

UNIVERSITE DE LIMOGES

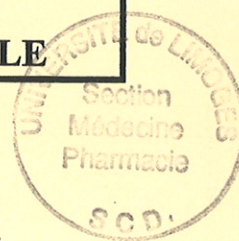
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1998



THESE N° 317 / 1

**COCULTURE DE CELLULES CACO-2/TC-7 HT-29MTX
INTERETS DANS L'ETUDE DE L'ABSORPTION INTESTINALE**



THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le : 29 Juin 1998

PAR

Catherine PONTIER

Née le 19 Octobre 1974 à Brive-la-Gaillarde (19)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur Dominique CHULIA - Présidente
Monsieur Jean PACHOT - Juge
Monsieur le Professeur Philippe ARNAUD - Juge
Monsieur le Professeur Claude BROSSARD - Juge
Madame Martine LARTIGUE - Juge

**CORPS ENSEIGNANT DE
LA FACULTE DE PHARMACIE DE LIMOGES**

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESEURS

Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
Monsieur DREYFUSS (Maître de Conférences)

PROFESSEURS

BENEYTOU Jean-Louis	Biochimie et Biologie moléculaire
BERNARD Michel	Physique – Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Bactériologie – Virologie – Parasitologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie organique - Chimie thérapeutique
CARDOT Philippe	Chimie analytique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie générale et minérale
GHESTEM Axel	Botanique et cryptogamie
HABRIOUX Gérard	Biochimie fondamentale
LACHATRE Gérard	Toxicologie
MOESCH Christian	Hygiène – Hydrologie – Environnement
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie

**SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE – CHEF DES SERVICES
ADMINISTRATIFS**

POMMARET Maryse

REMERCIEMENTS

Je remercie les laboratoires Hoechst-Marion-Roussel qui m'ont accueillie pendant neuf mois et qui ont permis la réalisation de ce travail.

A Jean PACHOT. Les mois que j'ai passés dans votre laboratoire m'ont énormément apporté dans un domaine qui m'était totalement inconnu. Ce travail est l'occasion de vous exprimer ma gratitude et mon profond respect.

A Madame le Professeur Dominique CHULIA. Vous êtes la première à m'avoir donné envie d'étudier la galénique. Vous m'avez toujours conseillée et encouragée. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de ma profonde admiration.

A Monsieur le Professeur Philippe ARNAUD. Vous m'avez apporté votre expérience et votre soutien durant ces quelques mois. Vos conseils ont toujours été efficaces, soyez-en remercié.

A Monsieur le Professeur Claude BROSSARD. Vous avez accepté de juger ce travail, que cette thèse soit l'expression de ma reconnaissance.

A Madame Martine LARTIGUE. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

A Dominique LECAQUE. Veuillez recevoir l'expression de ma sincère reconnaissance pour votre aide tout au long de l'année.

A mes parents. Pour votre soutien et votre patience absolue pendant toutes ces années où vous avez eu à supporter mon humeur «enjouée» de périodes d'examen.

A mes deux «médecins» préférés : ma sœur Sandrine et Emmanuelle. Plus particulièrement en souvenir de l'année 1997...

A Karine et Pierre, en souvenir de nos cinq années d'études communes.

A Nathalie ZACCHILLI et Malika ELZAABI pour votre bonne humeur communicative et votre active collaboration pendant ces neuf mois.

A Cédric, en souvenir d'expériences de petits chimistes quelque peu «explosives».

A Marie-Noëlle, Stefan et tous les autres...

PLAN

INTRODUCTION

TRAVAUX ANTERIEURS

1. **MECANISMES DE L'ABSORPTION INTESTINALE**
 - 1.1. Structure anatomique de l'intestin
 - 1.2. Structure cytologique de la muqueuse intestinale
 - 1.3. Mécanismes de passage à travers l'épithélium intestinal
 - 1.3.1. Polarisation de l'épithélium intestinal
 - 1.3.2. Passage paracellulaire
 - 1.3.3. Passage transcellulaire

2. **METHODES D'ETUDE DE LA RESORPTION INTESTINALE**
 - 2.1. Intestin isolé et perfusé
 - 2.2. Intestins isolés *in vitro*
 - 2.3. Vésicules de la membrane de la bordure en brosse
 - 2.4. Cultures cellulaires
 - 2.4.1. Cellules Caco-2/TC-7
 - 2.4.1.1. Aspect morphologique
 - 2.4.1.2. Aspect biochimique
 - 2.4.2. Cellules HT29-MTX
 - 2.4.2.1. Aspect morphologique
 - 2.4.2.2. Aspect biochimique
 - 2.4.3. Utilisation des cultures cellulaires
 - 2.4.3.1. Modèle Caco-2
 - 2.4.3.2. Modèles HT29-MTX
 - 2.4.4. Coculture de cellules intestinales
 - 2.4.4.1. Aspect morphologique
 - 2.4.4.2. Perméabilité des cocultures

CONCLUSION

TRAVAUX PERSONNELS

1. **MATERIEL ET METHODES**
 - 1.1. Les cellules
 - 1.2. Culture cellulaire
 - 1.2.1. Entretien des lignées
 - 1.2.2. Culture sur filtres
 - 1.3. Microscopie électronique
 - 1.4. Microscopie optique
 - 1.5. Courbe de croissance
 - 1.6. Mesure de la résistance transépithéliale
 - 1.7. Etudes de perméabilité
 - 1.7.1. Molécules
 - 1.7.2. Cinétiques de passage
 - 1.8. Influence du mucus des cellules HT29-MTX et de la coculture
 - 1.9. Statistiques

3. RESULTATS

2.1. Morphologie et caractéristiques fonctionnelles

2.1.1. Aspect morphologique

2.1.1.1. Cellules Caco-2

2.1.1.2. Cellules HT29-MTX

2.1.1.3. Coculture

2.1.2. Croissance cellulaire

2.1.3. Evolution de la résistance transépithéliale en fonction du temps

2.1.4. Effet du mucus sur la résistance transépithéliale

2.2. Etude des perméabilités apparentes sur les trois modèles

2.2.1. Passage passif

2.2.2. Etudes de sécrétion

2.2.3. Effet du mucus sur la perméabilité des cellules HT29-MTX

3. DISCUSSION

3.1. Morphologie et caractéristiques fonctionnelles

3.2. Etudes de perméabilités

3.2.1. Comparaison des modèles

3.2.2. Rôle du mucus

3.2.3. Prédiction de l'absorption chez l'Homme

CONCLUSION

TRAVAUX ANTERIEURS

INTRODUCTION

Le développement de nouveaux médicaments dans l'industrie pharmaceutique nécessite de connaître le potentiel d'absorption des molécules, et ce, à un stade très précoce. Actuellement, un grand nombre de molécules de structures proches sont préparées rapidement par chimie combinatoire ou par synthèse parallèle, et seules celles qui pourront être résorbées à travers l'intestin seront conservées pour les études ultérieures. Le changement de stratégie dans le processus de découverte de nouvelles entités chimiques impose d'avoir un outil rapide et efficace pour appréhender les mécanismes de résorption intestinale. Pendant longtemps, les études préliminaires de pharmacocinétique associaient la connaissance du coefficient de partage octanol-eau de la molécule ($\log P$) et des études lourdes sur le Rat. Le coefficient de partage octanol-eau était utilisé pour prédire le partage de la molécule entre le liquide intestinal et les phospholipides membranaires, en considérant que le caractère lipophile des phospholipides est comparable à celui de l'octanol. Des méthodes plus sophistiquées et plus pertinentes, utilisant principalement le Rat, permettaient d'affiner la connaissance du potentiel d'absorption. Elles consistaient principalement en intestin isolé et perfusé, en travail en chambre d'Ussing et en manipulations sur le Rat entier. Cependant, ces méthodes sont très lourdes et consomment de grandes quantités de produit ; de plus, elles sont inadaptées aux études à haut débit et les enzymes et transporteurs sont qualitativement et quantitativement différents chez l'Homme et chez l'Animal, ce qui peut fausser les résultats. Ces modèles sont donc sujets à certaines limites d'interprétation. Depuis une dizaine d'années, des modèles de cellules intestinales humaines ont été développés.

