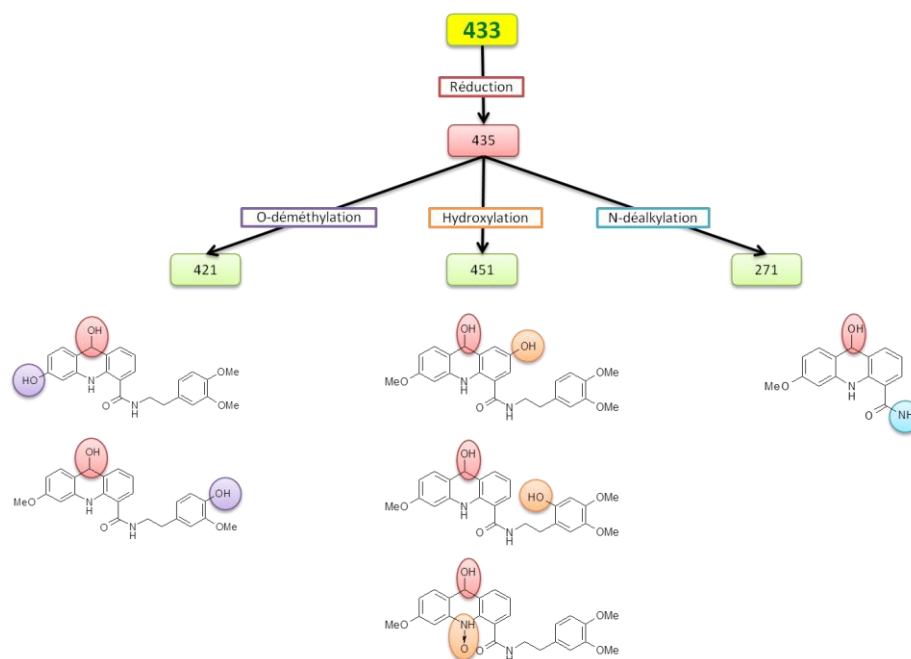


Figure 40 : Hypothèses sur les rapports m/z retrouvés en Q1 dans le spectromètre de masse en tandem, pouvant correspondre aux métabolites secondaires du métabolite du MBLI-98 dont la fonction cétone a été réduite en alcool (MH+ = 435)

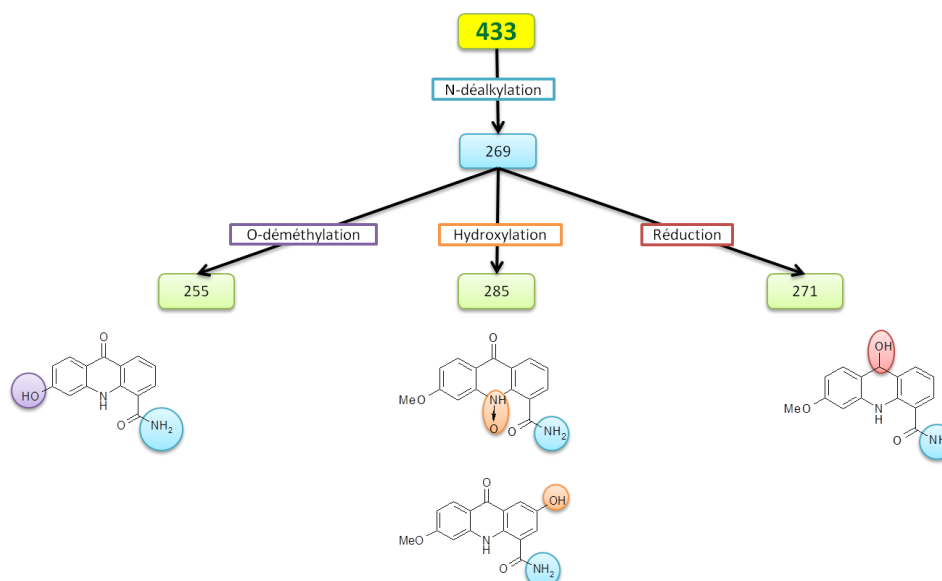


Figure 41 : Hypothèses sur les rapports m/z retrouvés en Q1 dans le spectromètre de masse en tandem, pouvant correspondre aux métabolites secondaires du métabolite N-déalkylé du MBLI-98 (MH+ = 433,2)

3.2.2. Hypothèses de fragmentation des potentiels métabolites du MBLI-98

Le schéma de fragmentation du MBLI-98 est rappelé Figure 42.

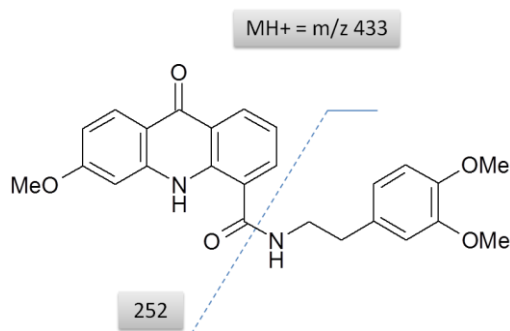


Figure 42 : Schéma de fragmentation du MBLI-98 détecté en LC-MS/MS par la transition 433,2 → 252,1

Nous avons supposé que la fragmentation des métabolites du MBLI-98 se faisait au même endroit que la molécule mère, c'est-à-dire au milieu de la fonction amide. Ainsi, la masse sur charge (m/z) des ions fils provenant des métabolites envisagés précédemment devrait alors être de 238, 252, 254, 268 ou 285 selon la ou les réactions mises en jeu (Figure 43).

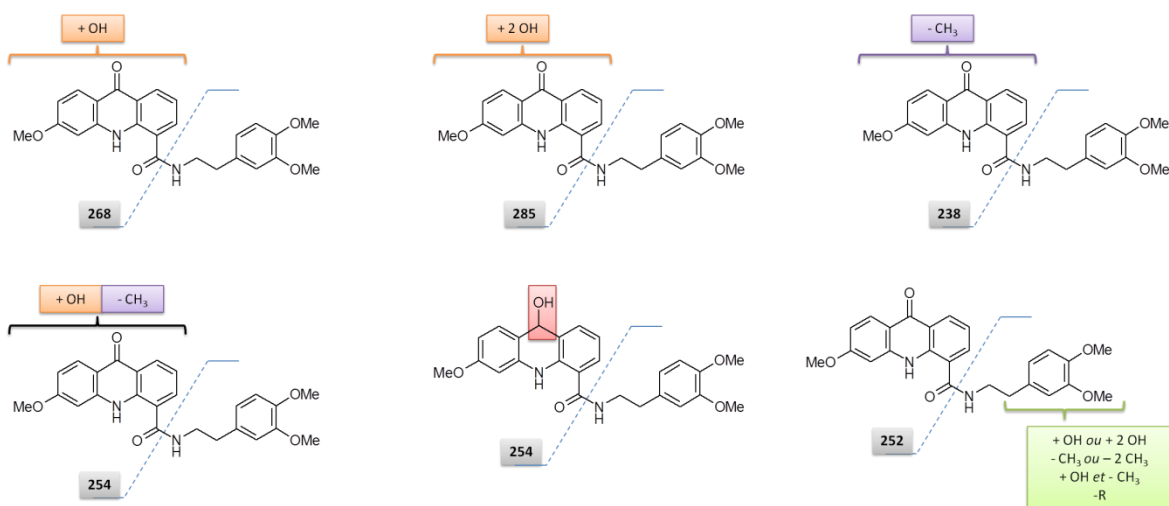


Figure 43 : Hypothèses de schéma de fragmentation des potentiels métabolites du MBLI-98

3.3. Recherche des métabolites du MBLI-98

3.3.1. Résultats de l'identification des métabolites

Afin de détecter d'éventuels métabolites du MBLI-98 formés *in vitro* lors de l'incubation avec des microsomes hépatiques de souris ou des cellules hépatiques HepaRG, une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem a été réalisée.

Résultats de l'incubation avec les microsomes hépatiques de souris

Compte tenu des hypothèses de métabolisation et de fragmentation précédemment énoncées, différents modes d'acquisition ont été utilisés.

Dans un premier temps, le **mode *Product Ion Scan*** a été utilisé pour une énergie de collision de 28 eV avec les transitions suivantes :

- 419 → [150 – 270]
- 435 → [150 – 270]
- 449 → [150 – 270]
- 465 → [150 – 270]
- 405 → [150 – 270]
- 269 → [50 – 275].
- 255 → [150 – 255]
- 271 → [150 – 271]
- 285 → [150 – 285]

Après incubation avec les microsomes hépatiques de souris, en présence de NADPH,H⁺, il a été observé l'apparition de pics chromatographiques, non présents avant incubation, dont les spectres de masse sont représentés Figure 44, à savoir :

- 419 → 252 à 11,7 min
- 449 → 268 à 11,6 min
- 449 → 252 à 11,4 min
- 435 → 252 à 10,9 min
- 269 → 252 à 10,0 min.

Concernant les autres transitions testées, aucun pic n'a été retenu.

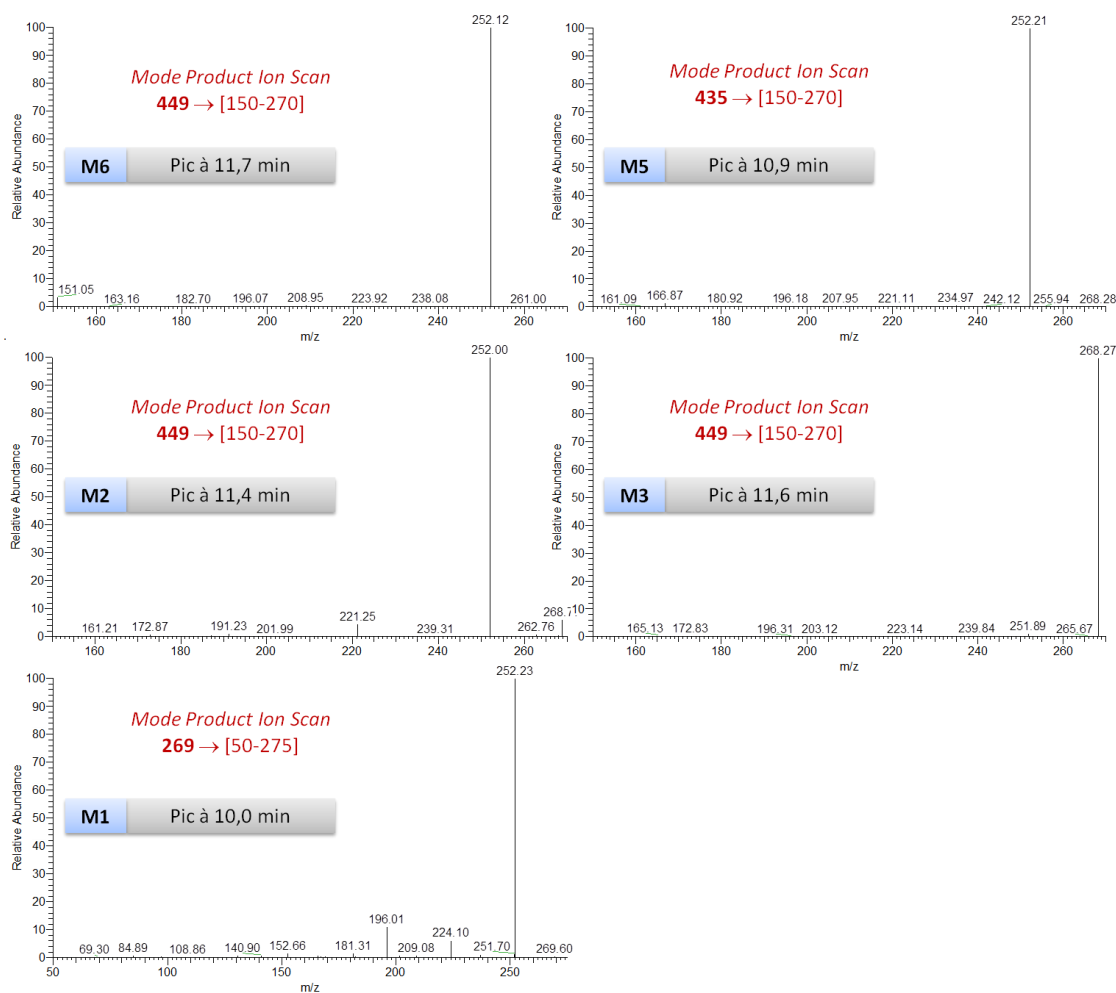


Figure 44 : Spectres de masse des ions détectés par LC-MS/MS en mode *Product Ion Scan* après incubation du MBLI-98 avec des microsomes hépatiques de souris de type « TEMOIN » en présence de NADPH,H⁺.

Dans un second temps, le **mode MRM** a été utilisé pour une énergie de collision de 28 eV avec les cinq transitions trouvées précédemment. Les mêmes pics chromatographiques ont été obtenus (voir [Figure 45](#)).

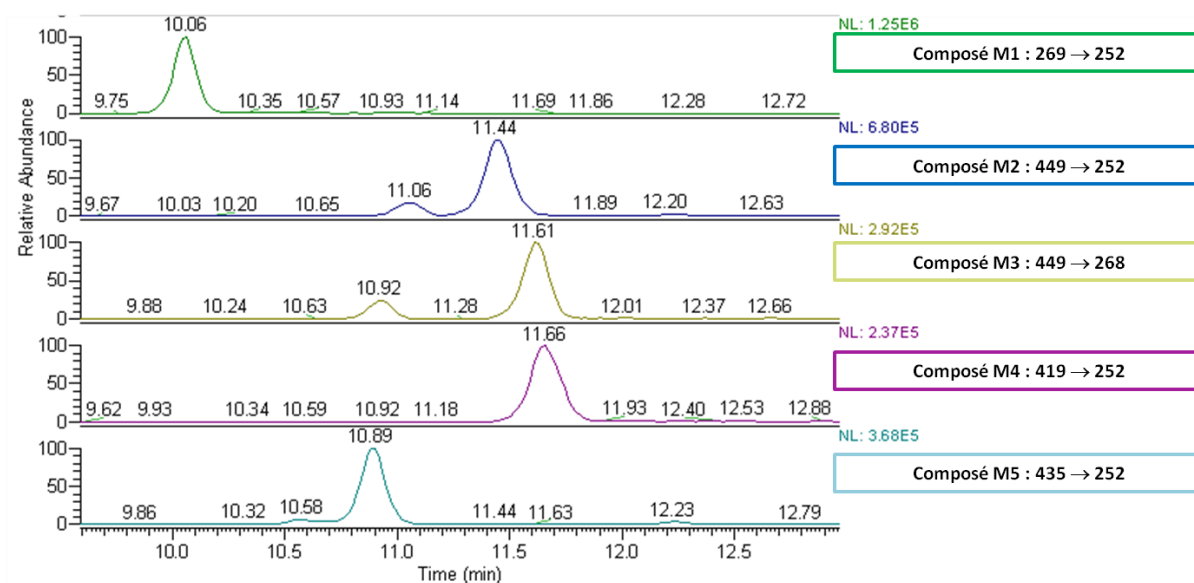


Figure 45 : Chromatogrammes obtenus à 3 min après incubation du MBLI-98 avec des microsomes hépatiques de souris de type "TEMOIN", en présence de NADPH,H⁺

Dans un troisième temps, le **mode Parent Ion Scan** a été utilisé avec une énergie de collision de 28 eV pour les transitions suivantes :

- [415-450] → 238, dans le cas d'un ion de fragmentation provenant d'un métabolite ayant subi une O-déméthylation sur le noyau acridone,
- [415-450] → 252, dans le cas d'un ion de fragmentation provenant d'un métabolite pour lequel la métabolisation ne touche pas le noyau acridone, qu'il s'agisse d'une O-déméthylation, d'une hydroxylation, d'une N-déalkylation ou d'un autre type de transformation.
- [425-450] → 268, dans le cas d'une hydroxylation sur le noyau acridone.

Les hypothèses de fragmentation sont rappelées [Figure 46](#).