Les cellules humaines utilisées comme modèle de l'absorption intestinale sont classées en quatre classes selon leurs caractéristiques de différenciation (4). Les cellules de type I, comme les cellules Caco-2/TC7, se différencient spontanément en culture, alors que les

cellules HT29, dont la différenciation doit être induite, sont de type II. Comme les cellules de types I et II, les cellules de type III (T84) s'organisent en monocouches, mais n'expriment pas de marqueurs de différenciation. Les cellules de type IV forment des multicouches et ne se différencient pas *in vitro*. La lignée la plus utilisée et la plus décrite est la lignée Caco-2. Les cellules les plus nombreuses dans l'intestin humain sont les entérocytes qui sont responsables de la résorption intestinale. Les cellules Caco-2 et les cellules HT29 dans certaines conditions se différencient en entérocytes et l'étude du passage des molécules à travers ces modèles permet d'appréhender la résorption en terme quantitatif pouvant être corrélé avec la fraction absorbée chez l'Homme, et en terme mécanistique (passage paracellulaire ou transcellulaire, actif ou passif). Certains auteurs (45) considèrent que le modèle Caco-2/TC7 est limité du fait de l'absence de mucus. *In vivo*, la deuxième catégorie essentielle de cellules intestinales est constituée par les cellules caliciformes qui sécrètent dans la lumière intestinale un mucus qui protège la paroi et qui, selon certains (20), influencerait le passage des molécules lipophiles en le diminuant. Cultivées dans certaines conditions, les cellules HT29 se différencient en cellules productrices de mucus (cellules HT29-MTX).

Pour pallier à ces insuffisances, un nouveau modèle de cellules, constitué de cellules ayant des propriétés de résorption et de cellules productrices de mucus a été créé. Ce modèle est une coculture de cellules Caco-2 et de cellules HT29-MTX. Peu d'études ont permis d'évaluer son intérêt par rapport au modèle Caco-2.

Notre étude a consisté à mettre au point un modèle de coculture Caco-2/HT29-MTX et à comparer ses caractéristiques à celles des modèles Caco-2/TC7 et HT-29MTX. La caractérisation porte à la fois sur les propriétés cytologiques des modèles Caco-2/TC7, HT29-MTX et coculture, et sur les propriétés d'absorption de vingt molécules de référence sur ces trois modèles.

1. MECANISMES DE L'ABSORPTION INTESTINALE

L'absorption d'une molécule à travers la muqueuse gastrique ou intestinale est l'une des conditions essentielles pour qu'elle ait un effet thérapeutique par voie orale. Du fait de son pH acide, de l'ordre de 1 à 2, l'estomac ne constitue pas un lieu privilégié de résorption, sauf pour les molécules acides. De nombreuses molécules étant basiques, et donc ionisées à ce pH, la résorption ne peut se faire qu'au niveau de l'intestin. De plus, l'intestin présente une surface de diffusion très importante, liée à la présence de replis eux-mêmes constitués de microvillosités multipliant la surface d'un facteur 300.

La connaissance du devenir d'une molécule dans l'intestin est essentielle d'un point de vue quantitatif (fraction absorbée), mais également d'un point de vue qualitatif pour appréhender le devenir du médicament dans l'organisme. Le passage peut s'effectuer selon différents processus liés à la structure histologique et cytologique de l'intestin.

1.1. Structure anatomique de l'intestin (40)

La paroi de l'intestin est constituée de différentes couches (figure 1). La couche la plus externe, la couche séreuse (40), est une prolongation du péritoine. Elle est composée de cellules mésentériales et de tissu conjonctif lâche.

A son contact se trouve la musculature constituée de deux couches de muscle lisse. La plus externe est une couche de fibres longitudinales et la plus interne une couche de fibres transversales. Chaque couche est responsable respectivement du péristaltisme intestinal et des contractions intestinales. Des fibres nerveuses innervent ces muscles.

La troisième tunique intestinale est la sous-muqueuse constituée de fibres conjonctives et de cellules immunitaires (lymphocytes, éosinophiles, macrophages, mastocytes). C'est également à ce niveau que se situent les plexus veineux et lymphatiques et les fibres nerveuses composant le plexus sous-muqueux.

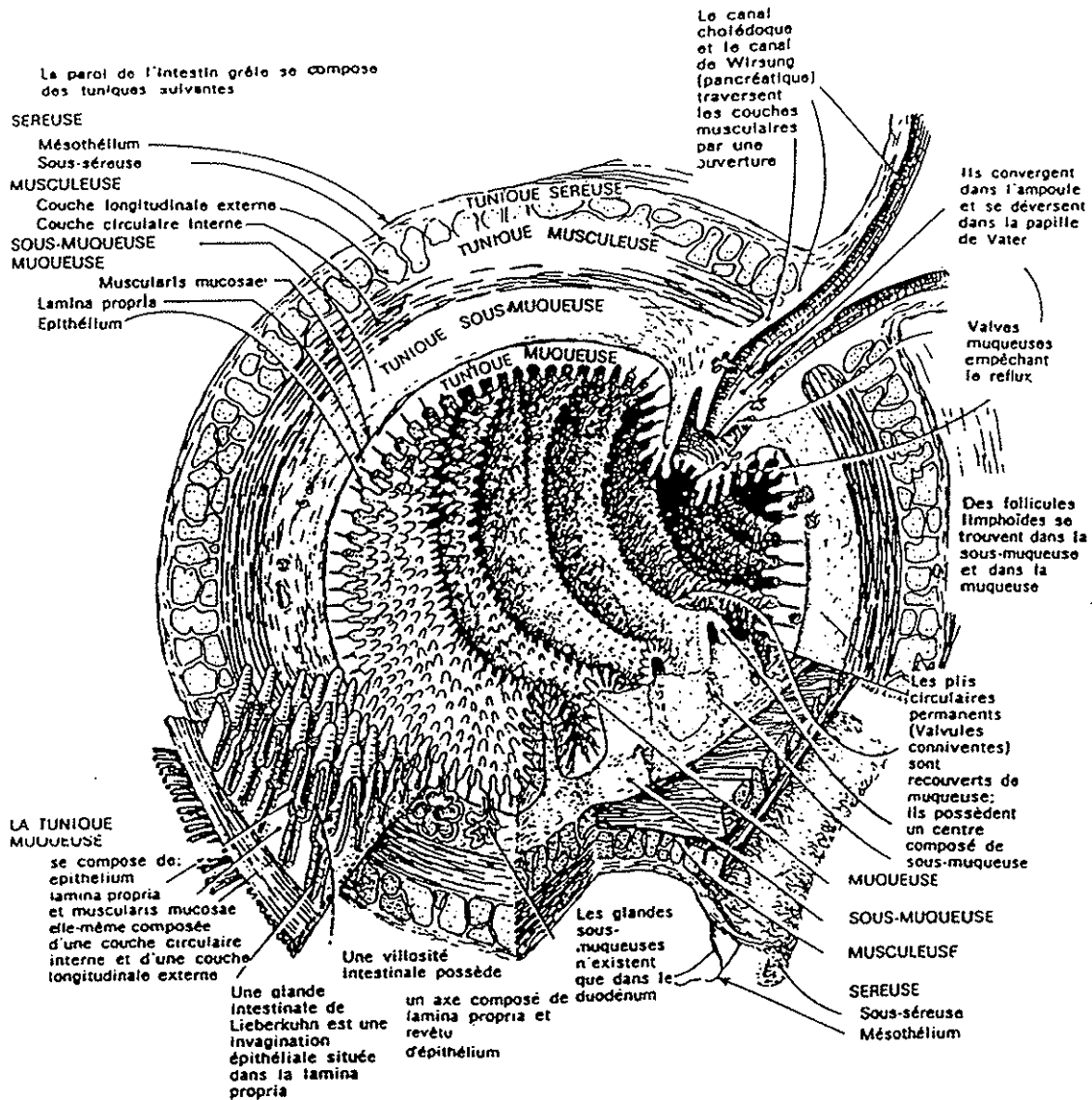


Figure 1 : Structure de l'intestin. Coupe transversale, d'après Histologie et microanatomie du corps humain. ELIAS H., PAULY J.E., BURNS E.R. Ed. Desoer. Liège (1981)

La couche en contact avec le bol alimentaire est la muqueuse, seule responsable de la résorption intestinale. Elle est divisée en trois couches. La plus profonde

est la *muscularis mucosae*, couche fine de muscle lisse qui sépare la muqueuse de la sous-muqueuse. La *lamina propria* constitue le tissu de soutien des microvillosités, des cellules de natures très différentes (fibroblastes, éosinophiles, lymphocytes, macrophages, cellules musculaires...) s'y trouvent également. La dernière couche est formée d'une monocouche de cellules épithéliales. Elle constitue la barrière limitante au passage des molécules de la lumière intestinale vers la circulation sanguine.

1.2. Structure cytologique de la muqueuse intestinale

La couche muqueuse est constituée de replis. Le fond de ces plis, appelé crypte, est formé de cellules indifférenciées (14) et de cellules de Paneth. Ces dernières ont un rôle bactéricide (40) et sont impliquées dans certains processus de phagocytose.

Au cours de la différenciation, les cellules immatures migrent vers le sommet des replis. A ce niveau, les entérocytes sont majoritaires. Ce sont des cellules polarisées présentant un pôle apical ou muqueux (côté luminal) et un pôle basal ou séreux. Le pôle apical est développé en microvillosités serrées formant une bordure en brosse. Les entérocytes sont reliés entre eux par un système jonctionnel qui limite la perméabilité de la couche et qui associe des jonctions serrées et des desmosomes. Ces cellules sont riches en transporteurs protéiques (transporteur des oligopeptides, de glucose...), notamment côté apical, qui permettent de prendre en charge des molécules (tableau I : page 14). La membrane cellulaire des entérocytes possède également des systèmes enzymatiques (estérases, peptidases) responsables du métabolisme intestinal.

La deuxième catégorie de cellules de la muqueuse intestinale est constituée par les cellules caliciformes. Ces cellules produisent un mucus intestinal riche en

mucopolysaccharides qui protègent la muqueuse contre les attaques du contenu du bol alimentaire et qui ont également un rôle dans la défense immunitaire (20). Comme les entérocytes, ce sont des cellules polarisées qui sécrètent du mucus à leur pôle apical. Leur surface est lisse, avec de très rares microvillosités et peu de transporteurs. Les observations en microscopie montrent que les cellules caliciformes sont dispersées au milieu des cellules entérocytaires.

1.3. Mécanismes de passage à travers l'épithélium intestinal

Les deux voies essentielles de passage des molécules à travers l'épithélium intestinal sont la voie paracellulaire et la voie transcellulaire (figure 2).

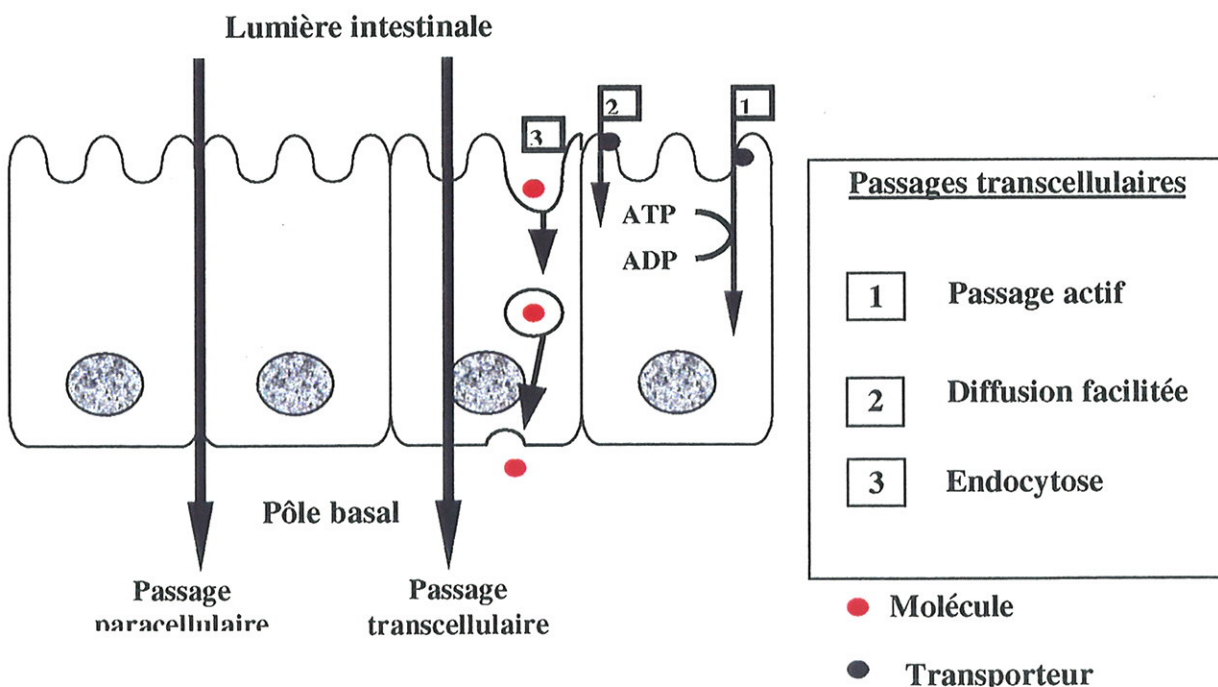


Figure 2 : Mécanismes de transports à travers les entérocytes.

1.3.1. Polarisation de l'épithélium intestinal

Les cellules entérocytaires et caliciformes présentent une polarisation morphologique et électrique qui influence le mécanisme de résorption des molécules.

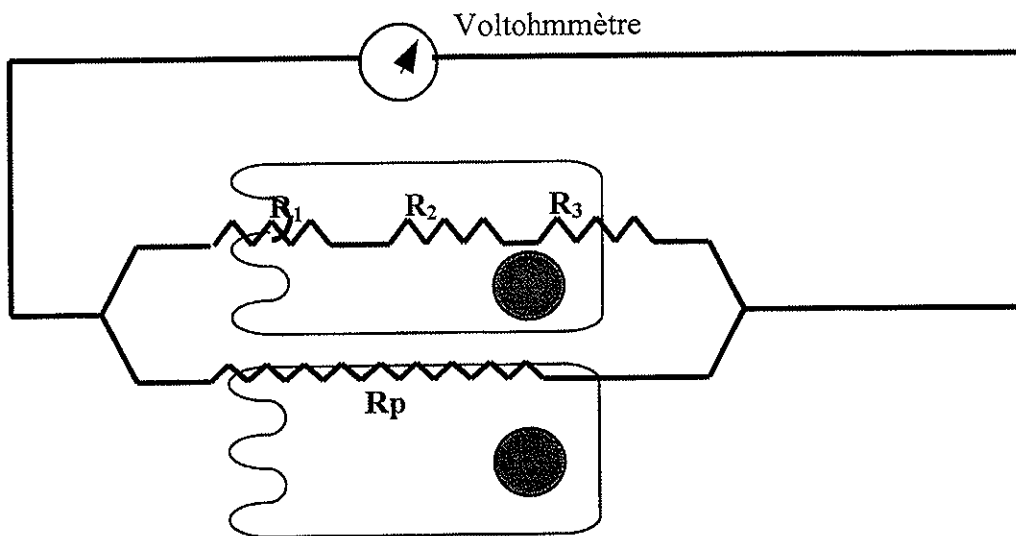
Les cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées situées à leur pôle apical. Ce pôle est formé par la bordure en brosse des entérocytes, riche en enzymes et en transporteurs, responsables de l'influx ou de l'efflux des molécules (tableau I). C'est également au niveau du pôle apical que les cellules caliciformes sécrètent leur mucus. La répartition intracellulaire des organites de ces deux types cellulaires (mitochondries, noyau...) montre également une polarisation. Le noyau se trouve au pôle basal, entouré par l'appareil de Golgi.

Tableau I : Transporteurs de la bordure en brosse des entérocytes

Dénomination	Molécule transportée	Mécanisme	Couplage	Absorption/Sécrétion
SGLT-1	Acides aminés	Actif	Na ⁺	Absorption
	Glucose	Diffusion facilitée	Na ⁺	
GLUT-5	D-fructose	Facilité		Absorption
	Acides biliaires	Facilité		Absorption
PEPT-1	Di/tripeptides	Actif	Antiport Na ⁺ -K ⁺	Absorption
P-glycoprotéine	Xénobiotiques	Actif		Sécrétion

La polarisation électrique de l'épithélium intestinal est liée à la présence de barrières constituant des résistances assimilables à des résistances électriques. Les jonctions serrées constituent un premier type de barrière, limitant le passage paracellulaire. Le milieu intercellulaire est parfois associé aux jonctions serrées pour définir cette notion de résistance paracellulaire. Le deuxième type de résistances constitue la résistance transcellulaire, formée

par les membranes cellulaires apicale et basolatérale et par le milieu intracellulaire (37). Ces deux barrières (ou résistances) ont des propriétés qui peuvent être déterminées expérimentalement. Il s'agit de la perméabilité, quantifiée par la résistance transépithéliale (TEER : Transepithelial Electrical Resistance, en $\Omega \cdot \text{cm}^2$) et la sélectivité qui correspond à l'aptitude de l'épithélium à distinguer les ions entre eux et à favoriser le passage de certains d'entre eux (37). Cette sélectivité provient de l'existence de systèmes de transports et de pompes ainsi que de la diffusion passive à travers les canaux ioniques. Les électrolytes traversent la barrière intestinale par voie transcellulaire et par voie paracellulaire. Les trois résistances composant la résistance transcellulaire s'opposent à ce passage. Parallèlement, les électrolytes retraversent l'épithélium par la voie paracellulaire qui n'est constituée que d'une seule résistance. Les mesures de chaque type de résistances montrent que la résistance transcellulaire est quantitativement la plus importante (37) (figure 3).