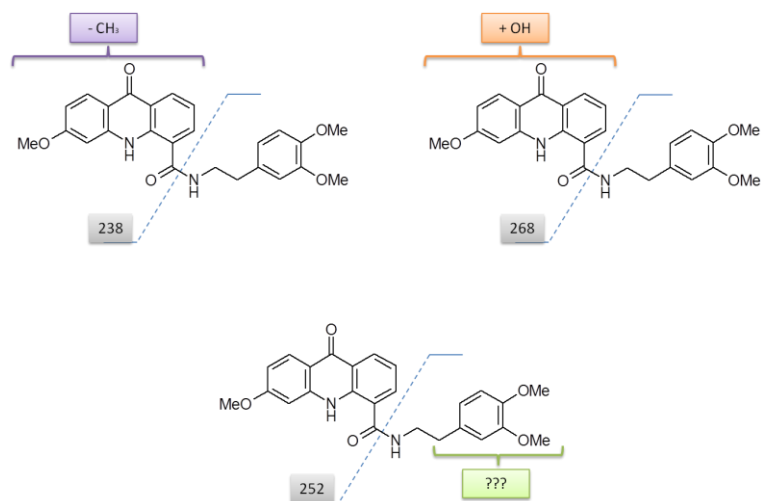


Figure 46 : Hypothèses d'ions fils provenant de la fragmentation de métabolites du MBLI-98

Les mêmes transitions que celles obtenues avec le mode *MRM* ont été observées. Aucun nouveau pic chromatographique n'a retenu notre intérêt.

Résultats de l'incubation avec les cellules hépatiques humaines HepaRG

La vérification du fonctionnement des cellules hépatiques humaines HepaRG a été réalisée en prenant pour substrat l'irinotécan. Après 1h d'incubation, nous avons observé l'apparition de ses principaux métabolites, notamment le SN-38.

L'étude du métabolisme du MBLI-98 réalisée, dans un second temps, à l'aide des cellules hépatiques HepaRG, a retrouvé, après 30 min d'incubation, la présence des cinq composés M1, M2, M3, M4 et M5.

3.3.2. Résultats de l'analyse du composé M1

Ayant à disposition le composé pur correspondant au métabolite N-déalkylé du MBLI-98 (composé M1), son analyse par LC-MS/MS a pu être réalisée.

Le composé est détecté à un temps de rétention de 10,0 min pour la transition « 269 → 252 » avec une énergie de collision de 28 eV. Son coefficient de réponse a été estimé à $0,81 \pm 0,08$ fois celui du MBLI-98.

3.3.3. Résultats de la cinétique de métabolisation du MBLI-98

Afin de savoir si les transitions trouvées précédemment correspondaient à des métabolites du MBLI-98, des expériences ont été réalisées en incubant le MBLI-98 avec des microsomes hépatiques de souris en présence ou non du cofacteur des cytochromes P450. Une incubation a ainsi été réalisée en présence de NADPH,H⁺ (formé *in vitro* par la glucose-6-phosphate déshydrogénase en présence de NADP et de Glucose-6-phosphate), et une autre sans. Une troisième incubation a été faite avec ajout de NADP et de G₆P mais sans ajout de G₆Pdh.

En l'absence de NADPH,H⁺, environ 80 % de la concentration initiale de MBLI-98 est encore présente après 20 minutes d'incubation (voir [Figure 47](#)). D'autre part, les transitions correspondant aux potentiels métabolites identifiés précédemment ne sont pas retrouvées (voir [Figure 48](#)).

En présence de NADPH,H⁺, le MBLI-98 disparaît très rapidement. Sa demi-vie est extrêmement courte, estimée, *in vitro*, à moins de 5 minutes. En moins de 20 minutes, la quasi-totalité de la molécule est consommée (voir [Figure 47](#)). Les transitions pouvant correspondre à des métabolites du MBLI-98 sont retrouvées dès les premiers prélèvements (voir [Figure 49](#)).

En l'absence de l'ajout de G₆Pdh au milieu d'incubation, nous observons aussi une diminution du MBLI-98 mais de façon plus lente. Cependant, au bout de 20 minutes, la quasi-totalité de la molécule a disparu. De plus, les transitions correspondant aux potentiels métabolites sont retrouvées.

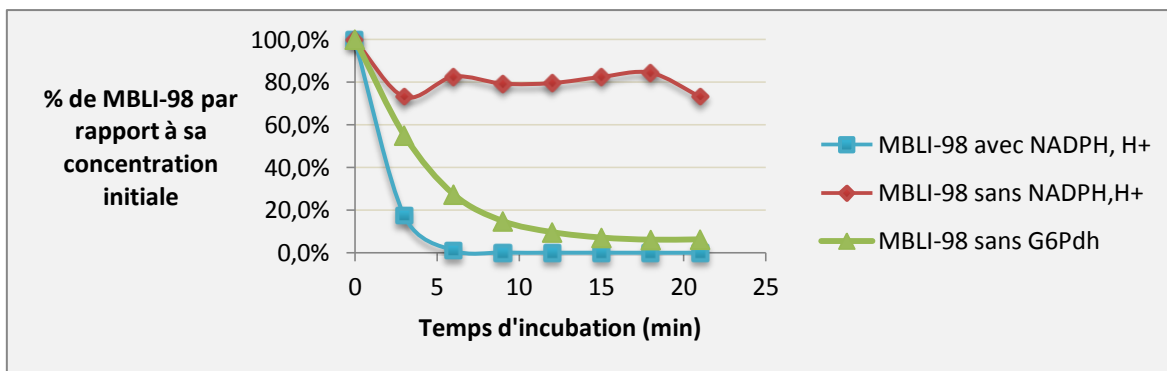


Figure 47 : Evolution de la concentration de MBLI-98 au cours du temps en présence de microsomes hépatiques de souris de type « TEMOIN » en présence ou non de NADPH,H⁺ ou de G₆Pdh.

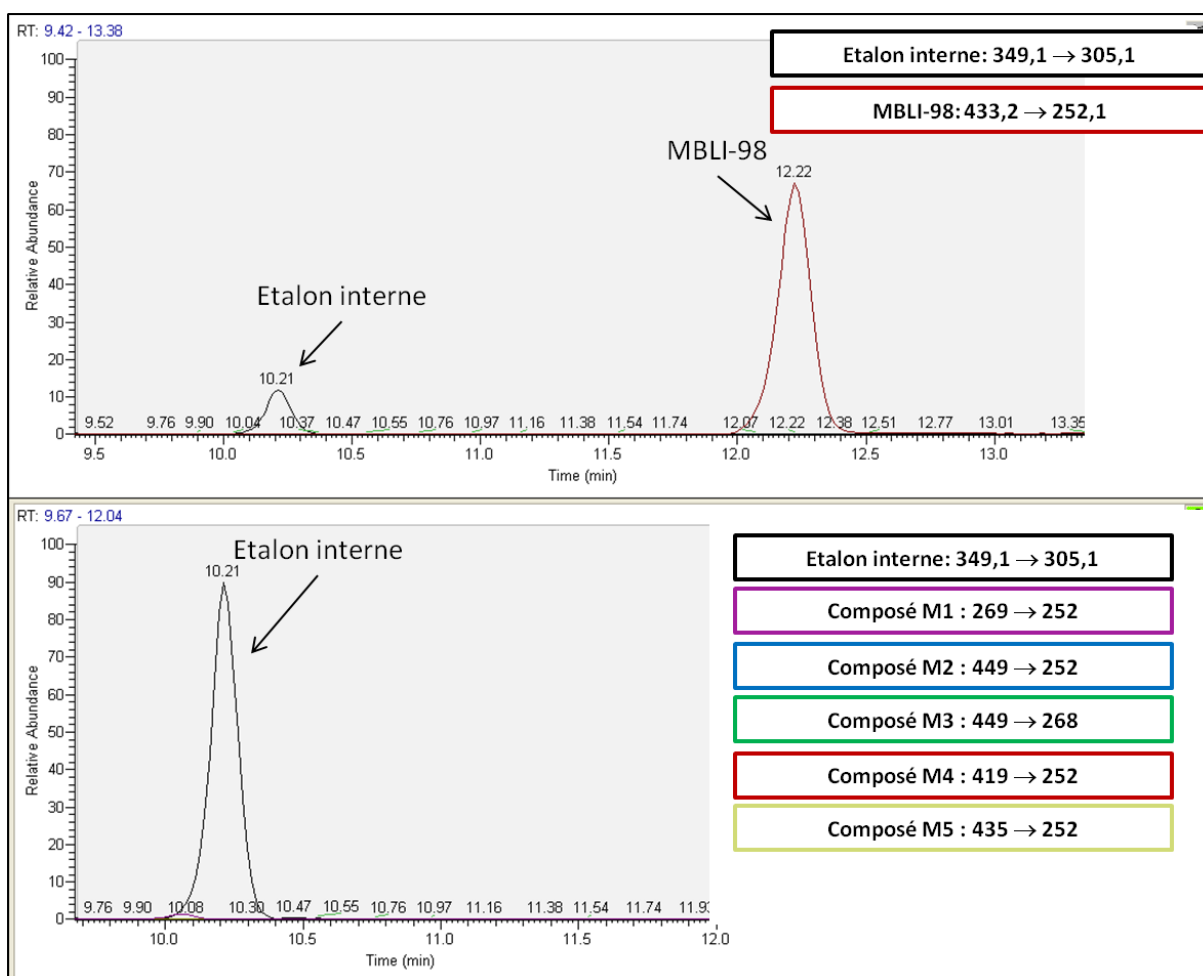


Figure 48 : Chromatogramme de l'analyse du MBLI-98 et de ses métabolites après incubation en présence de microsomes hépatiques de souris de type « TEMOIN », en l'absence de NADPH,H⁺

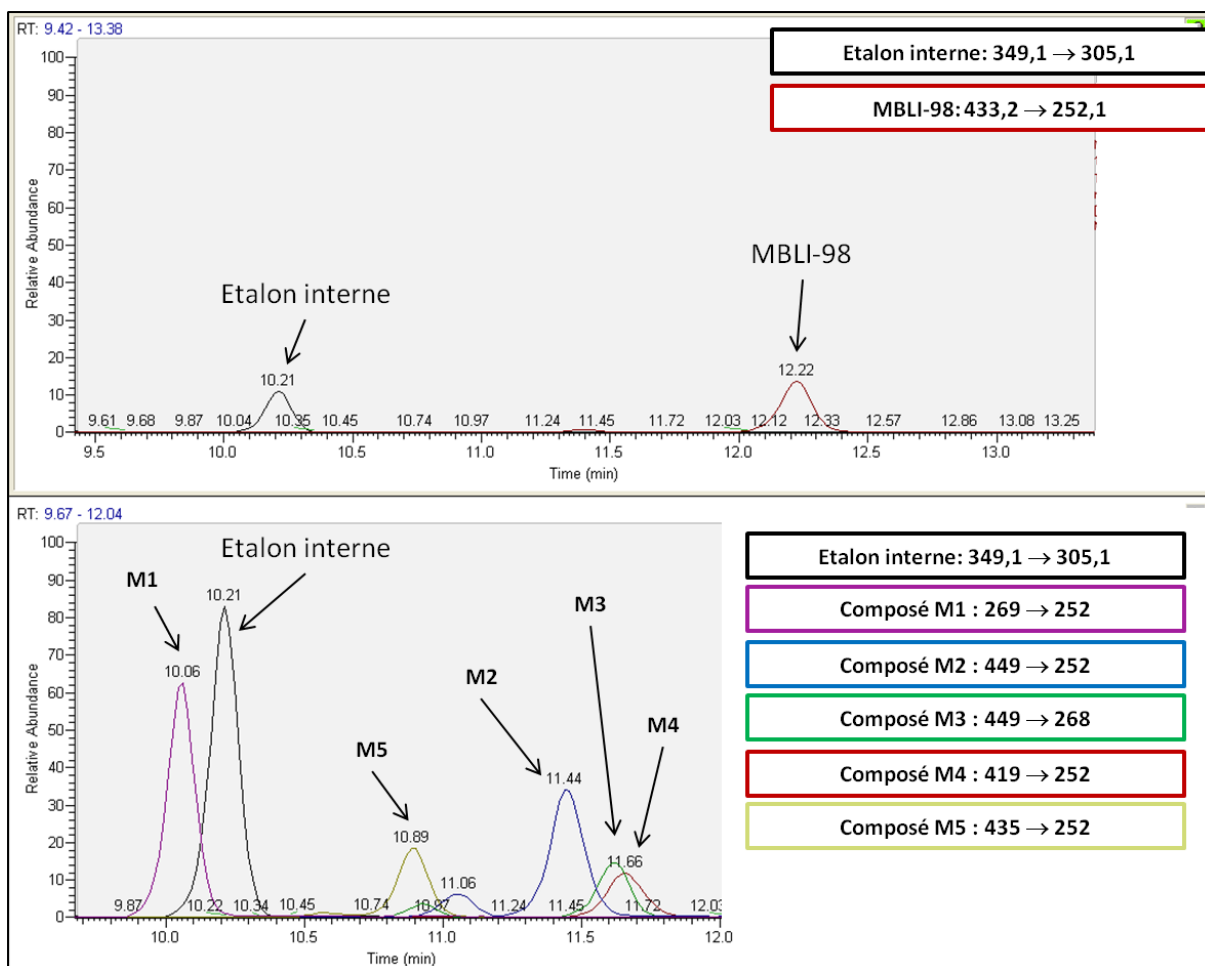


Figure 49 : Chromatogramme de l'analyse du MBLI-98 et de ses métabolites après incubation en présence de microsomes hépatiques de souris type « TEMOIN » et de NADPH,H⁺.

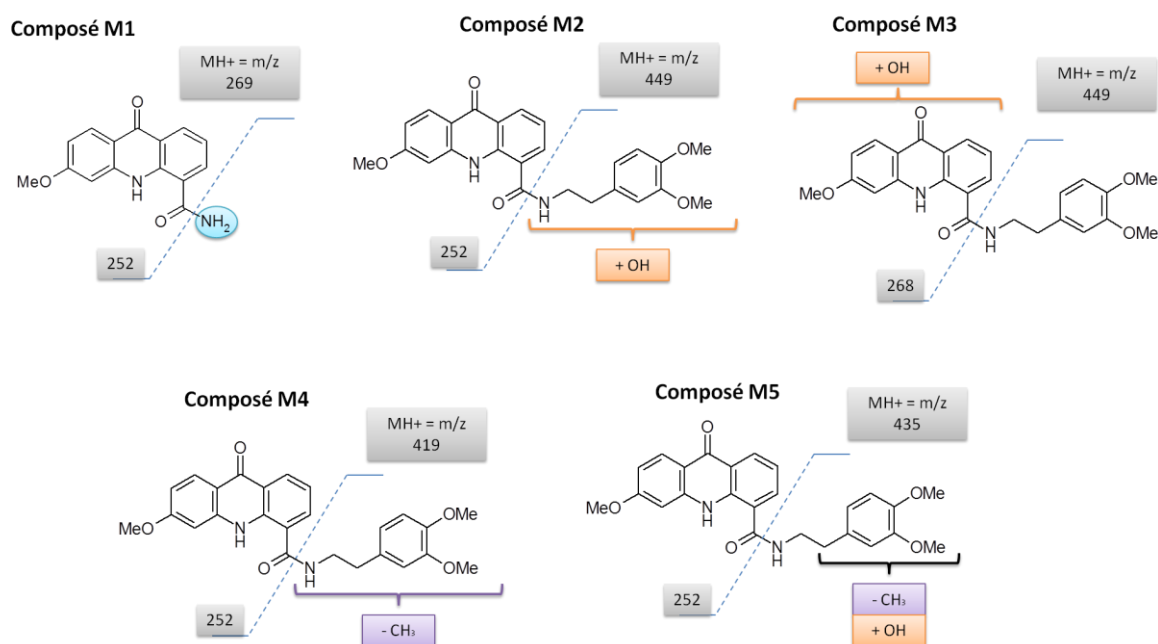
3.3.4. Discussion

Compte tenu des hypothèses faites précédemment, l'apparition de composés, non présents avant incubation, semble être le résultat du métabolisme du MBLI-98. En effet, d'après l'étude de la cinétique du MBLI-98 dans différentes conditions, son métabolisme dépend de la présence de NADP et de NADPH,H⁺. Or, le NADPH,H⁺ étant le cofacteur de la majorité des enzymes du métabolisme de phase I, la disparition NADPH,H⁺-dépendante du MBLI-98 est certainement due à sa métabolisation. L'apparition de nouveaux pics chromatographiques correspond alors à l'apparition de métabolites. D'après l'analyse de leurs spectres de masse, leur schéma de fragmentation est similaire à celui de la molécule mère, c'est-à-dire avec une coupure au milieu de la fonction amide. La modification de

masse est caractéristique de la réaction métabolique. Ainsi, une masse augmentée de 16 g/mol correspond à une hydroxylation tandis qu'une perte de 14 g/mol signe une déméthylation.