R_1 : résistance de la membrane apicale
 R_2 : résistance cytosolique
 R_3 : résistance de la membrane basolatérale

R_p : résistance paracellulaire

Figure 3 : Résistance à la diffusion à travers l'épithélium intestinal. Origine de la résistance transépithéliale

$$R_{tr} = R_1 + R_2 + R_3$$

où R_{tr} est la résistance transcellulaire

Selon la loi d'Ohm appliquée à des résistances montées en parallèle, la résistance totale R_T s'écrit :

$$\frac{1}{R_T} = \frac{1}{R_{tr}} + \frac{1}{R_p} \quad (1)$$

La résistance transcellulaire étant quantitativement beaucoup plus importante que la résistance paracellulaire, $1/R_{tr}$ est négligeable devant $1/R_p$.

(1) devient :

$$\frac{1}{R_T} \cong \frac{1}{R_p}$$

La résistance transépithéliale est donc assimilable à une mesure indirecte de la taille des jonctions serrées.

1.3.2. Passage paracellulaire

Les jonctions serrées délimitent un passage paracellulaire étroit qui limite le passage aux molécules hydrophiles de petite taille (de l'ordre de 6 à 8 Å). L'espace intercellulaire est chargé négativement et seules les molécules chargées positivement ou neutres pourront diffuser par cette voie. A taille égale, les molécules cationiques diffusent plus que les molécules neutres (1). Le mécanisme de ce passage est de type passif, dans le sens du gradient de concentration et son évaluation quantitative se fait par mesure de la diffusion d'un composé hydrophile comme le mannitol, qui ne diffuse *in vitro* que par ce mécanisme. Plus la perméabilité au mannitol est faible, plus les jonctions sont serrées ; en

revanche, si l'épithélium subit une altération, le passage du mannitol est considérablement augmenté.

1.3.3. Passage transcellulaire

Il est 1000 fois plus important que la voie paracellulaire grâce aux microvillosités qui augmentent la surface de résorption. Cinq types de passage transcellulaire existent :

- La diffusion passive est le mécanisme le plus important pour les xénobiotiques. Ses caractéristiques sont les mêmes que dans le cas du passage paracellulaire.
- Le passage actif se fait contre le gradient de concentration et nécessite de l'énergie. Il utilise les transporteurs protéiques présents à la surface apicale ou basolatérale des entérocytes, spécifiques de chaque série chimique (tableau I page 14). Certaines molécules thérapeutiques utilisent ces transporteurs pour leur résorption intestinale. C'est le cas des céphalosporines, de l'amoxicilline et du captopril qui utilisent le transporteur PEPT-1 (15). Le passage actif peut s'effectuer dans le sens de la résorption ou de l'excrétion. La P-glycoprotéine (P-gp) est un système d'efflux situé à la surface apicale des cellules qui provoque une détoxification de l'organisme. Ses substrats ont des caractéristiques communes : présence d'un cycle hydrophobe, grande lipophilie, présence d'un groupement basique amino (21). Ce mécanisme est surtout important pour les anticancéreux comme la doxorubicine (DOXORUBICINE[®]), mais le vérapamil (ISOPTINE[®]) et des macrolides comme l'azithromycine (ZITHROMAX[®]) sont également concernés. De plus en plus de

substrats de la P-gp sont mis en évidence.. Par ailleurs, il semble qu'il existe d'autres systèmes d'efflux proches de la P-glycoprotéine.

- La diffusion facilitée utilise d'autres types de transporteurs, le passage se fait dans le sens du gradient de concentration et ne consomme donc pas d'énergie.
- Le transport actif secondaire est couplé à un courant ionique.
- L'endocytose concerne certains systèmes thérapeutiques comme les nanoparticules ou certains liposomes. Ce mécanisme demeure mal connu.

La résorption des xénobiotiques est essentiellement un mécanisme passif, mais elle peut être augmentée par utilisation des transporteurs naturellement présents au niveau de la bordure en brosse.

2. METHODES D'ETUDE DE LA RESORPTION INTESTINALE

La prévision de la capacité d'une nouvelle molécule à être résorbée au niveau de l'intestin est essentielle, à une étape très précoce de la recherche. Différents modèles, utilisant l'Animal entier ou des portions d'intestin ont été mis au point à cette fin. Dans ce chapitre, seront présentées très brièvement les différentes techniques d'études de l'absorption intestinale.

2.1. Intestin de Rat isolé et perfusé (23)

Une portion déterminée d'intestin (duodénum, jéjunum ou iléon) est isolée et une certaine quantité de la molécule à étudier est introduite de manière isopéristaltique. La quantité de molécule non résorbée est mesurée en aval pour calculer le pourcentage d'absorption. Cette technique permet d'étudier l'influence de la bile sur la résorption. Une mesure de la métabolisation intestinale peut être faite par dosage de la molécule à la fois dans le sang portal et à la sortie du morceau d'intestin isolé. Un dosage sanguin au niveau de la carotide permet d'appréhender l'effet de premier passage hépatique et la distribution de la molécule. L'intestin isolé perfusé permet d'analyser la sécrétion intestinale de la molécule : la molécule est administrée en intraveineuse et dosée dans l'intestin.

Cette méthode permet d'étudier l'influence de nombreux facteurs (pH, liquide vecteur...) sur la résorption intestinale de la molécule.

Son inconvénient essentiel est sa mise en œuvre difficile, posant des problèmes éthiques liés au grand nombre d'Animaux nécessaires. Elle nécessite de grandes quantités de la molécule à étudier. Les enzymes du Rat sont qualitativement et quantitativement différentes de celles de l'Homme et les résultats obtenus sont difficilement transposables dans le cas des prodrogues transformées au niveau de l'intestin et dans le cas où le métabolisme intestinal est important.

2.2. Intestins isolés *in vitro*

Il s'agit de deux techniques utilisant des intestins de Rat :

- Chambres d'Ussing : une portion choisie d'intestin est prélevée et débarrassée de son tissu conjonctif. Elle est ensuite déposée entre deux demi-cellules. Elle délimite deux compartiments : le compartiment luminal (côté apical des cellules) et le compartiment séreux (côté basal des cellules). La molécule est introduite du côté apical pour les études d'absorption et du côté séreux pour les études de sécrétion. Le passage de la molécule est mesuré en fonction du temps par dosage dans le milieu receveur.
- Sacs retournés : des portions d'intestin sont prélevées et retournées pour que le côté apical des cellules se trouve à l'extérieur du cylindre prélevé. Le dosage du médicament peut se faire dans le compartiment externe (muqueux) ou interne (séreux).

Ces deux méthodes permettent d'étudier le métabolisme intestinal des molécules et les phénomènes de transport. Leur avantage essentiel est qu'elles permettent de déterminer le site d'absorption, en fonction du niveau d'intestin prélevé. Ces techniques peuvent permettre de

déterminer les mouvements ioniques éventuellement associés à la résorption et l'effet de promoteurs d'absorption.

Leur inconvénient est leur reproductivité variable, dépendante de la qualité du prélèvement d'organe. De plus, la viabilité des sacs retournés est faible. L'utilisation des chambres d'Ussing est relativement développée car elle permet de connaître le mécanisme de passage et de mettre en évidence un éventuel effet toxique de la molécule.

2.3. Vésicules de la membrane de la bordure en brosse

Les membranes apicales des cellules sont séparées par différentes centrifugations et ultracentrifugations. Elles subissent ensuite un traitement pour être transformées en vésicules. Des vésicules animales et même humaines peuvent être ainsi préparées.

Cette méthode permet de différencier les phénomènes de diffusion des phénomènes de transport en réalisant la manipulation à différentes températures. Comme dans le cas des intestins isolés *in vitro*, les couplages ioniques et l'effet du pH peuvent être étudiés.

Le principal inconvénient des vésicules est leur conservation qui doit se faire à -80°C et qui est très mauvaise pour les vésicules d'origine humaine.

2.4. Cultures cellulaires

Ces modèles utilisent des cellules humaines d'origine cancéreuse qui ont la propriété de se différencier en cellules intestinales dont les propriétés sont très proches de celles des cellules saines et qui adhèrent aux supports sur lesquels elles se développent. Les principales

sont des cellules se différenciant en entérocytes. Il s'agit des cellules Caco-2 (Carcinoma of Colon) et HT29 (Human Tumor). Ces deux lignées ont été décrites par Fogh et ont été obtenues à partir d'adénocarcinomes de colon humain dans les années 70 (19). A partir de ces lignées mères, des clones ont été isolés en fonction de l'âge des cellules et de leurs conditions de culture (11, 12). Pour les cellules Caco-2, tous les clones se différencient en entérocytes. Le clone TC7 (noté Caco-2/TC7) est obtenu au passage 198 des cellules parentales (13) et ses propriétés cytologiques sont conservées en fonction du temps de culture. Contrairement aux autres clones, il exprime le système du cytochrome P450, responsable du métabolisme intestinal ce qui en fait un modèle intestinal de choix (37).

A partir de la lignée HT29, différents clones sont obtenus selon les conditions de culture et leurs caractéristiques sont très variables. Les cellules HT29 parentales peuvent se différencier en entérocytes, c'est le cas pour les cellules HT29 cl.19A (34) et des cellules HT29-18-C₁ (16). Elles peuvent aussi se différencier en cellules caliciformes (cellules HT29-MTX (27), HT29-H (25)).

2.4.1. Cellules Caco-2/TC7

2.4.1.1. Aspect morphologique

Les cellules sont à confluence sur leur support après 7 jours de culture, puis elles se différencient avec développement d'une bordure en brosse formée de microvillosités denses et régulières. Elles forment une monocouche de cellules polarisées comparable à celle qui forme l'épithélium intestinal. Au bout de trois semaines, les cellules Caco-2 sont plus petites que les entérocytes sains (8,5 μm à 17,7 μm pour les Caco-2, versus

25 μm pour les entérocytes humains). Elles sont reliées entre elles par un système de jonctions serrées de 10 à 50 Å proches de celles du colon humain (17). En fonction de la nature du clone, ces jonctions sont plus ou moins étroites, ce phénomène est étudié par mesure de la résistance transépithéliale et de la perméabilité au mannitol radiomarqué (tableau II). Pour le clone TC-7, de façon générale, la résistance transépithéliale et les quantités d'enzymes détectées augmentent jusqu'à 21 jours de culture (17). Au-delà de 30 jours, les cellules commencent à se détacher de leurs supports et certains de leurs caractères dégèrent (diminution de l'expression de la plupart des enzymes...), c'est pourquoi les cellules sont utilisées entre 21 et 30 jours de culture.

Tableau II : Evolution de la maturité des jonctions serrées (TEER et perméabilité au mannitol) et de la membrane cellulaire des cellules Caco-2 parentales (perméabilité à la testostérone) en fonction du temps de culture (17)

Molécule	Nombre de passages	TEER ($\Omega.\text{cm}^2$)	Perméabilité ($\times 10^{-6} \text{ cm/s}$)
Mannitol	<28	Non déterminé	1,17
	<u>85-95 (clone TC-7)</u>	<u>300</u>	<u>0,18</u>
Testostérone	13-30	Non déterminé	63,00
	65-70	Non déterminé	40,70
	<u>85-95 (clone TC-7)</u>	<u>300</u>	<u>51,80</u>
	90-100	210	56,00

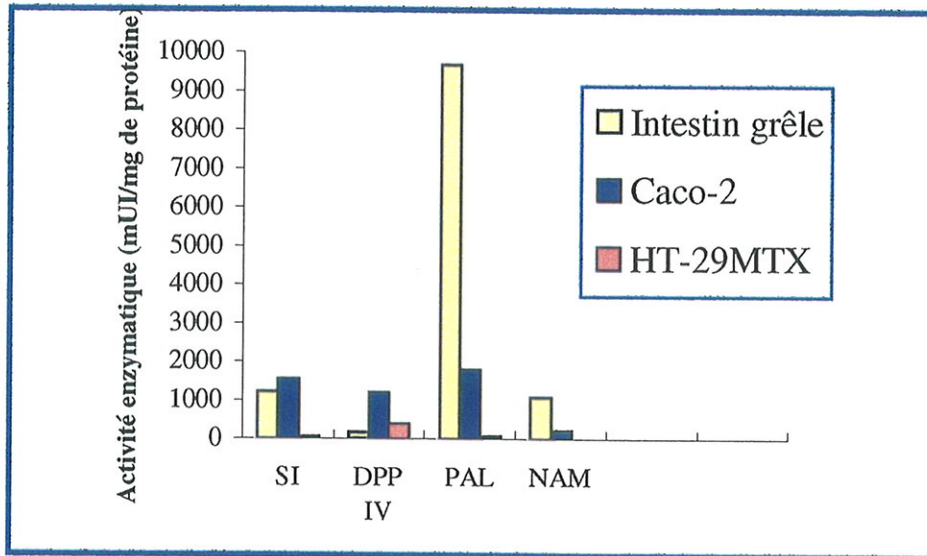
2.4.1.2. Aspect biochimique

Les cellules Caco-2/TC7 expriment les principaux systèmes enzymatiques rencontrés dans les entérocytes de l'épithélium intestinal (15), mais en quantités très différentes des valeurs physiologiques (tableau III). L'interprétation des résultats de la littérature est difficile car les méthodes de dosage varient d'un laboratoire à l'autre, de même que les conditions de culture et l'âge des cellules.

Parallèlement à ces systèmes enzymatiques situés au niveau du pôle apical des entérocytes, les cellules Caco-2/TC7 possèdent un cytochrome de la famille P450. Il s'agit des CYP3A4 et CYP3A5. Ces deux systèmes présentent plus de 84% d'acides aminés communs (14, 38) et ils dégradent les mêmes substrats. Ces systèmes enzymatiques sont intracytoplasmiques, sans répartition notable dans la cellule. Les CYP3A4 et CYP3A5 sont présents dans l'intestin grêle, le foie adulte et fœtal. Les quantités de cytochrome sont très faibles par rapport à celles qui sont détectées dans l'intestin sain.

Tableau III : Activité des principaux systèmes enzymatiques de la membrane apicale des entérocytes sains, des cellules Caco-2/TC7 et HT-29MTX (8, 9, 11, 15, 27)

Enzyme	Rôle	Activité enzymatique en mUI/mg de protéine		
		Intestin grêle	Caco-2/TC7	HT-29MTX
Saccharidase (SI)	Disaccharidase	1230 (11)	1560 (11)	0 (15, 27) 40 (11)
Dipeptidylpeptidase (DPP IV)	Clive les di et tripeptides côté N-terminal au niveau des prolines et alanines	160 (11)	135 (15) 1200 (11)	21 (27), 120 (15, 27) 400 (11)
Phosphatase alcaline (PAL)	Clive les liaisons Leu-Gly, Leu-Gly ₂ , Leucinamide	9700 (11)	206 (15) 1800 (11)	50 (11)
N-Amino-peptidase	Phosphomonoestérase : clive les liaisons R-P*, à pH alcalin	1095 (11)	25 (15) 210 (11)	18 (15) 7 (27)



*R-P : Radical-Phosphate

SI : saccharase

PAL : phosphatase alcaline

DPP IV : dipeptidylpeptidase IV

NAM : N-aminopeptidase

Figure 4 : Activités des principales enzymes de la bordure en brosse des entérocytes, des cellules Caco-2/TC7 et HT29-MTX, d'après BOULENC (11)

Du fait de leur nature cancéreuse, les cellules Caco-2 expriment des marqueurs qui ne sont pas communément présents dans les cellules intestinales saines. L'antigène carcino-embryonnaire (ACE), marqueur de certaines tumeurs coloniques et exprimé dans l'intestin fœtal, est présent dans cette lignée cellulaire. La P-glycoprotéine, qui existe en faibles quantités dans l'intestin humain sain, est surexprimée à la surface apicale des cellules. Ce phénomène est à l'origine d'un efflux important des molécules prises en charge par ce transporteur.

2.4.2. Cellules HT29-MTX

Les cellules HT29 parentales ne se différencient pas spontanément en culture. Il est nécessaire de modifier le milieu de culture pour qu'il y ait différenciation en entérocytes et/ou en cellules caliciformes (tableau IV).

Cultivées en présence de méthotrexate (MTX) à la concentration de 10^{-6} M, les cellules HT29 parentales se différencient en cellules caliciformes (HT29-MTX). Au bout de quatre mois de culture avec le MTX, le caractère est définitivement acquis et les cellules peuvent être cultivées dans un milieu sans méthotrexate (27-30).

Tableau IV : Différenciation des cellules HT29 en fonction du milieu de culture (15, 27, 28, 29, 30)

Milieu de culture	Différenciation
Milieu conventionnel*	Moins de 5% de différenciation
Milieu conventionnel, pas de glucose mais ajout de galactose	Cellules productrices de mucus
Milieu classique + 5-fluorouracile	Entérocytes + Cellules productrices de mucus
Milieu classique + MTX 10^{-6} M	Cellules productrices de mucus
Milieu classique + MTX 10^{-7} M	Entérocytes + Cellules productrices de mucus
Milieu classique + MTX 10^{-3} M	Cellules enterocyte-like
Milieu de Roswell **	Entérocytes

*DMEM (Dubelcco's modified Eagle's Medium) + 4,5g/L de glucose + Sérum de veau foetal

** Milieu de Roswell : RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium)

2.4.2.1. Aspect morphologique

Les cellules HT29-MTX sont confluentes après sept jours de culture (27). Elles forment une monocouche de cellules reliées entre elles par des jonctions serrées. Au bout de trois semaines de culture, les cellules HT29-MTX ont une taille légèrement plus petites que les cellules Caco-2 matures (communication orale du Docteur T. Lesuffleur). Les

cellules sont polarisées et sécrètent leur mucus de nature mucopolysaccharidique hydrophile au pôle apical. La sécrétion augmente au cours de la culture (27, 28, 30). Pour certains, le mucus constituerait une limite à la diffusion des molécules lipophiles, pour d'autres il serait négligeable (25). Lorsqu'elles ne sécrètent pas de mucus, les cellules présentent à leur pôle apical quelques microvillosités éparses et irrégulières, relativement courtes par rapport à celles des cellules Caco-2/TC7 (43). Les cellules HT29 caliciformes notées HT29-MTX sont caractérisées par une résistance transépithéliale élevée, de l'ordre de $600 \Omega \cdot \text{cm}^2$, alors que celles qui sont notées HT29-H (45) ont une TEER de l'ordre de $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ à maturité.