Ainsi, après études sur microsomes hépatiques de souris et cellules hépatiques HepaRG, cinq métabolites issus de la molécule mère, représentés [Figure 50](#), ont été identifiés :

- le 269 → 252 (composé M1) provenant d'une N-déalkylation,
- le 449 → 252 (composé M2) provenant d'une hydroxylation sur la partie non acridone,
- le 449 → 268 (composé M3) provenant d'une hydroxylation sur la partie acridone
- le 419 → 252 (composé M4) provenant d'une O-déméthylation,
- le 435 → 252 (composé M5) provenant à la fois d'une hydroxylation et d'une O-déméthylation sur la partie non acridone du MBLI-98.



– **Figure 50** : Schéma de fragmentation des métabolites du MBLI-98 détectés par LC-MS/MS

Néanmoins, les spectres de masse des métabolites hydroxylés et O-déméthylés ne nous permettent pas de connaître avec exactitude le lieu de l'hydroxylation et de l'O-déméthylation.

L'identification du composé M1 comme étant le métabolite N-déalkylé a pu être confirmée par l'analyse du composé synthétisé pur. En revanche, pour les autres métabolites, n'ayant pas à disposition les composés purs, leur identification n'a pas pu être confirmée.

Les résultats de cinétique du MBLI-98 ont mis en évidence sa demi-vie extrêmement courte en présence de microsomes hépatiques de souris. Dans la littérature, très peu de molécules présentent une telle cinétique. A titre d'exemple, on retrouve la tectochryisine, dont la structure a inspiré celle du MBLI-98 (6). *In vitro*, en présence de microsomes hépatiques humains, sa demi-vie est elle aussi inférieure à 5 minutes (69). Il se pourrait donc que leur similarité structurale soit à l'origine de cette disparition rapide. Néanmoins, le GF120918, dont la structure est la plus proche du MBLI-98, ne présente pas cette cinétique (70).

En l'absence totale de système régénérant, c'est-à-dire de l'ensemble « NADP + G₆P + G₆Pdh », la concentration de MBLI-98 reste stable. Normalement, en l'absence de G₆Pdh, le système régénérant ne fonctionne pas, c'est-à-dire qu'il ne se forme pas de NADPH, H⁺. Nous nous attendions donc à avoir les mêmes résultats qu'en l'absence totale de système régénérant. Or, nous avons tout de même observé une métabolisation du MBLI-98. Certes, la vitesse de disparition du MBLI-98 observée est plus faible, mais les transitions correspondant aux métabolites sont tout de même observées. Cela signifie donc que la molécule a bien été métabolisée. La concentration de G₆Pdh dans la fraction microsomale

n'est pas connue mais pourrait potentiellement faire fonctionner le système régénérant et donc expliquer, dans ces conditions, la métabolisation du MBLI-98. Afin d'évaluer cette possibilité, une incubation de microsomes avec de l'irinotécan, en l'absence d'ajout de G₆Pdh pourrait être réalisée. Si le SN-38, qui est le principal métabolite de l'irinotécan, apparaît, nous pourrions en déduire que la G6Pdh présente dans la fraction microsomale suffit à faire fonctionner le système régénérant.

3.4. Cinétiques du MBLI-98 et de ses métabolites

Dans le but d'établir un schéma des voies de métabolisation du MBLI-98, nous avons cherché à suivre l'apparition de ses métabolites au cours de l'incubation avec microsomes hépatiques de souris. Pour cela, les transitions *MRM* des métabolites précédemment identifiés ont été utilisées.

3.4.1. Résultats en présence du système régénérant complet

In vitro, en présence de microsomes hépatiques de souris et de NADPH,H⁺, la disparition du MBLI-98 est extrêmement rapide (voir [Figure 51](#)). Après seulement 20 secondes d'incubation, il ne reste plus que 30% de sa concentration initiale.

L'apparition des métabolites *in vitro* s'est révélée, elle aussi, extrêmement rapide. La concentration la plus importante de métabolites est obtenue, selon les métabolites, entre le premier prélèvement à 20 secondes et celui à 3 minutes (voir [Figure 52](#)).

De plus, une fois formés, nous observons une disparition de ces métabolites, de manière plus ou moins rapide. Le composé M2 ainsi que le composé M4 disparaissent quasi-instantanément. Les trois autres métabolites ont une vitesse de disparition moins élevée. Notons par ailleurs que les composés M1 et M5 continuent d'augmenter alors que les autres métabolites ont déjà commencé à disparaître.

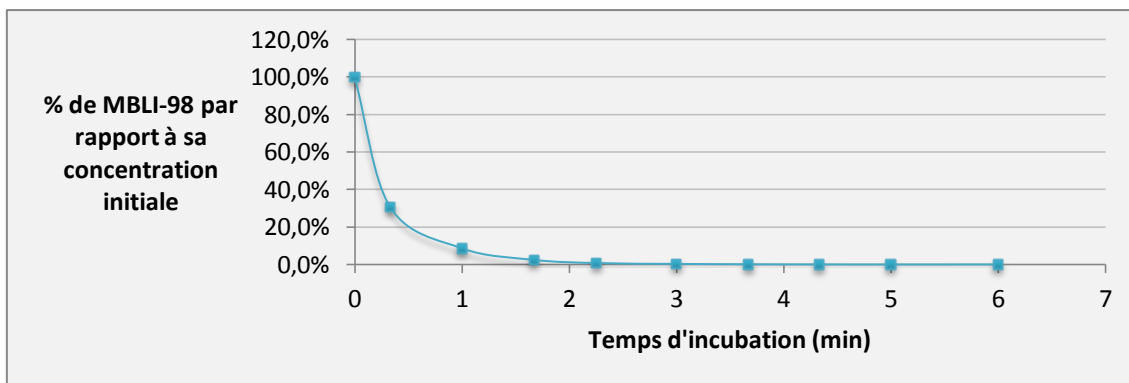


Figure 51 : Evolution de la concentration du MBLI-98 au cours du temps en présence de microsomes hépatiques de souris de type « PB » et de NADPH,H⁺.

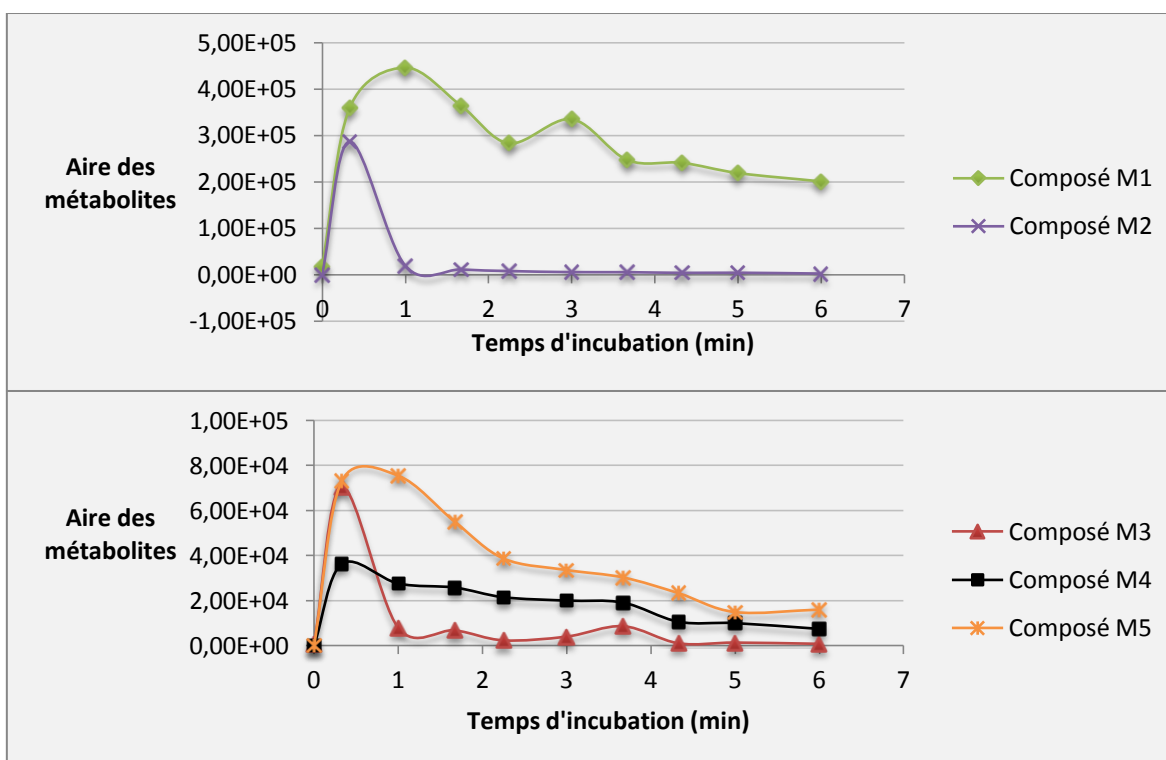


Figure 52 : Evolution de la concentration des métabolites du MBLI-98 au cours du temps en présence de microsomes hépatiques de souris de type « PB » et de NADPH,H⁺.

3.4.2. Résultats sans ajout de G₆Pdh

D'autre part, la cinétique des métabolites lors de l'incubation en présence de microsomes hépatiques de souris, de NADP et de G₆P, sans ajout de G₆Pdh est représentée Figure 53.

En l'absence de G₆Pdh, le métabolite N-déalkylé (composé M1) apparaît de manière plus progressive qu'en sa présence, et ne disparaît pas durant la suite de l'incubation. Il en est de même pour les métabolites hydroxylé M3 et O-déméthylé M4 pour lesquels la concentration maximale, habituellement obtenue dès le premier prélèvement (ici à 3 min) en présence de G₆Pdh, est, en son absence, obtenue aux environs de 10 min.

Concernant le métabolite hydroxylé M2, sa vitesse d'apparition semble, quant à elle, inchangée selon les conditions. Néanmoins, sa vitesse de disparition est très diminuée puisqu'après 20 minutes d'incubation, il reste environ 50% de sa concentration maximale, obtenue à 3 minutes, tandis qu'en présence de G₆Pdh, il n'en restait déjà plus que des traces.

Pour ce qui est du métabolite M5 (O-déméthylé + hydroxylé), en l'absence de G₆Pdh, il n'a été détecté qu'en très faible quantité par rapport aux expériences avec G₆Pdh.

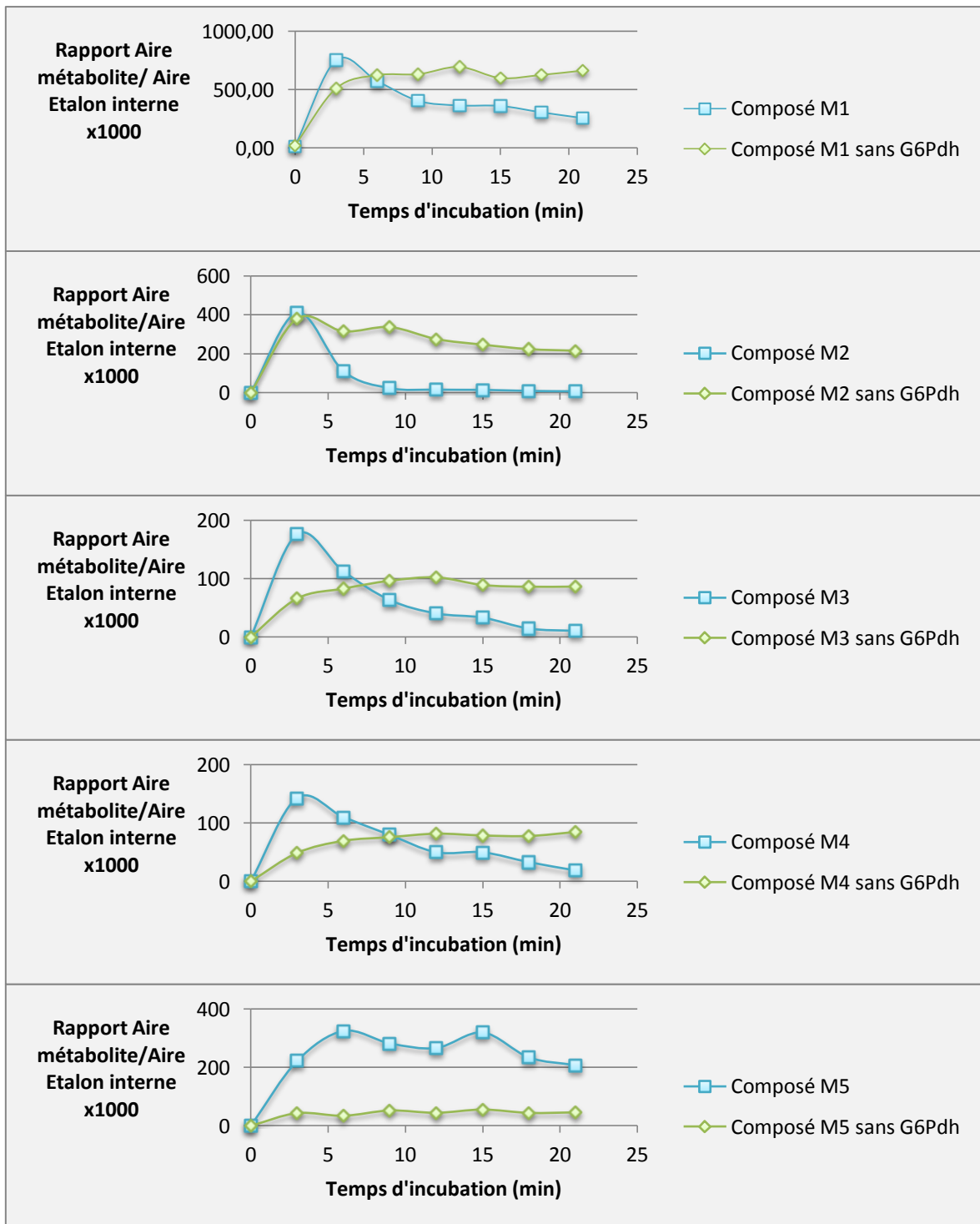


Figure 53 : Evolution de la concentration des métabolites du MBLI-98 lors d'une incubation avec des microsomes hépatiques de souris de type « TEMOIN », en présence de NADP et de G₆P, sans ajout de G₆Pdh

3.4.3. Discussion

Les expériences réalisées avec des temps d'incubation allant seulement jusqu'à 6 minutes, montrent qu'en 20 secondes, le MBLI-98 a déjà disparu de plus de la moitié de sa concentration initiale. Cela signifie donc que sa demi-vie est inférieure à 20 secondes, ce qui est extrêmement rapide.