2.4.2.2. Aspect biochimique

Les cellules HT29-MTX ont un potentiel enzymatique faible par rapport à celui des cellules Caco-2 (tableau III, figure 4). Comme pour les cellules Caco-2, le cytochrome mis en évidence dans les cellules HT29-MTX est de type CYP3A4 et CYP3A5. Cependant, contrairement au cas des cellules Caco-2, sa répartition est compartimentée : il n'est retrouvé qu'à la partie supérieure de la cellule, entre le noyau et les granules de sécrétion de mucus (14). La P-glycoprotéine semble présente à des taux très faibles, inférieurs aux seuils de détection en immunofluorescence ou en western-blot (27).

Du fait de la présence prolongée de méthotrexate (MTX) dans le milieu de culture, les cellules HT29-MTX ont développé un système de résistance commun à de nombreuses lignées cancéreuses : elles présentent un taux important de dihydrofolate réductase (DHFR) qui est la cible du MTX et expriment en excès le gène correspondant (29).

2.4.3. Utilisation des cultures cellulaires

2.4.3.1. Modèle Caco-2

Les cellules Caco-2 sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour sélectionner les molécules présentant une résorption intestinale suffisante pour envisager leur administration par voie orale. La chimie combinatoire prépare des molécules dont le squelette de base est modifié par ajout de substituants variables, et le modèle Caco-2 permet, dans un délai très bref, de savoir quelles sont les substitutions assurant le meilleur passage intestinal. Ce modèle doit être validé en étudiant le passage de diverses molécules connues (fraction absorbée chez l'Homme, log P, pK... connus). Les études de passage s'effectuent à l'aide d'un modèle à deux compartiments séparés par l'épithélium, appelé chambre de diffusion. Elles consistent à utiliser la molécule à étudier à une concentration connue, associée à une très faible quantité de la même molécule radiomarquée au ^{14}C ou au ^3H . La molécule est introduite au niveau du pôle apical de la cellule. La quantité de molécule radiomarquée diffusant est dosée au cours du temps et la perméabilité apparente à la molécule (P_{app}) est calculée à l'aide de la formule (1).

$$P_{\text{app}} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \times \frac{1}{A \cdot C_0} \quad (\text{cm/s}) \quad (1)$$

avec dQ/dt : quantité de molécule qui diffuse par unité de temps (flux de molécule),

A : surface de diffusion, surface du filtre sur lequel se développent les cellules (cm^2)

C_0 : concentration initiale de la solution dans le compartiment donneur de molécule (compartiment apical pour les études de la résorption, basolatéral pour les études de sécrétion).

La validation du modèle permet d'établir une corrélation entre le pourcentage d'absorption et la perméabilité déterminée *in vitro*. De nombreuses corrélations de ce type ont été publiées (1, 5, 26, 43, 48). En fonction des conditions expérimentales (nature du clone, conditions de culture, travail en statique ou en dynamique), les résultats sont différents d'un laboratoire à l'autre (tableau V). La comparaison de ces résultats est délicate dans la mesure où des sels de molécules sont parfois utilisés pour les études et peuvent modifier les perméabilités. Les valeurs obtenues ne permettent pas d'obtenir des corrélations, mais des tendances qui distinguent trois catégories de molécules :

- Molécules fortement absorbées (pourcentage d'absorption > 90%)
- Molécules moyennement absorbées (pourcentage d'absorption [20%, 90%])
- Molécules faiblement absorbées (pourcentage d'absorption < 20%).

Selon les auteurs, les valeurs limites de perméabilités correspondant à ces fractions absorbées sont variables (tableau VI).

Tableau V : Perméabilités apparentes de molécules de référence sur cellules Caco-2. Comparaison des données de la littérature (5, 48)

Molécule	Pourcentage d'absorption ^(a)	Papp (10 ⁻⁶ cm/s) selon Yee	Papp (10 ⁻⁶ cm/s) selon Artursson
Testostérone	100	51,80	72,27
Dexaméthasone	100	12,50	23,40
Aspirine	100	2,40	30,67
Propranolol	90	41,90	27,50
Mannitol	16	0,18	0,65
PEG 4000	0	0,052	0,78

(a) Fraction absorbée chez l'Homme

Artursson définit trois types de molécules en fonction de leur perméabilité apparente sur cellules Caco-2 :

- Absorption complète : Papp > 10⁻⁶ cm/s,
- 1% < Absorption < 100% : 10⁻⁷ cm/s < Papp < 10⁻⁶ cm/s,
- Absorption < 1% : Papp < 10⁻⁷ cm/s (5).

Généralement, les auteurs définissent des classes plus larges (tableau VI), permettant une meilleure différenciation des molécules en terme de résorption intestinale.

Tableau VI : Relation absorption *in vivo*-perméabilité sur cellules Caco-2 (39, 48)

Absorption <i>in vivo</i>	<20%	20-90%	>90%
Papp ⁽¹⁾ (cm/s) selon Yee	$<10^{-6}$	$10^{-6} - 10^{-5}$	$>10^{-5}$
Papp ⁽¹⁾ (cm/s) selon Rubas	$<10^{-5}$	$10^{-5} - 7.10^{-5}$	$>7.10^{-5}$

⁽¹⁾ Papp : perméabilité apparente mesurée sur cellules Caco-2

2.4.3.2. Modèle HT29-MTX

Jusqu'à présent, les cellules HT29-MTX ont été essentiellement utilisées pour effectuer des études morphologiques. Les caractéristiques des cellules sont très variables d'un laboratoire à l'autre (25, 27) : les cellules notées, dans la littérature, HT29-H ont des résistances transépithéliales faibles (de l'ordre de $100 \pm 49 \Omega \cdot \text{cm}^2$), alors que les cellules HT29-MTX ont une TEER moyenne de $600 \Omega \cdot \text{cm}^2$ et devraient donc être moins perméables que les cellules HT29-H et que les cellules Caco-2/TC7 (TEER $\approx 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Karlsson (25) a étudié l'influence du mucus sur la résistance transépithéliale et a montré que le retrait du mucus ne modifie pas la diffusion des ions et ne modifie pas la TEER ($p < 0,05$).

L'inconvénient des cellules HT29 différenciées en cellules caliciformes provient de leur faible taux d'enzymes et de transporteurs qui risque d'être à l'origine d'une faible perméabilité aux molécules transportées activement au niveau de l'épithélium intestinal. De telles études n'existent pas, jusqu'à présent, dans la littérature.

Quelques travaux (44, 45) ont été menés pour comparer les perméabilités obtenues à celles qui sont déterminées sur les modèles Caco-2/TC7. Généralement, les résultats ne portent que sur une molécule hydrophile (mannitol) et une molécule lipophile (testostérone).

Les résultats sont différents d'un laboratoire à l'autre (25). Wikman a montré que la perméabilité des cellules HT29-MTX à la testostérone est 6 fois plus faible que celle qui est déterminée sur cellules Caco-2. Les essais de lavage des monocouches de cellules HT29-H entraînent une augmentation significative de la perméabilité à la testostérone. Ce résultat tendrait à montrer que le mucus de nature polysaccharidique constitue une barrière au passage des molécules lipophiles.

2.4.4. Coculture de cellules intestinales

Face aux insuffisances du modèle Caco-2, liées notamment à l'absence de mucus pouvant influencer la résorption intestinale, et à la faible perméabilité des cellules Caco-2 par rapport à l'intestin humain (43), quelques études ont porté sur la mise au point des cocultures constituées de cellules Caco-2 et de cellules HT29 différenciées en cellules caliciformes (43, 45). Ces modèles constitueraient un modèle associant le rôle de barrière du mucus au potentiel d'absorption des entérocytes. Peu de résultats portant sur une coculture Caco-2/HT29 ont été publiés.