La disparition du MBLI-98 s'accompagne de l'apparition d'au moins cinq métabolites, précédemment identifiés. Leur formation est de l'ordre de quelques minutes, coïncidant avec la disparition brutale du MBLI-98. Néanmoins, alors qu'on s'attendrait à avoir une augmentation croissante des métabolites, nous avons observé, dans un second temps, leur disparition, plus ou moins rapide selon les métabolites. Ces résultats suggèrent principalement deux hypothèses. La première serait que les métabolites précédemment identifiés soient, à leur tour, pris en charge par les enzymes du métabolisme pour former de nouveaux métabolites. La seconde hypothèse est que le MBLI-98 et ses métabolites soient des substrats suicides des CYPs. Cela suggère qu'ils soient capables de se lier de façon covalente aux cytochromes P450 contenus dans les microsomes. Or, après arrêt de la métabolisation par précipitation au méthanol des protéines et centrifugation, le culot cellulaire a été éliminé pour ne conserver que le surnageant. Ainsi, si le MBLI-98 et ses métabolites étaient liés aux protéines, ils ont été éliminés avec le culot. Cela expliquerait la diminution du MBLI-98 et de ses métabolites dans le surnageant.

Concernant l'hypothèse du substrat suicide, si le MBLI-98 bloquait son propre métabolisme, une accumulation de sa concentration après plusieurs injections successives devrait être observée. Dans cette optique, en parallèle de ce travail de thèse, une expérience *in vivo* a été réalisée sur des souris. Différents groupes de souris ont été constitués. Certaines n'ont reçu qu'une injection de MBLI-98 et ont été sacrifiées 1h, 2h, 4h ou 6h après. D'autres ont reçu deux ou trois injections de MBLI-98 espacées de 4h et ont été

sacrifiées 1h ou 4h après la dernière injection. Les résultats obtenus sont schématisés Figure 54. Il n'a pas été observé d'accumulation de MBLI-98. Cependant, il semblerait y avoir une accumulation de ses métabolites. Il est donc possible que le MBLI-98 soit responsable d'une inhibition enzymatique responsable d'une diminution de la métabolisation de ses propres métabolites.

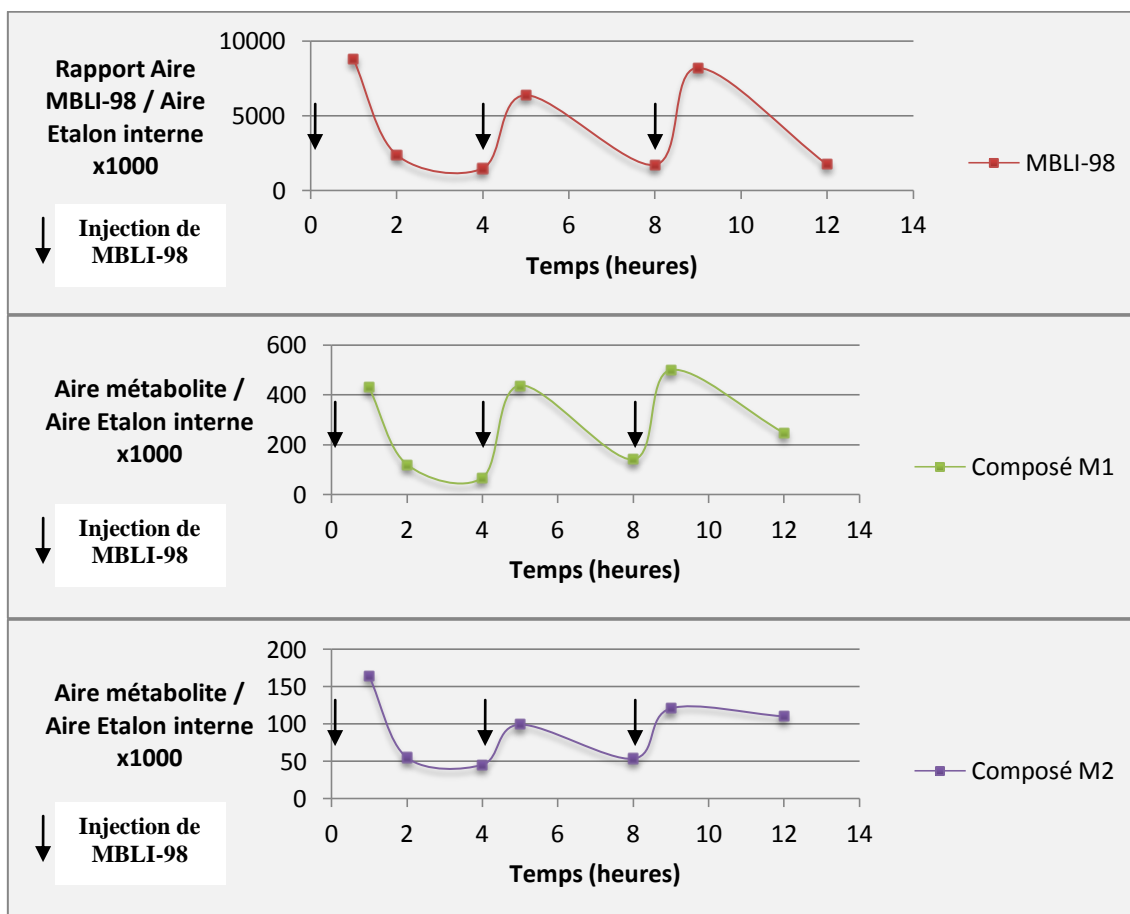


Figure 54 : Evolution des concentrations de MBLI-98 et de deux de ses métabolites après 1, 2 ou 3 injections de MBLI-98 espacées de 4h à des souris. Les rapports des aires correspondent aux moyennes des rapports obtenus avec les souris sacrifiées de chacun des groupes.

Sur les cinq métabolites identifiés, deux d'entre eux peuvent déjà être des métabolites secondaires (voir [Figure 55](#)). Le composé M1 peut provenir directement d'une N-déalkylation du MBLI-98 ou d'une N-déalkylation d'un métabolite hydroxylé ou O-déméthylé ne touchant pas la partie acridone de la molécule. Le composé M5 peut provenir, quant à lui, d'un des métabolites hydroxylés M2 ou M3 ayant ensuite subi une O-déméthylation ou bien, du métabolite O-déméthylé M4 ayant subi une hydroxylation. Ce raisonnement pourrait expliquer pourquoi ces métabolites continuent d'augmenter alors que les trois autres diminuent déjà.

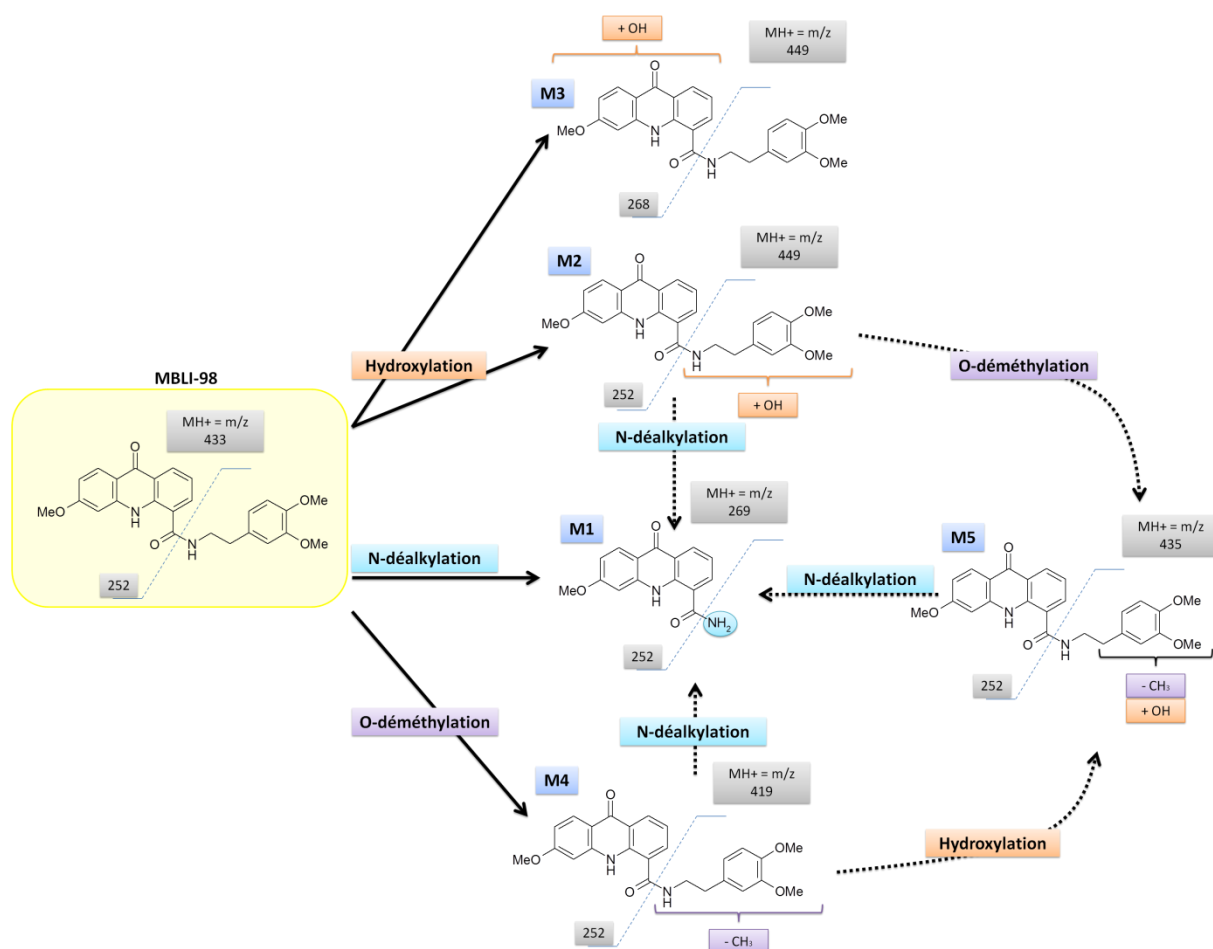


Figure 55 : Schéma de métabolisation du MBLI-98 : formation des métabolites M1, M2, M3, M4 et M5.

Les cinétiques des métabolites du MBLI-98 en présence ou non de G₆Pdh présentent quelques différences. En l'absence de G₆Pdh, nous avons précédemment observé une diminution de la vitesse de disparition du MBLI-98. Ces résultats sont en accord avec une apparition plus progressive de certains métabolites comme le M3 et le M4. Néanmoins, les vitesses d'apparition des métabolites M1 et M2 sont inchangées. La seconde différence notable est une disparition des métabolites beaucoup plus lente, voire inexistante. L'absence du composé M5, qui est uniquement un métabolite secondaire, peut donc s'expliquer par la persistance des métabolites primaires. Cependant, nous n'avons pas d'hypothèse pouvant expliquer ce changement de cinétique. En effet, si le système régénérant fonctionne assez bien en l'absence d'ajout de G₆Pdh au milieu d'incubation, pour former les métabolites primaires du MBLI-98, il n'y a pas de raison d'observer une persistance de ces métabolites.

3.5. Autres

3.5.1. Résultats de l'étude du métabolisme du MBLI-98 avec différentes concentrations de microsomes hépatiques de souris

Dans le but de mieux comprendre le phénomène de métabolisation du MBLI-98, une expérience a été réalisée en diminuant la concentration de microsomes d'un facteur cinq dans le milieu d'incubation.

En diminuant considérablement la quantité de protéines microsomales dans le milieu d'incubation, le MBLI-98 semble très légèrement moins vite métabolisé puisqu'au moment du premier prélèvement (à 1,5 min) il en reste deux fois plus qu'en conditions habituelles (voir Tableau XII). Cependant, la disparition de la molécule demeure extrêmement rapide.

Concernant le suivi des métabolites avec leurs transitions *MRM*, nous n'avons pas réellement observé de différence entre les deux incubations (voir Figure 56). Le composé M1 est le métabolite détecté de façon majoritaire.

Tableau XII : Evolution de la concentration de MBLI-98 au cours du temps en présence de microsomes hépatiques de souris de type "PB" à la concentration de 0,9 mg de protéines / mL ou 0,18 mg de protéines / mL

<i>temps (min)</i>	0	1,5	3	6	9
MBLI -98 ; microsomes à 0,9 mg de protéines/mL	100,0%	10,7%	1,8%	0,2%	0,2%
MBLI-98 ; microsomes à 0,18 mg de protéines/mL	100,0%	4,6%	0,7%	0,5%	0,2%

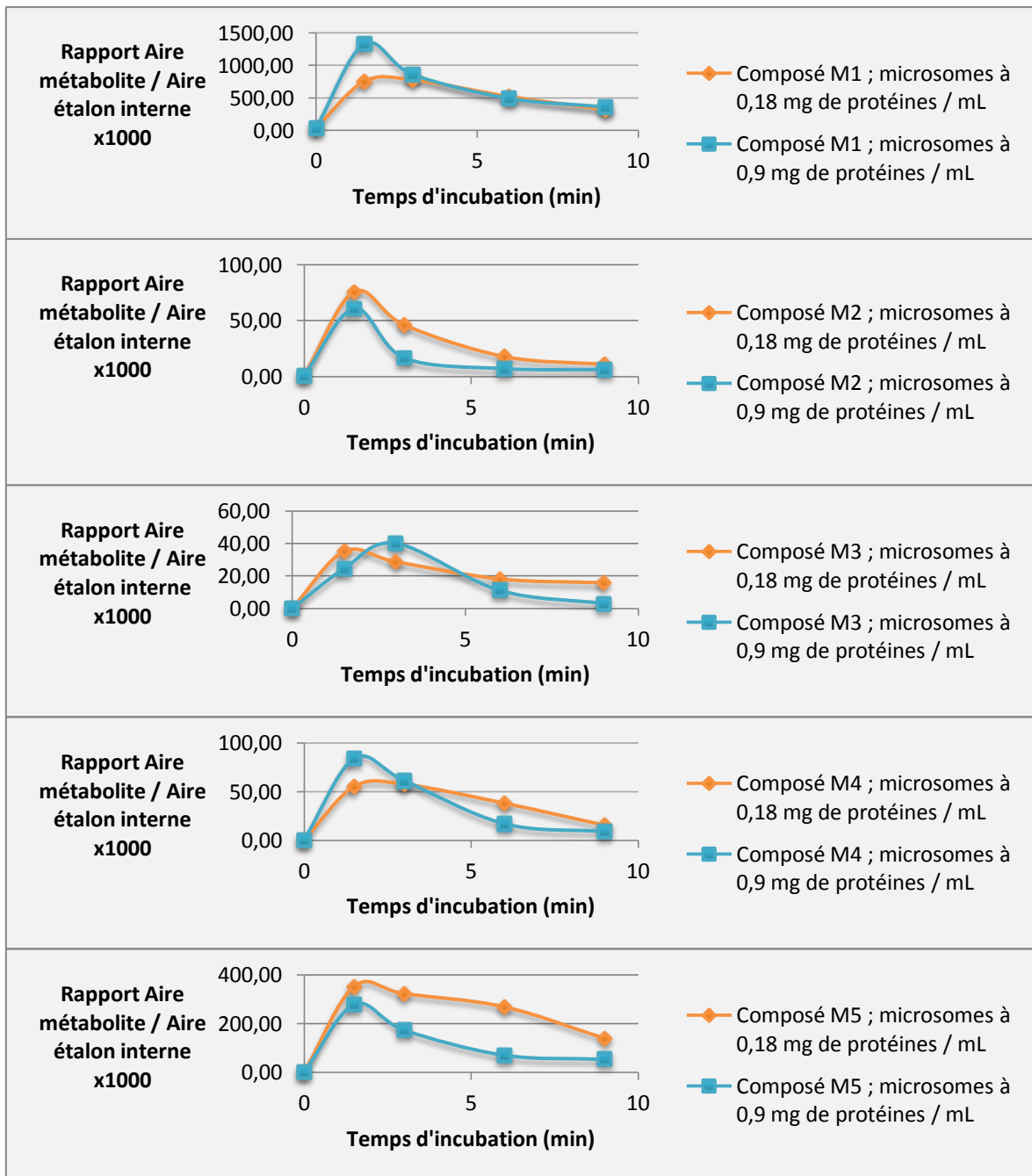


Figure 56 : Evolution des concentrations des métabolites en présence de microsomes hépatiques de souris de type « PB » à la concentration de 0,9 mg de protéines /mL ou 0,18 mg de protéines /mL dans le milieu d'incubation, en présence de NADPH,H⁺

3.5.2. Comparaison des aires entre le composé M1 et le MBLI-98

La comparaison des aires entre le composé M1 et le MBLI-98 est présentée Tableau XIII. L'aire maximale obtenue pour le composé M1 durant l'incubation avec des microsomes hépatiques de souris, apparaît environ 10 fois moins importante que celle du MBLI-98.

Tableau XIII : Comparaison du rapport des aires entre le MBLI -98 et son métabolite N-déalkylé sur l'aire de l'étalon interne (CPT).

Molécule	Aire de la molécule étudiée	Aire de l'étalon interne (CPT)	Rapport (Aire molécule étudiée / Aire CPT) x1000
MBLI-98	1,15E+07 (à t = 0 min)	1,64E+06	7012,20
Composé M1	1,25E+06 (à t = 3 min)	1,66E+06	753,01

3.5.3. Résultats de l'étude du métabolisme du composé M1

Afin de comprendre la disparition secondaire du principal métabolite identifié du MBLI-98, nous avons réalisé une incubation en remplaçant le MBLI-98 par son métabolite N-déalkylé. Pour détecter la possible formation de métabolites secondaires (voir Figure 57), une analyse en mode *MRM* a été réalisée avec les transitions suivantes :

- 285 → 268 dans le cas d'une hydroxylation,
- 255 → 238 dans le cas d'une O-déméthylation,
- 271 → 254 dans le cas d'une réduction.

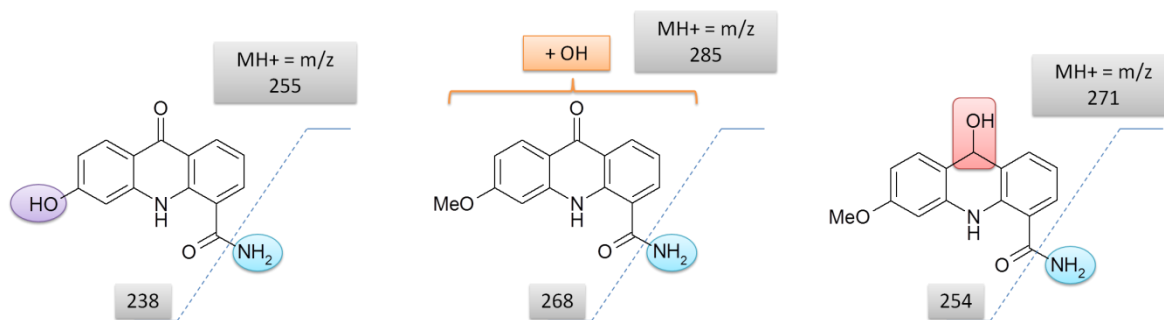


Figure 57 : Hypothèses de structure et de fragmentation des métabolites issus du composé M1

D'après les résultats obtenus (voir [Figure 58](#)), la disparition du métabolite N-déalkylé du MBLI-98 est, elle aussi, très rapide, inférieure à 5 minutes. Au premier prélèvement à 1 min 30 s, il reste plus de 50% de sa concentration initiale, mais, après 3 min d'incubation en présence de microsomes hépatiques de souris, il en reste moins de 50%.

Concernant les transitions de potentiels métabolites, nous avons retenu les pics chromatographiques suivants, non présents au temps « t = 0 min » :

- 255 → 238 à 8,9 min (composé M6), pic majoritaire, expliquant, à son maximum, 17% de la disparition du N-déalkylé.
- 285 → 268, l'un à 8,7 min (composé M7) et l'autre à 9,6 min (composé M8).

Cependant, comme pour les métabolites du MBLI-98 précédemment identifiés, le suivi des transitions ci-dessus montre, dans un second temps, une diminution de la concentration des métabolites après leur formation (voir [Figure 59](#)).

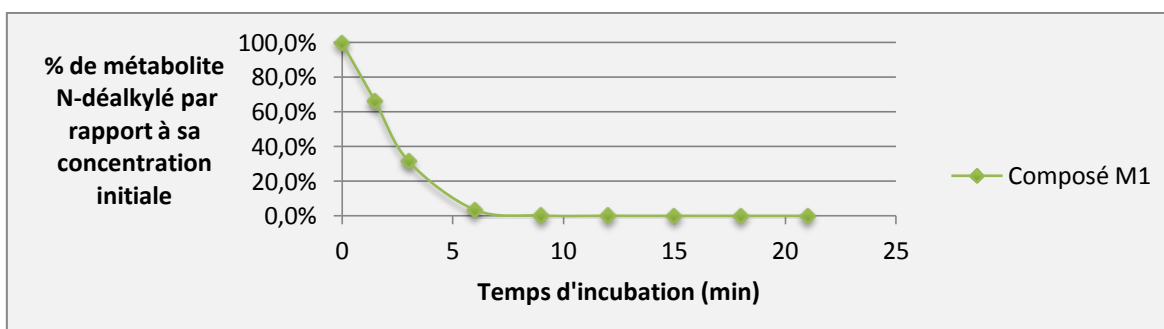


Figure 58 : Evolution de la concentration du métabolite N-déalkylé du MBLI-98 (composé M1) lors d'une incubation avec des microsomes hépatiques de souris de type « PB », en présence de NADPH,H⁺.

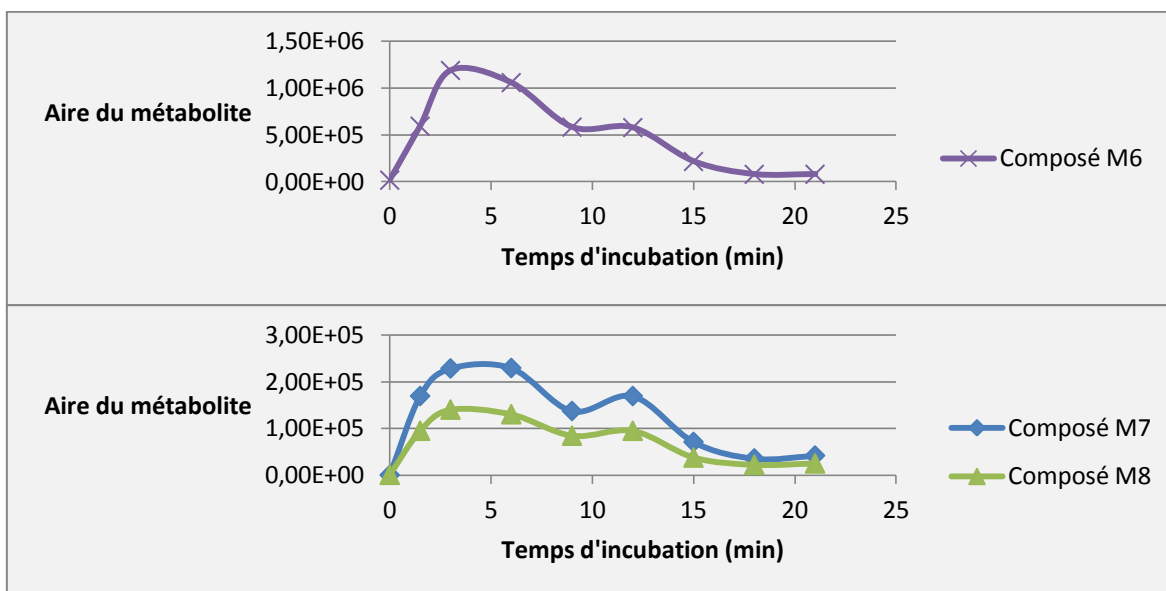


Figure 59 : Evolution de la concentration des potentiels métabolites secondaires du métabolite N-déalkylé du MBLI-98 (composé M1) lors d'une incubation avec des microsomes hépatiques de souris de type « PB », en présence de NADPH, H⁺.

3.5.4. Discussion

En diminuant la concentration de microsomes hépatiques de souris, on s'attendrait à avoir une diminution de la métabolisation du MBLI-98. Il était donc attendu une diminution de sa vitesse de disparition ainsi qu'une diminution de la concentration de ses métabolites. Or, même avec une concentration de microsomes cinq fois moins importante, nous n'avons pas observé de changement marquant de cinétique. Il est possible que ces résultats viennent du fait que nous utilisons des concentrations peu élevées de MBLI-98 (0,48 μ M dans le milieu d'incubation).

Parmi les métabolites détectés, le N-déalkylé (composé M1) est majoritaire mais n'explique, au mieux, que 13% de la disparition du MBLI-98. Compte-tenu de la similarité structurale entre le MBLI-98 et ses quatre autres métabolites détectés (M1, M2, M3 et M4), leur coefficient de réponse est vraisemblablement du même ordre que la molécule mère. La majorité de la disparition du MBLI-98 n'est donc pas expliquée par la production

des métabolites détectés. Pour expliquer la disparition des 80% restants de MBLI-98, différentes hypothèses ont été envisagées. Tout d'abord, il est possible que la majorité de la disparition du MBLI-98 soit due à un autre phénomène que la métabolisation, par exemple la formation d'une espèce radicalaire de type MBLI-98[•], potentiellement capable de former des adduits sur les protéines. Une autre hypothèse est que le MBLI-98 forme un ou plusieurs métabolites, non envisagés dans nos hypothèses de départ et donc non détectés par LC-MS/MS. Enfin, nous avons aussi envisagé la formation de métabolites secondaires, notamment au composé majoritaire M1. C'est pourquoi, ayant à disposition le composé pur correspondant au métabolite N-déalkylé (composé M1), son métabolisme a aussi été étudié.

L'étude du métabolisme du composé M1, réalisée *in vitro* avec des microsomes hépatiques de souris, a mis en évidence une vitesse de disparition légèrement plus lente que la molécule mère. Cependant, cette vitesse demeure extrêmement rapide pour un xénobiotique, avec une demi-vie de l'ordre de quelques minutes. En parallèle de sa disparition, il a été observé l'apparition de trois métabolites (voir [Figure 60](#)). Le premier, noté M6, provient d'une O-déméthylation et répond à la transition 255 → 238. Les deux autres, notés M7 et M8, proviennent d'une hydroxylation, et répondent à la transition 285 → 268. Néanmoins, tout comme nous l'avons vu pour les métabolites du MBLI-98, une diminution de leur concentration est ensuite progressivement observée. Les mêmes hypothèses que précédemment sont alors envisageables.

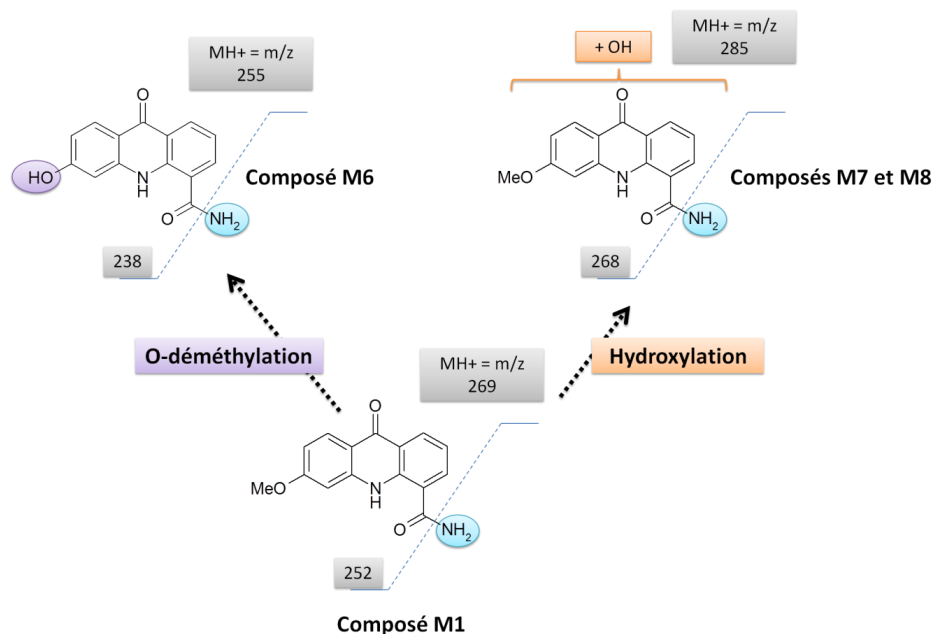


Figure 60 : Schéma de métabolisation du composé M1 (métabolite N-déalkylé du MBLI-98) : formation des métabolites M6, M7 et M8

Le fait que le métabolite N-déalkylé du MBLI-98 soit, à son tour, pris en charge très rapidement par les cytochromes P450, explique pourquoi, lors de l'étude du métabolisme du MBLI-98, nous le voyons disparaître aussi rapidement après sa formation. En effet, pour l'étude du métabolisme du composé M1, une concentration dix fois plus importante que celle obtenue via la métabolisation du MBLI-98 a été utilisée. Or, le principal métabolite identifié ne correspond, à son maximum, qu'à 17% du N-déalkylé. Donc, cela explique pourquoi ces transitions, bien que testées dans l'étude du métabolisme du MBLI-98, n'avaient pas été retenues. Par ailleurs, la disparition des métabolites après leur formation complique encore leur détection dans l'étude du métabolisme du MBLI-98.

Une expérience sans système régénérant serait intéressante à effectuer afin de vérifier l'absence de diminution du 269 → 252 et l'absence d'apparition de ses trois métabolites.

3.6. Etudes d'inhibition

3.6.1. Résultats de l'étude de l'inhibition enzymatique du métabolisme du MBLI-98

3.6.1.1. Par la troléandomycine (TAO)

Afin de savoir si le MBLI-98 était pris en charge par les cytochromes P450 3A4, une expérience a été réalisée en ajoutant, 10 minutes avant l'ajout du MBLI-98, de la troléandomycine – un puissant inhibiteur irréversible des P450 3A4 (74) – au milieu d'incubation.

En présence de troléandomycine à des concentrations pour lesquelles on lui connaît des propriétés inhibitrices des P450 3A4, la vitesse de métabolisation du MBLI-98 est fortement diminuée. A 3 min, en présence de TAO, il reste encore 46% de la concentration initiale de MBLI-98 alors qu'il n'en reste plus que 2% en conditions habituelles (voir Figure 61).

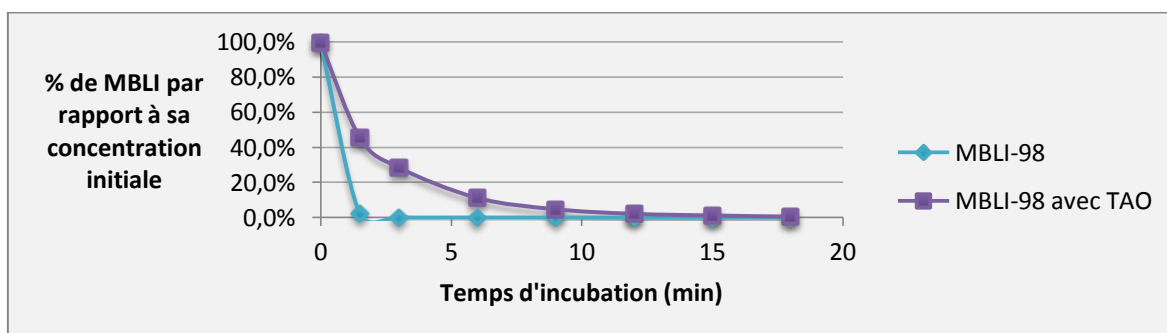


Figure 61 : Evolution de la quantité de MBLI-98 au cours du temps en présence ou non de troléandomycine (TAO) à la concentration de 10 µM dans le milieu d'incubation.

Même en présence de troléandomycine, la concentration maximale du métabolite N-déalkylé est obtenue dès 1,5 min. La vitesse d'apparition de ce métabolite, de même que sa concentration maximale ne semblent pas avoir diminué. Cependant, en présence de TAO, la disparition de ce métabolite est quasi-inexistante. Concernant la cinétique des

autres métabolites en présence de TAO, une diminution voire une absence de leur disparition est observée (voir Figure 62). Notons par ailleurs qu'en présence de TAO, certains métabolites comme les composés M2, M3 et M4 sont obtenus à des concentrations supérieures à l'incubation témoin.