2.4.4.1. Aspect morphologique

Ces études ont mis en évidence que les deux types de cellules peuvent se développer en formant une monocouche de cellules polarisées caractérisées par une résistance transépithéliale qui augmente lorsque la quantité de cellules Caco-2 augmente (43). D'après les résultats publiés (43, 45), les cellules caliciformes ne se comportent pas de la

même façon selon qu'il s'agit des cellules HT29-H ou HT29-MTX : en coculture, les cellules HT29-H ne forment des monocouches de cellules jointives avec les cellules Caco-2 que si le milieu de culture est modifié. Pour que les cellules HT29-H adhèrent à la surface de culture, il est nécessaire d'ajouter du collagène. Wikman-larhed rapporte que les cellules HT29-H ont un taux de croissance plus important que les cellules Caco-2 et ce phénomène aboutit, à partir d'une coculture contenant 1% de cellules caliciformes, à une coculture constituée de 48 à 56% de cellules caliciformes au terme de trois semaines de culture (45). Ce phénomène n'est pas rapporté par Walter qui réalise une coculture à 50% de cellules Caco-2/TC7 et 50% de cellules HT29-MTX.

Les cocultures obtenues dans les deux cas présentent des caractères morphologiques identiques. Dans les deux cas, il existe environ 20% de cellules indifférenciées au milieu des cellules matures. Les cellules Caco-2 et les cellules HT29 différenciées en cellules caliciformes forment des plages isolées les unes des autres. Il a cependant été possible de mettre en évidence la formation de jonctions serrées entre les deux types de cellules. Wikman-Larhed suppose que ce phénomène est lié à la présence de collagène qui provoque la migration des cellules Caco-2 qui se regroupent (45). Une autre hypothèse rapproche ce phénomène aux vitesses de croissance différentes des deux lignées : les cellules HT29-H, dont la croissance est plus rapide que celle des cellules Caco-2/TC7, encerclent, après différenciation, les cellules Caco-2.

2.4.4.2. Perméabilité des cocultures

Les cellules Caco-2 et HT29-MTX se développent en formant une monocouche de cellules polarisées, caractérisée par une résistance transépithéliale

intermédiaire entre celle des cellules Caco-2 et celle des cellules HT29-MTX. A 25 jours de culture, Wikman-Larhed obtient des TEER de $98,8 \pm 15,1 \Omega.cm^2$ pour les cocultures, de $120,1 \pm 24,3 \Omega.cm^2$ pour les cellules Caco-2 et de $75,8 \pm 3,7 \Omega.cm^2$ pour les cellules HT29-MTX (45). Ces valeurs correspondent à des résistances transépithéliales très faibles. Walter (43) a réalisé trois séries de cocultures avec différentes proportions de chaque lignée cellulaire et constate que la TEER de la coculture est d'autant plus faible que la quantité de cellules HT29-MTX est importante (figure 5).

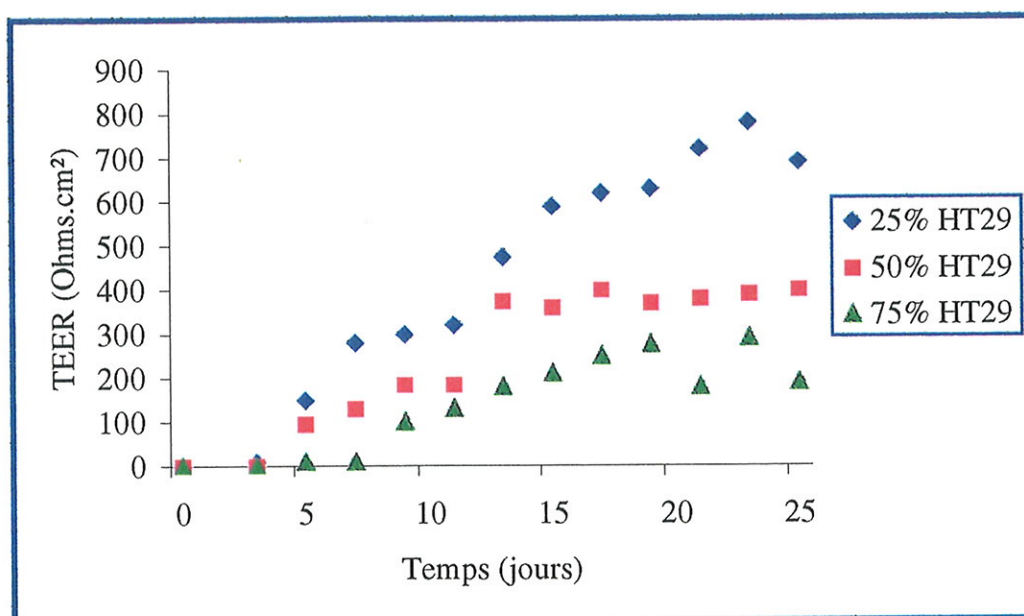


Figure 5 : Evolution de la TEER des cocultures en fonction de la quantité de HT29 et en fonction du temps, d'après Walter (43).

Théoriquement, le passage paracellulaire des cocultures sera plus important que celui des modèles Caco-2. Le passage de molécules qui traversent les monocouches par la voie paracellulaire, comme des polyéthylène glycols de différentes masses molaires, vérifie cette hypothèse (45). La figure 6 montre que la taille moyenne du passage paracellulaire, évaluée par mesure de la TEER, est différente pour les trois modèles et que les cellules HT29-H sont 3 à 13,6 fois plus perméables que les cellules Caco-2 et que la coculture est 1,6 à 5,0 fois plus perméable que le modèle Caco-2 (45).

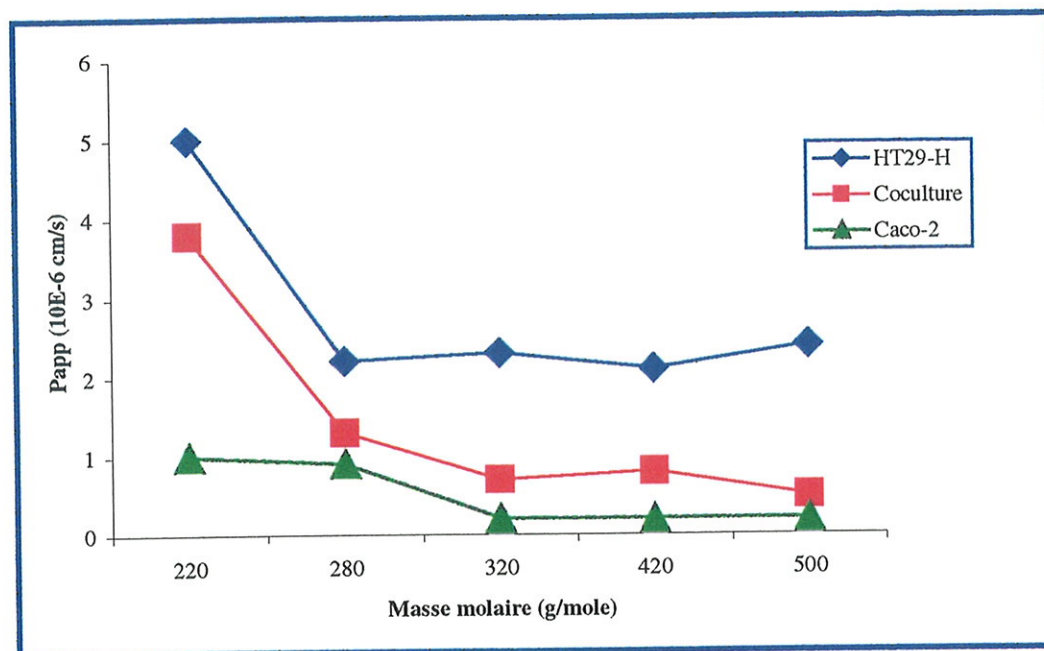


Figure 6 : Perméabilité des trois modèles à différents polyéthylène glycol, d'après Wikman-Larhed (45)

La perméabilité des modèles à d'autres molécules hydrophiles (M_r : 350-5000 g/mole) a été déterminée par Wikman-Larhed (45). Pour toutes ces molécules, le passage est plus important sur cellules HT29 et sur coculture que sur les cellules Caco-2 (figure 7).