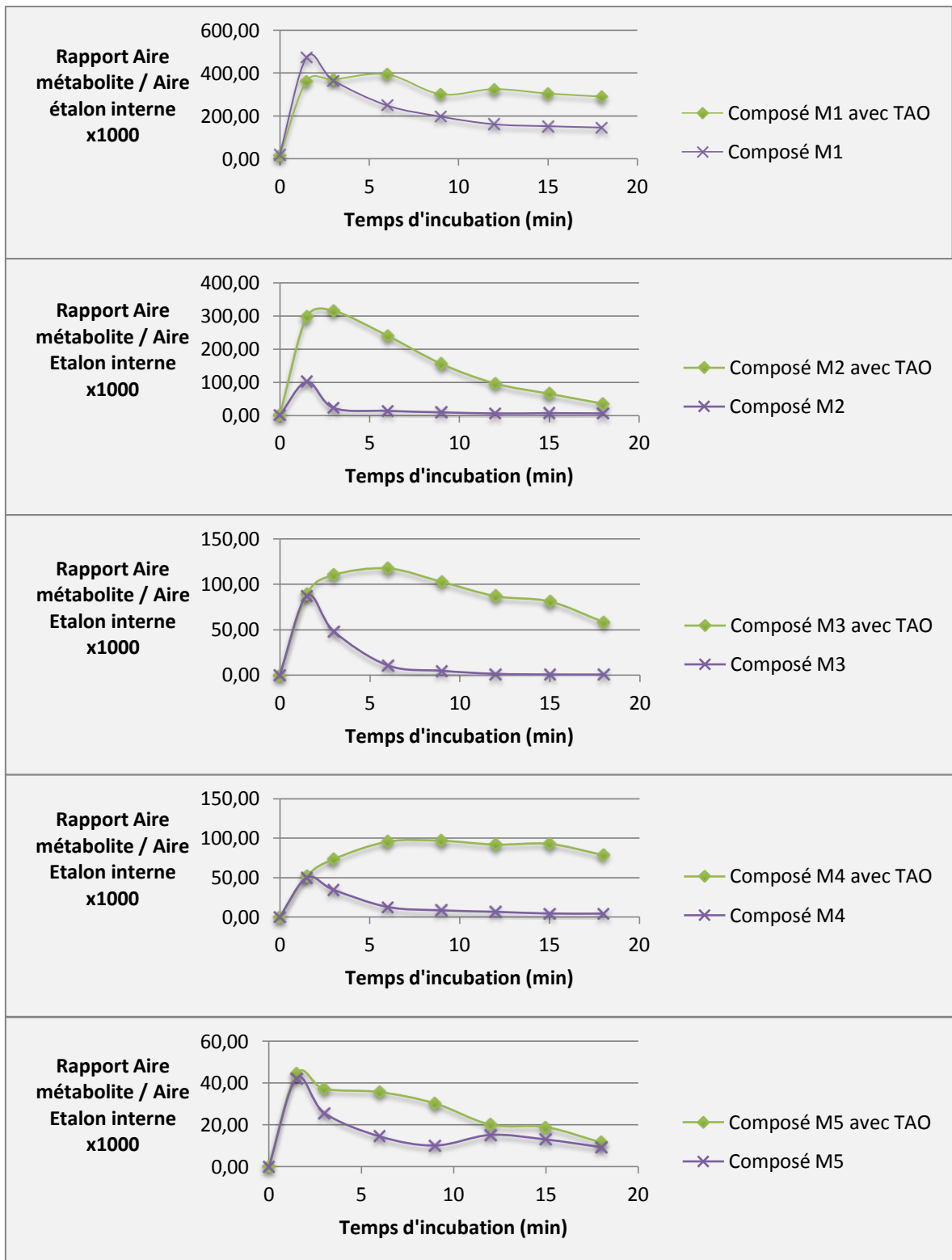


Figure 62 : Evolution des concentrations des métabolites au cours du temps en présence ou non de troléandromycine (TAO) à la concentration de 10 µM dans le milieu d'incubation contenant des microsomes hépatiques de souris de type « TEMOIN » et du NADPH,H⁺

3.6.1.2. Par le méthimazole (MTM)

Les monooxygénases à flavines sont des enzymes présentes dans la fraction microsomale et utilisant le NADPH,H⁺ en cofacteur. Afin de savoir si le MBLI-98 était pris en charge par ces enzymes, une expérience a été réalisée en ajoutant, au milieu d'incubation, du méthimazole, un inhibiteur compétitif de ce type d'enzymes (75).

En présence de méthimazole à 1 mM dans le milieu d'incubation contenant des microsomes hépatiques de souris et du NADPH,H⁺, la métabolisation du MBLI-98 semble inchangée. Parmi les métabolites identifiés précédemment, tous ont été retrouvés avec des cinétiques similaires à celles obtenues en l'absence d'inhibiteur.

3.6.1.3. Par le glutathion (GSH)

Dans l'hypothèse où une partie de la disparition du MBLI-98 serait due à la formation d'une espèce radicalaire, nous avons réalisé une incubation avec microsomes hépatiques de souris, en ajoutant au milieu du glutathion (GSH), un agent piègeur de radicaux libres.

En présence de GSH, la vitesse de métabolisation du MBLI-98 est inchangée. Sa disparition est toujours aussi rapide. Concernant les cinq métabolites identifiés, tous ont été retrouvés. La concentration du métabolite M5 s'est cependant avérée nettement plus faible qu'en absence de GSH (voir [Figure 63](#)). En revanche, les quatre autres métabolites ont présenté des cinétiques similaires à l'incubation sans GSH.

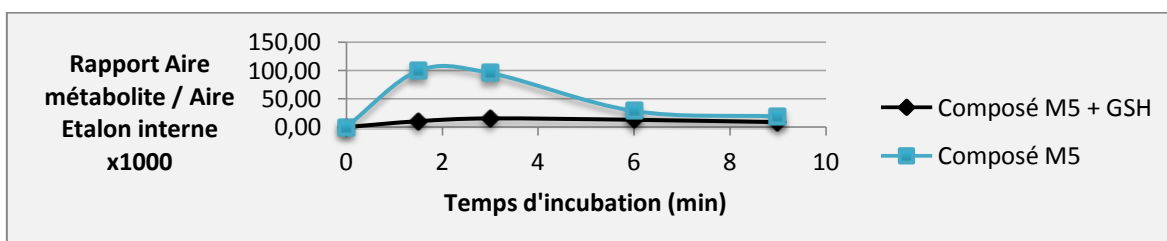


Figure 63 : Evolution de la quantité de métabolite N-déalkylé au cours du temps en présence ou non de glutathion (GSH) à la concentration de 7,4 mM dans le milieu d'incubation.

3.6.2. Etude de l'inhibition enzymatique du métabolisme de l'ifosfamide par le MBLI-98

L'ifosfamide est un substrat des cytochromes P450 3A4/5 et 2B6. Son schéma de métabolisation est rappelé sur la Figure 64.

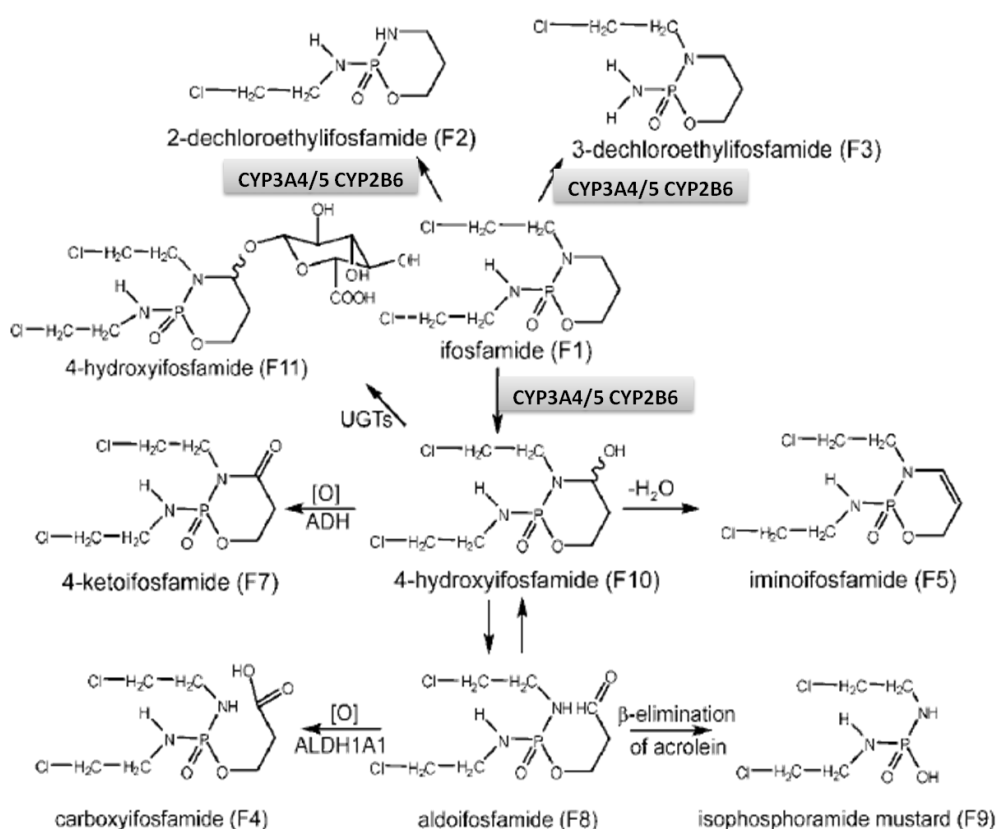


Figure 64 : Voies métaboliques principales de l'ifosfamide (76)

Etant donné la consommation extrêmement rapide du MBLI-98 et, dans un second temps, la disparition de ses métabolites, l'hypothèse d'un inhibiteur irréversible des P450 a été évoquée. Afin de savoir si le MBLI-98 était un substrat suicide des cytochromes P450 3A4, nous avons choisi d'étudier le métabolisme de l'ifosfamide en présence de MBLI-98.

La validité de notre méthode a préalablement été testée en utilisant la troléandomycine, un inhibiteur suicide connu des P450 3A4 (74).

Lors de l'incubation de l'ifosfamide avec des microsomes hépatiques de souris, nous avons observé une diminution progressive du substrat (voir [Figure 65](#)) ainsi qu'une apparition progressive de ses métabolites : 2-déchloroifosfamide, 3-déchloroifosfamide (voir [Figure 66](#)), isophosphoramide, 4-kétoifosfamide, 4-hydroxyifosfamide (voir [Figure 67](#)) et carboxyifosfamide.

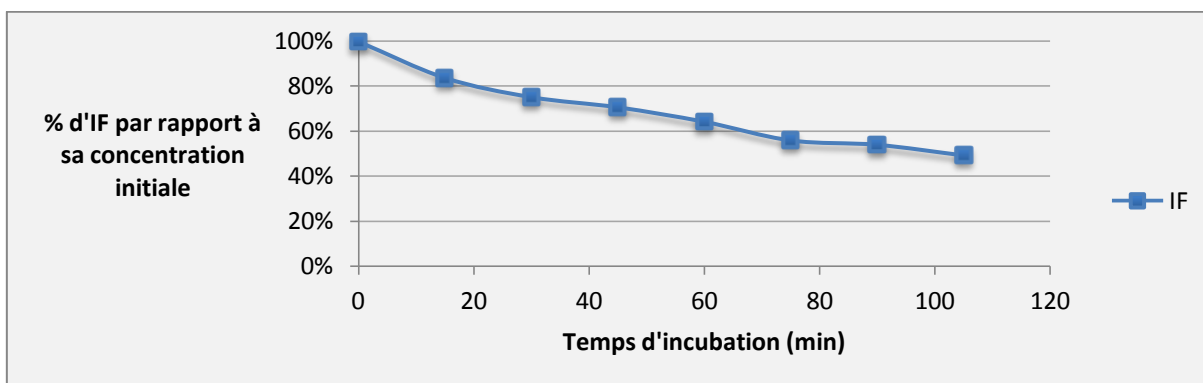


Figure 65 : Evolution de la quantité d'ifosfamide (IF) au cours du temps dans le milieu d'incubation.

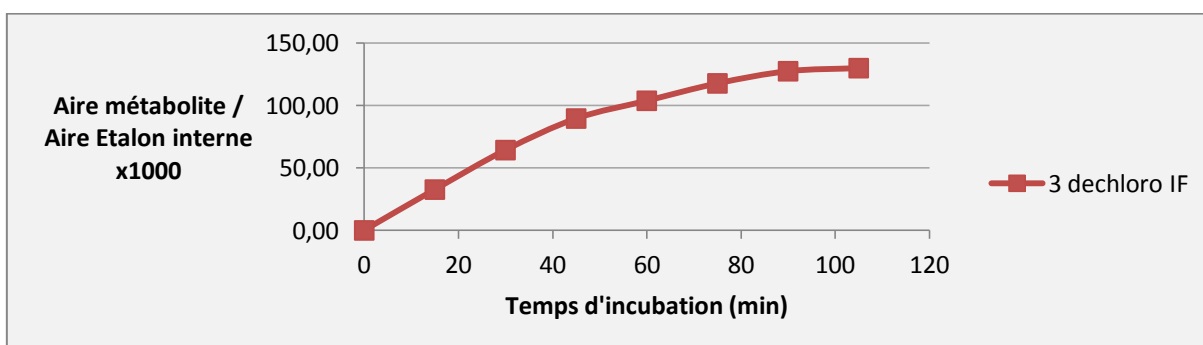


Figure 66 : Evolution de la quantité de 3-déchloroéthylifosfamide (3-déchloroIF) au cours du temps dans le milieu d'incubation.

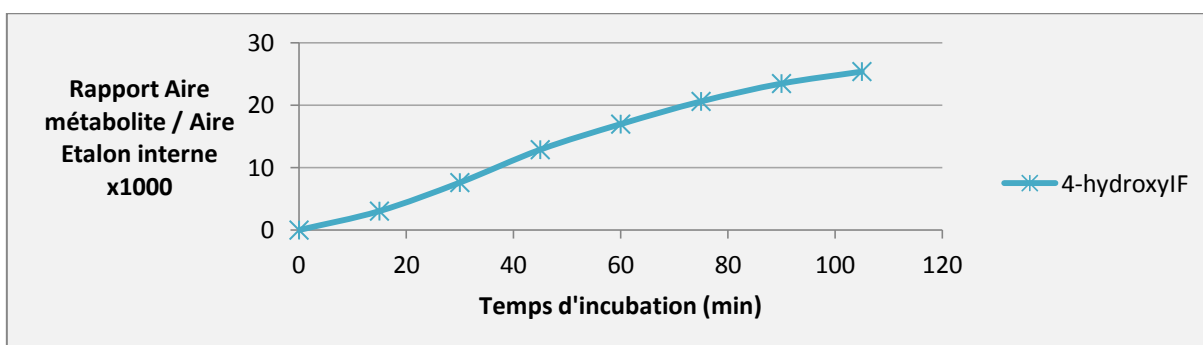


Figure 67 : Evolution de la quantité de 4-hydroxyifosfamide (4-hydroxyIF) au cours du temps dans le milieu d'incubation.

En présence de troléandomycine, la métabolisation de l'ifosfamide est fortement diminuée. A la concentration de 6 μM , après 30 min d'incubation, une diminution de la concentration de tous les métabolites de l'ifosfamide est observée (voir [Figure 68](#)). Son IC50, c'est-à-dire la concentration inhibant 50% de la métabolisation, a été estimée entre 2 et 6 μM pour le 3-déchloroifosfamide et le 4-hydroxyifosfamide (voir [Figure 69](#)).

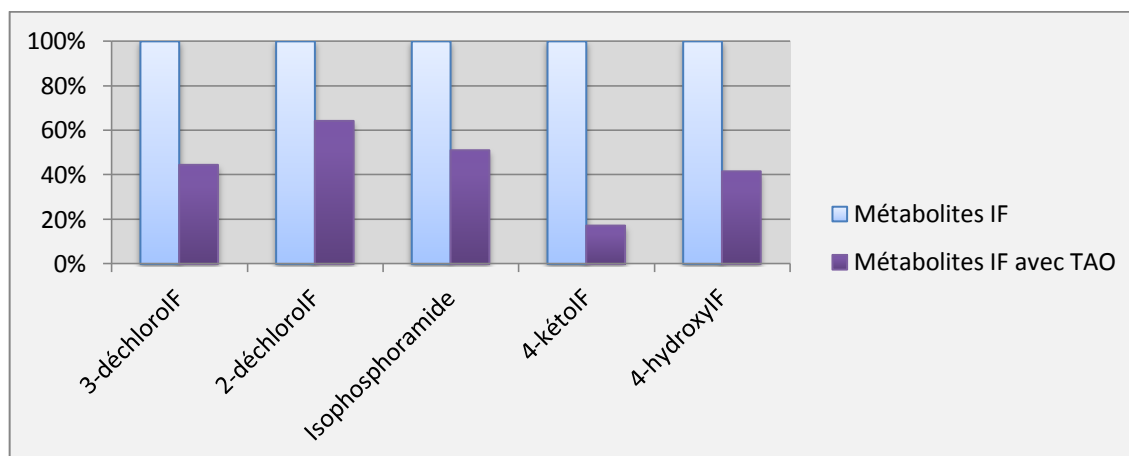


Figure 68 : Comparaison de la concentration des métabolites de l'ifosfamide en présence ou non de troléandomycine (TAO) à la concentration de 6 μM après 30 minutes d'incubation.

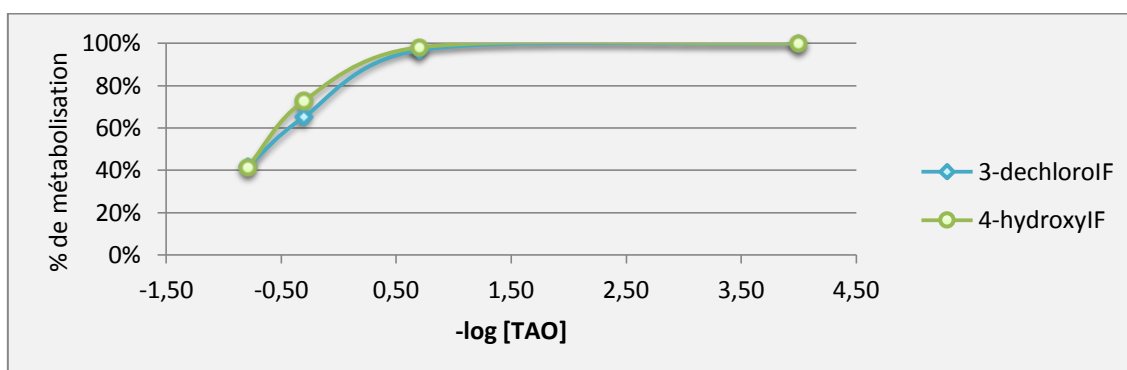


Figure 69 : Graphique permettant de déterminer l'IC50 de la troléandomycine (TAO) vis-à-vis de la métabolisation *in vitro* de l'ifosfamide au bout de 30 minutes. La valeur de 100% de métabolisation est prise pour l'échantillon sans troléandomycine.

La même expérience a ensuite été réalisée avec des concentrations croissantes de MBLI-98. A la concentration de MBLI-98 de 20 μM , seule la formation des 4-kétoifosfamide, 4-hydroxyifosfamide et isophosphoramidate est fortement diminuée. La

concentration des métabolites 2 et 3-déchloroéthylifosfamide reste inchangée (Figure 70). L'IC50 du MBLI-98 a été estimée aux environs de 20 μ M pour la formation du 4-hydroxyifosfamide et du 4-kétoifosfamide (voir Figure 71).

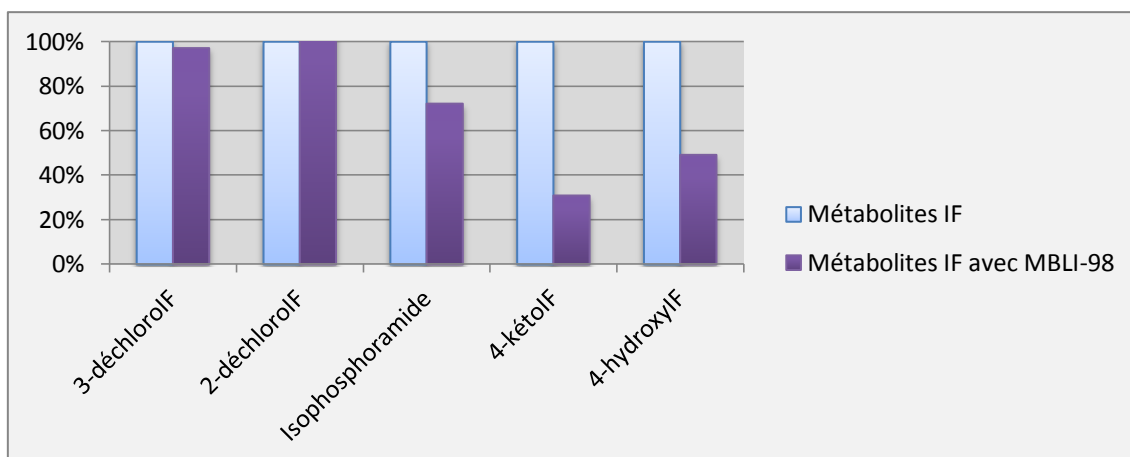


Figure 70 : Comparaison de la concentration des métabolites de l'ifosfamide en présence ou non de MBLI-98 à la concentration de 20 μ M après 90 minutes d'incubation.

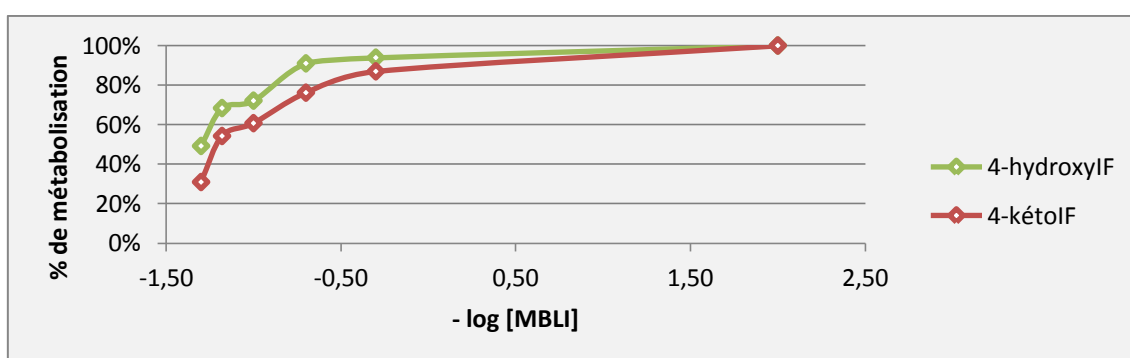


Figure 71 : Graphique permettant de déterminer l'IC50 du MBLI vis-à-vis de la métabolisation *in vitro* de l'ifosfamide au bout de 90 minutes. La valeur de 100% de métabolisation est prise pour l'échantillon sans troléandomycine.

3.6.3. Discussion

Deux types d'études d'inhibition ont été réalisés.

Le premier type d'étude a consisté à observer l'impact d'un inhibiteur enzymatique ou d'un antioxydant sur la métabolisation du MBLI-98.

Le blocage irréversible des cytochromes P450 3A4 par la TAO a entraîné une diminution de la vitesse de métabolisation du MBLI-98 ainsi qu'un ralentissement voire une absence de disparition des métabolites formés. Les résultats de cette étude suggèrent donc fortement que le MBLI-98 et ses métabolites soient pris en charge, en partie, par les cytochromes P450 3A4.

L'utilisation du méthimazole, un inhibiteur des monooxygénases à flavines, enzymes responsables de réaction de métabolisme de phase I, n'a pas permis de mettre en évidence une prise en charge du MBLI-98 par ces enzymes. En effet, en présence de méthimazole, la vitesse de métabolisation du MBLI-98 s'est avérée inchangée et tous les métabolites ont été détectés avec des concentrations et des cinétiques similaires.

L'ajout de glutathion au milieu d'incubation permet deux choses. D'une part, il permet d'empêcher la formation de radicaux libres. D'autre part, il s'agit d'un composé nucléophile, capable de se lier aux molécules électrophiles. Son utilisation permet donc de mettre en évidence une production de réactifs électrophiles. En présence de GSH, la vitesse de disparition du MBLI-98 n'a pas diminué. Ainsi, nous ne pouvons pas conclure quant à la formation d'un composé radicalaire expliquant une partie de la diminution du MBLI-98. Concernant la seconde propriété du GSH, si les métabolites identifiés du MBLI-98 étaient des métabolites électrophiles, le GSH s'y fixerait et les métabolites ne seraient plus détectés par les transitions *MRM* retenues précédemment. Seul le composé M5 a présenté une concentration largement inférieure à l'incubation témoin. Cela suggère donc qu'il

puisse s'agir d'un métabolite fortement électrophile, capable de se fixer sur des composés nucléophiles tels que les protéines.

En revanche, si le MBLI-98 est activé en composé réactif électrophile, cette expérience ne permet pas de le mettre en évidence. En effet, que le MBLI-98 se fixe aux protéines ou au glutathion, nous observerions dans les deux cas une diminution de sa concentration dans le milieu d'incubation. Pour savoir s'il y a une fixation du MBLI-98 au GSH, il faudrait entrer dans notre méthode de détection, une nouvelle transition, prenant en compte la masse du glutathion (307,3 g/mol), potentiellement fixé au MBLI-98.

Le second type d'étude d'inhibition a permis d'étudier le potentiel caractère inhibiteur du MBLI-98 envers la métabolisation de l'ifosfamide.

En présence d'un inhibiteur suicide des 3A4 (la troléandomycine), une diminution des 5 métabolites de l'ifosfamide est observée. Ces résultats correspondent à ce qui est classiquement retrouvé dans la littérature (77). Ainsi, le suivi de la concentration des métabolites de l'ifosfamide permet de mettre en évidence une inhibition des CYP 3A4. Contrairement à la TAO, le MBLI-98 ne diminue pas les concentrations de tous les métabolites de l'ifosfamide mais uniquement de ceux provenant d'une hydroxylation. De plus, cette diminution n'est observée que pour des concentrations assez élevées de MBLI-98 (20 μ M). Ainsi, les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure quant aux possibles propriétés inhibitrices du MBLI-98 envers le CYP 3A4.

3.7. Synthèse

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus par l'étude *in vitro* du métabolisme du MBLI-98, le schéma de métabolisation pouvant être envisagé est présenté Figure 72.

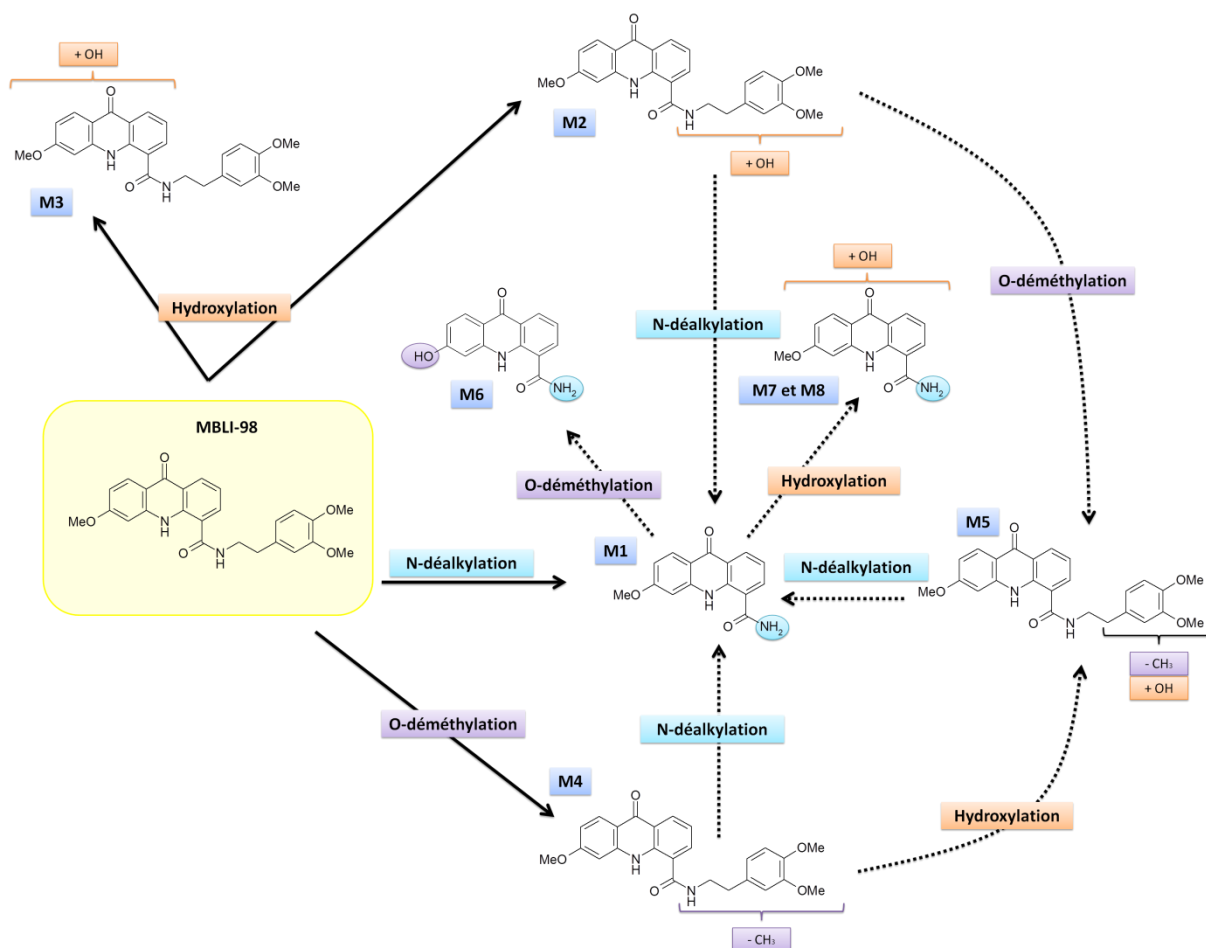


Figure 72 : Schéma de métabolisation du MBLI-98

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Mlle SAURAT Dominique

Le MBLI-98 est une molécule ayant montré des propriétés inhibitrices spécifiques du transporteur ABCG2, une des pompes à efflux à l'origine de la résistance des anticancéreux.

L'objectif de notre travail était d'identifier les métabolites du MBLI-98 produits *in vitro*. Nous avons fait l'hypothèse de départ que les cytochromes P450 étaient à l'origine de sa métabolisation. Ces derniers jouent un rôle majeur dans le métabolisme de nombreux médicaments. La connaissance des voies métaboliques peut permettre d'anticiper un risque d'interactions médicamenteuses. C'est pourquoi, lors du développement de nouvelles molécules, l'étude de leur métabolisme est effectuée.

En fonction de la structure du MBLI-98, différentes hypothèses de voies de métabolisation ont été définies. La partie expérimentale de notre travail a ensuite consisté à vérifier *in vitro* (microsomes hépatiques de souris et cellules hépatiques HepaRG) la présence de ces métabolites potentiels.

A partir des microsomes, en présence de NADPH, H⁺, le MBLI-98 disparaît extrêmement rapidement. Cinq métabolites ont été détectés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. L'analyse de leur spectre de masse permet de définir les réactions mises en jeu : une N-déalkylation, une hydroxylation, une O-déméthylation et une combinaison des deux dernières réactions. Le métabolite

N-déalkylé apparaît comme majoritaire. Le suivi du signal correspondant à ces métabolites montre, dans un premier temps, leur apparition rapide, puis secondairement, leur diminution, plus lente.

D'autre part, l'étude du métabolisme du MBLI-98 a été effectuée en présence d'un inhibiteur irréversible des cytochromes P450 3A4 (la troléandomycine) et d'un inhibiteur des monooxygénases à flavine (le méthimazole). Les résultats obtenus avec la troléandomycine laissent supposer la participation des cytochromes P450 3A4 dans la métabolisation du MBLI-98. Le rôle des monooxygénases à flavine a été écarté.

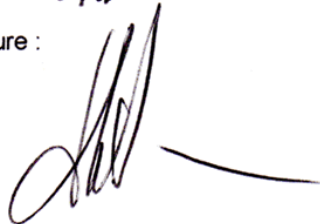
L'hypothèse que le MBLI-98 soit un substrat suicide des cytochromes P450 3A4 a également été testée. Pour cela, nous avons suivi la cinétique d'apparition des principaux métabolites de l'ifosfamide (substrat du P450 3A4) en absence et présence de concentrations croissantes de MBLI-98. Les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer notre hypothèse de départ.

Au vu de l'ensemble des résultats, pour expliquer la diminution extrêmement rapide du MBLI-98 ainsi que la diminution de ses métabolites après leur formation, nous proposons deux hypothèses. La première est qu'un ou plusieurs métabolites soient formés sans que nous ayons pu les identifier malgré les nombreuses hypothèses testées. La seconde hypothèse est que la métabolisation du MBLI-98 conduise à la formation de composés réactifs aboutissant à la formation d'adduits.

Le Président de la thèse, Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **24 MAI 2012**

Nom : *J. Guitho*

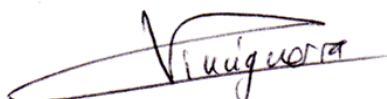
Signature :



Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeure C. VINCIGUERRA



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976; 455(1): 152-62.
2. Gerlach JH, Kartner N, Bell DR, Ling V. Multidrug resistance. *Cancer Surv*. 1986; 5(1): 25-46.
3. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(1): 48-58.
4. Holland IB. ABC proteins : from bacteria to man. Paris: Academic Press; 2003.
5. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5(3): 219-34.
6. Boumendjel A, Macalou S, Ahmed-Belkacem A, Blanc M, Di Pietro A. Acridone derivatives: design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. *Bioorg Med Chem* 2007; 15(8): 2892-7.
7. Arnaud O, Boumendjel A, Gèze A, Honorat M, Matera EL, Guitton J, et al. The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan. *Eur J Cancer*. 2011; 47(4): 640-8.
8. Nassar AF, Hollenberg PF, Scatina J. *Drug Metabolism Handbook: Concepts and Applications*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2009.
9. Pearson PG, Wienkers LC. *Handbook of Drug Metabolism*. New York : Informa Healthcare USA; 2008.
10. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 1996; 6(1): 1-42.
11. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1958; 75(2): 376-86.
12. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem*. 1962; 237: 1375-6.
13. Nelson DR. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys*. 1999; 369(1): 1-10.
14. Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med*. 1999; 20 (1-2): 12-24, 25-137.
15. Ortiz de Montellano P.R. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. New York: Springer; 2005.
16. Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2001; 58(5-6): 737-47.

17. Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem.* 1991; 266(21): 13469-72.
18. Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes : human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev.* 2002; 34(1-2): 83-448.
19. Guengerich FP. Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Adv Pharmacol.* 1997; 43: 7-35.
20. Zientek M, Miller H, Smith D, Dunklee MB, Heinle L, Thurston A, et al. Development of an *in vitro* drug-drug interaction assay to simultaneously monitor five cytochrome P450 isoforms and performance assessment using drug library compounds. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2008; 58(3): 206-14.
21. Silverman, Richard B. Mechanism-based enzyme inactivators. *Meth Enzymol.* 1995; 249: 240-83.
22. Newton DJ, Wang RW, Lu AY. Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the *in vitro* metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 1995; 23(1): 154-8.
23. Waxman DJ, Azaroff L. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J.* 1992; 281(3): 577-92.
24. Batt AM, Strazielle N, Siegst G. Induction et répression des cytochromes P450 : approche *in vivo* et *in vitro*. *Thérapie.* 1993; 48(6): 527-36.
25. Donato MT, Castell JV. Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism : focus on *in vitro* studies. *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42(2): 153-78.
26. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 2002; 99(24): 15655-60.
27. Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 2007; 168(1): 66-73.
28. Mahuzier G, Hamon M, Ferrier D, Prognon P. *Chimie analytique, Tome 2 : Méthodes de séparation, 3^e éd.* Paris: Masson; 2002.
29. Hamon M, Guernet M, Pellerin F, Mahuzier G. *Chimie analytique, Tome 3 : Méthodes spectrales et analyse organique 2^e éd.* Paris: Masson; 1998.
30. Chowdhury SK. Identification and quantification of drugs, metabolites and metabolizing enzymes by LC-MS. Amsterdam: Elsevier; 2005.
31. El Mrabet K. Développement d'une méthode d'analyse de résidus de pesticides par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem dans les matrices céréalières après extraction en solvant chaud pressurisé. Th Doctorat, Paris 6; 2008.

32. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(26): 15665-70.
33. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res*. 1998; 58(23): 5337-9.
34. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res*. 1999; 59(1): 8-13.
35. Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*. 2003; 22(47): 7340-58.
36. Polgar O, Robey RW, Bates SE. ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008; 4(1): 1-15.
37. Mao Q. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J*. 2005; 7(1): E118-E133.
38. Maliepaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, Pluim D, van Waardenburg RC, Ruevekamp-Helmers MC, et al. Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res*. 1999 ;59(18): 4559-63.
39. Robey RW, Medina-Pérez WY, Nishiyama K, Lahusen T, Miyake K, Litman T, et al. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2001; 7(1): 145-52.
40. Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update. *Toxicol In Vitro*. 2006; 20(2): 163-75.
41. Allen JD, Brinkhuis RF, Wijnholds J, Schinkel AH. The mouse BCRP1/MXR/ABCP gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res*. 1999; 59(17): 4237-41.
42. Schellens JH, Maliepaard M, Scheper RJ, Scheffer GL, Jonker JW, Smit JW, et al. Transport of topoisomerase I inhibitors by the breast cancer resistance protein. Potential clinical implications. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 922: 188-94.
43. Kawabata S, Oka M, Shiozawa K, Tsukamoto K, Nakatomi K, Soda H, et al. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 280(5): 1216-23.
44. Volk EL, Farley KM, Wu Y, Li F, Robey RW, Schneider E. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res*. 2002; 62(17): 5035-40.

45. Allen JD, Van Dort SC, Buitelaar M, van Tellingen O, Schinkel AH. Mouse breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein. *Cancer Res.* 2003; 63(6): 1339-44.
46. Burger H, van Tol H, Boersma AWM, Brok M, Wiemer EAC, Stoter G, et al. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood.* 2004; 104(9): 2940-2.
47. Candeil L, Gourdier I, Peyron D, Vezzio N, Copois V, Bibeau F, et al. ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int J Cancer.* 2004; 109(6): 848-54.
48. Komatani H, Kotani H, Hara Y, Nakagawa R, Matsumoto M, Arakawa H, et al. Identification of breast cancer resistant protein/mitoxantrone resistance/placenta-specific, ATP-binding cassette transporter as a transporter of NB-506 and J-107088, topoisomerase I inhibitors with an indolocarbazole structure. *Cancer Res.* 2001; 61(7): 2827-32.
49. Perego P, De Cesare M, De Isabella P, Carenini N, Beggiolin G, Pezzoni G, et al. A novel 7-modified camptothecin analog overcomes breast cancer resistance protein-associated resistance in a mitoxantrone-selected colon carcinoma cell line. *Cancer Res.* 2001; 61(16): 6034-7.
50. Ross DD, Yang W, Abruzzo LV, Dalton WS, Schneider E, Lage H, et al. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(5): 429-33.
51. Pick A, Müller H, Wiese M. Novel lead for potent inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). *Bioorg Med Chem Lett.* 2010; 20(1): 180-3.
52. Ahmed-Belkacem A, Pozza A, Macalou S, Pérez-Victoria JM, Boumendjel A, Di Pietro A. Inhibitors of cancer cell multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Anticancer Drugs.* 2006; 17(3): 239-43.
53. Nicolle E, Boumendjel A, Macalou S, Genoux E, Ahmed-Belkacem A, Carrupt P-A, et al. QSAR analysis and molecular modeling of ABCG2-specific inhibitors. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61(1): 34-46.
54. Maliepaard M, van Gastelen MA, Tohgo A, Hausheer FH, van Waardenburg RC, de Jong LA, et al. Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(4): 935-41.
55. Robey RW, Steadman K, Polgar O, Morisaki K, Blayney M, Mistry P, et al. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.* 2004; 64(4): 1242-6.
56. Ahmed-Belkacem A, Pozza A, Muñoz-Martínez F, Bates SE, Castanys S, Gamarro F, et al. Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Res.* 2005; 65(11): 4852-60.

57. Rabindran SK, He H, Singh M, Brown E, Collins KI, Annable T, et al. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res.* 1998; 58(24): 5850-8.
58. Lemos C, Jansen G, Peters GJ. Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer.* 2008; 98(5): 857-62.
59. Yang C-H, Chen Y-C, Kuo M-L. Novobiocin sensitizes BCRP/MXR/ABCP overexpressing topotecan-resistant human breast carcinoma cells to topotecan and mitoxantrone. *Anticancer Res.* 2003; 23(3B): 2519-23.
60. Wallstab A, Koester M, Böhme M, Keppler D. Selective inhibition of MDR1 P-glycoprotein-mediated transport by the acridone carboxamide derivative GG918. *Br J Cancer.* 1999; 79(7-8): 1053-60.
61. Traunecker HC, Stevens MC, Kerr DJ, Ferry DR. The acridonecarboxamide GF120918 potently reverses P-glycoprotein-mediated resistance in human sarcoma MES-Dx5 cells. *Br J Cancer.* 1999; 81(6): 942-51.
62. Evers R, Kool M, Smith AJ, van Deemter L, de Haas M, Borst P. Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-, MRP1- and MRP2-mediated transport. *Br J Cancer.* 2000; 83(3): 366-74.
63. Krishnegowda G, Thimmaiah P, Hegde R, Dass C, Houghton PJ, Thimmaiah KN. Synthesis and chemical characterization of 2-methoxy-N(10)-substituted acridones needed to reverse vinblastine resistance in multidrug resistant (MDR) cancer cells. *Bioorg Med Chem.* 2002; 10(7): 2367-80.
64. Macalou S, Pozza A, Terreux R, Magnard S, Boumendjel A, Di Pietro A. Discriminating selective and non-selective inhibitory sites of ABCG2 with acridone derivatives. *Soumis à publication.* 2010.
65. Stein WD, Yang J, Bates SE, Fojo T. Bevacizumab reduces the growth rate constants of renal carcinomas: a novel algorithm suggests early discontinuation of bevacizumab resulted in a lack of survival advantage. *Oncologist.* 2008; 13(10): 1055-62.
66. Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, Ijaz T, et al. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br J Cancer.* 2002; 86(5): 774-8.
67. Sale S, Verschoyle RD, Boocock D, Jones DJL, Wilsher N, Ruparelia KC, et al. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. *Br J Cancer.* 2004; 90(3): 736-44.
68. Mueller SO, Stopper H, Dekant W. Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome P450 enzymes. Bioactivation to genotoxic metabolites. *Drug Metab Dispos.* 1998; 26(6): 540-6.
69. Walle UK, Walle T. Bioavailable flavonoids: cytochrome P450-mediated metabolism of methoxyflavones. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35(11): 1985-9.

70. Salphati L, Tsutsui K, Chen Y, Pan L, Liu S, Takahashi L. Metabolism of the P-glycoprotein inhibitor GF120918 in human liver microsomes. AAPS J Annual meeting abstracts. 2000. http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2000/1940.htm, consulté le 17 janvier 2012.
71. Ward KW, Azzarano LM. Preclinical pharmacokinetic properties of the P-glycoprotein inhibitor GF120918A (HCl salt of GF120918, 9,10-dihydro-5-methoxy-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-2-isoquinolinyl)ethyl]phenyl]-4-acridine-carboxamide) in the mouse, rat, dog, and monkey. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004;310(2):703-9.
72. Poujol S, Pinguet F, Malosse F, Astre C, Ychou M, Culine S, et al. Sensitive HPLC-fluorescence method for irinotecan and four major metabolites in human plasma and saliva: application to pharmacokinetic studies. *Clinical Chemistry.* 2003; 49(11): 1900-8.
73. Weber GF, Waxman DJ. Activation of the anti-cancer drug ifosfamide by rat liver microsomal P450 enzymes. *Biochem Pharmacol.* 1993; 45(8): 1685-94.
74. Chang TK, Gonzalez FJ, Waxman DJ. Evaluation of triacetyloleandomycin, alpha-naphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 311(2): 437-42.
75. Nace CG, Genter MB, Sayre LM, Crofton KM. Effect of methimazole, an FMO substrate and competitive inhibitor, on the neurotoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile in male rats. *Fundam Appl Toxicol.* 1997; 37(2): 131-40.
76. Li F, Patterson AD, Höfer CC, Krausz KW, Gonzalez FJ, Idle JR. Comparative metabolism of cyclophosphamide and ifosfamide in the mouse using UPLC-ESI-QTOFMS-based metabolomics. *Biochem Pharmacol.* 2010; 80(7): 1063-74.
77. McCune JS, Risler LJ, Phillips BR, Thummel KE, Blough D, Shen DD. Contribution of CYP3A5 to hepatic and renal ifosfamide N-dechloroethylation. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33(7): 1074-81.

La Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

SAURAT Dominique

Etude *in vitro* du métabolisme d'un inhibiteur du transporteur ABCG2 : le MBLI-98. Intérêt de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2012, 138 p.

RESUME

La résistance à de multiples médicaments, dite « *multidrug resistance* », est actuellement l'un des enjeux majeurs de la lutte anticancéreuse. Les cellules tumorales peuvent notamment acquérir cette résistance par l'expression de pompes à efflux. Afin de contrer ce phénomène, des inhibiteurs de ces transporteurs ont été développés. C'est le cas du MBLI-98, identifié comme inhibiteur spécifique du transporteur ABCG2.

L'objectif de ce travail était d'étudier *in vitro* le métabolisme du MBLI-98 (6-méthoxy-9-oxo-9,10-dihydroacridine-4-carboxylic acid-3,4-diméthoxyphénéthylamide). Compte-tenu de sa structure chimique, différentes hypothèses de voie de métabolisation ont été envisagées.

Le MBLI-98 a été incubé, sous différentes conditions, avec des microsomes hépatiques de souris ou des cellules hépatiques humaines HepaRG, afin de vérifier ces hypothèses. Une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem a permis de suivre la disparition du substrat ainsi que la détection de potentiels métabolites. Les résultats ont montré une disparition extrêmement rapide du MBLI-98 ainsi que l'apparition de cinq métabolites. Le principal métabolite du MBLI-98 mis en évidence proviendrait d'une N-déalkylation. Les autres composés proviendraient d'une O-déméthylation ou d'une hydroxylation sur les différents noyaux de la molécule.

MOTS CLES

Biotransformation (métabolisme)
Microsomes
Cytochrome P450
Spectrométrie de masse

JURY

Mr GUITTON Jérôme, Professeur
Mme PAYEN Léa, Maître de conférences
Mr DI PIETRO Attilio, Directeur de recherches
Mr MULLOT Jean-Ulrich, Pharmacien en Chef
Mr PREVOSTO Jean-Michel, Pharmacien en Chef


DATE DE SOUTENANCE

Jeudi 28 juin 2012

ADRESSE DE L'AUTEUR

Ecole de Santé des Armées – Promotion Gabrielle
331 avenue du Général De Gaulle – 69675 BRON CEDEX



 06 01 99 75 70

contact@imprimerie-mazenod.com

www.thesesmazenod.fr