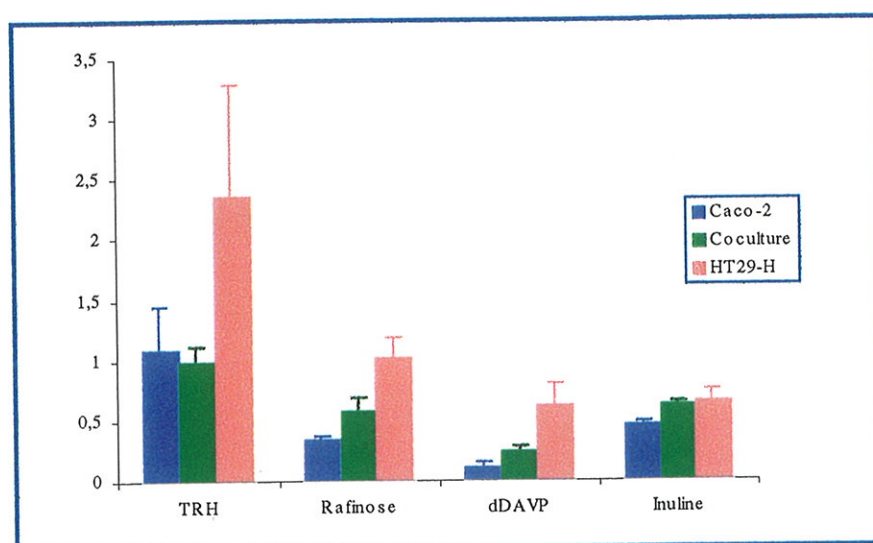


Figure 7 : Perméabilité des cellules Caco-2/TC7, HT29-H et cocultures à des molécules hydrophiles, d'après Wikman-Larhed (45)

Walter a étudié le passage de différentes molécules sur cellules Caco-2, HT29-MTX et sur coculture (43). Ces molécules sont connues pour traverser l'épithélium intestinal selon un processus passif (piroxicam, naproxène, propranolol, ranitidine, cimétidine, furosémide, aténolol), ou selon un processus actif (ampicilline, céphalexine, amoxicilline, L-DOPA, méthylDOPA). Une corrélation a pu être établie entre la perméabilité des molécules diffusant passivement sur coculture et la fraction absorbée chez l'Homme en utilisant la formule suivante (2).

$$F_a = \left(1 - e^{-A \cdot P_{eff} \times 10^{-6}}\right) \times 100 \quad (\%)$$

avec F_a : fraction absorbée chez l'Homme (%),

A : coefficient calculé par régression non linéaire, $A = 1,23 \pm 0,17$,

P_{eff} : perméabilité sur le modèle étudié.

L'auteur en déduit trois catégories de molécules (tableau VII).

Tableau VII : Classification des molécules en fonction de leur perméabilité sur coculture (45).

	Molécules fortement résorbées	Molécules moyennement résorbées	Molécules faiblement résorbées
Pourcentage d'absorption chez l'Homme	> 70%	40-70%	< 40%
P_{eff} (cm/s)	$\geq 10^{-5}$	10^{-7} - 10^{-6}	$< 10^{-7}$

D'après Walter, la perméabilité aux molécules hydrophiles est 5 à 30 fois plus faible sur coculture que sur un modèle de rat perfusé mais les résultats sont plus proches que ceux qui sont obtenus sur cellules Caco-2/TC7 seules. L'intérêt réel du modèle n'est cependant pas montré étant donné que très peu de molécules ont été testées.

CONCLUSION

Les modèles de cellules intestinales humaines sont actuellement largement utilisés en recherche pharmaceutique pour étudier la résorption intestinale des nouvelles molécules. Le modèle le plus couramment utilisé est le modèle Caco-2 qui constitue, en culture, une monocouche de cellules différenciées en entérocytes. La réalisation d'une coculture composée de cellules Caco-2, mais aussi de cellules sécrétant un mucus de nature intestinale telles que les cellules HT29-MTX présente un intérêt potentiel par rapport au modèle classique de cellules Caco-2. Le mucus qui est présent dans ce modèle permet de se rapprocher des conditions physiologiques, il permettrait notamment d'étudier son impact sur la résorption intestinale des molécules lipophiles. Un tel modèle a rarement été décrit dans la littérature du fait de sa difficulté de mise en œuvre et très peu d'études approfondies ont été publiées.

Le but de notre étude a été de mettre au point et valider un modèle de coculture Caco-2/TC-7 HT29-MTX, d'étudier ses caractéristiques structurales et ses capacités à prédire l'absorption intestinale chez l'Homme. Cette étude a également permis de valider le modèle HT29-MTX, en tant qu'outil pour appréhender l'absorption intestinale. Les résultats obtenus sur ces deux nouveaux modèles ont été comparés à ceux qui sont obtenus sur le modèle Caco-2/TC7, afin de savoir s'ils présentent un intérêt potentiel par rapport à ce modèle couramment utilisé.

TRAVAUX PERSONNELS

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Les cellules

Les cellules Caco-2 clone TC7 ont été fournies par le Professeur A. Zweibaum et le Docteur M. Rousset (INSERM U178, Villejuif) au passage 8. Elles ont été utilisées du passage 12 au passage 32.

Les cellules HT29-MTX ont été fournies par le Docteur T. Lesuffleur (INSERM U178, Villejuif) au passage P13/19. Elles sont utilisées du passage P13/19 au passage P26/19. L'absence de mycoplasmes est vérifiée une fois par mois à l'Institut Pasteur.

1.2. Culture cellulaire

Les lignées sont entretenues sur flacons et les cellules sontensemencées sur filtres stériles pour réaliser les études de perméabilité. Toutes les manipulations des cellules se font sous hotte à flux laminaire FASTER BHA 48 et les cultures sont conservées dans un incubateur HERAEUS Instruments à 37°C, dans une atmosphère contenant 10% de CO₂.

1.2.1. Entretien des lignées

L'entretien des lignées Caco-2 et HT29-MTX se fait sur flacons spéciaux en polystyrène ventilés de 25 cm² ou de 75 cm² (COSTAR, filtre en Téflon 0,2 µm), pendant une semaine à la densité de 1,2.10⁴ cellules/cm². Au bout de sept jours nécessaires pour obtenir la confluence, les cellules sont traitées par un mélange Trypsine/EDTA à 0,05% de trypsine et 0,53 mM EDTA.4Na (GIBCOBRL). L'action de la trypsine est neutralisée après 15 à 30 minutes d'action dans l'incubateur par le même volume de milieu de culture. La suspension est centrifugée pendant 7 minutes à 3000 g dans une centrifugeuse SIGMA 3-MK et le culot est remis en suspension dans un volume connu de milieu de culture. Les cellules sont comptées en microscopie optique (OLYMPUS-BH-2) sur cellules de Malassez après dilution au demi dans du bleu Trypan, pour colorer les cellules mortes. Les cellules sontensemencées à nouveau sur flacon pour l'entretien de la lignée et sur filtres.

A partir du troisième jour après l'ensemencement, les cellules sont adhérentes aux supports et le milieu de culture peut être renouvelé tous les jours (15 ml pour les flacons de 75 cm², 5 ml pour les flacons de 25 cm²). La composition du milieu de culture utilisé pour les cellules cultivées sur flacons est indiquée dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Composition des milieux de culture sur flacon

	Caco-2	HT29-MTX	Références
Dulbecco's Modified Eagle's Medium^(a) (DMEM)	DMEM à 4,5 g/l de glucose	DMEM à 4,5 g/l de glucose	GIBCOBRL
Sérum de veau fœtal décomplémenté^(b)	20%	10%	BOEHRINGER MANNHEIM
Acides aminés non essentiels 100X	1%	0%	GIBCOBRL

(a) Milieu de Dubelcco modifié par Eagle

(b) Sérum décomplémenté à 54°C pendant 30 minutes.

Les milieux sont filtrés sur filtres à 0,22 µm (NALGENE) et sont conservés à +4°C.

1.2.2. Culture sur filtres

Les cellules sont cultivées sur filtres de polycarbonate (COSTAR Transwell® PC 12 puits 0,4µm) pendant 21 jours. L'ensemencement se fait à la densité de 5.10^5 cellules/filtre pour les cellules Caco-2 et HT29-MTX. La coculture, qui est uniquement cultivée sur filtres, est ensemencée avec $2,5.10^5$ cellules Caco-2/filtre et $2,5.10^5$ cellules HT29-MTX/filtre (50%-50%). Trois jours après l'ensemencement, les cellules sont adhérentes et le milieu de culture peut être changé tous les jours en utilisant 1,5 mL pour le compartiment basolatéral et 0,5 mL pour le compartiment apical. La composition des milieux pour filtres est indiquée dans le tableau IX.

Tableau IX : Composition des milieux de culture sur filtres

Caco-2 et Coculture	HT29-MTX	Référence
Milieu Caco-2 pour flask	Milieu HT29-MTX pour flask	
+ Pénicilline (5000 UI/ml)	+ Pénicilline (5000 UI/ml)	GIBCOBRL
+ Streptomycine (5000 µg/ml)	+ Streptomycine (5000 µg/ml)	

Les milieux sont filtrés sur filtres stériles 0,22 µm (NALGENE).

1.3. Microscopie électronique

Les cellules Caco-2, HT29-MTX et la coculture ont été analysées en microscopie électronique à balayage (MEB) et à transmission (MET) à différents âges pour observer les évolutions de structure. Après avoir rincé les cellules dans du tampon phosphate (PBS :

Phosphate Buffer Salt, GIBCOBRL), l'épithélium est totalement recouvert d'une solution à 10% de glutaraldéhyde dilué dans du PBS afin de stabiliser les structures cellulaires. La suite des préparations a été effectuée dans le service d'histologie (D. Lecaque, L. Lepescheux, RMV/HMR).

1.4. Microscopie optique

Les cellules HT29-MTX ont été étudiées en microscopie optique pour suivre l'évolution de la quantité de mucus produite en fonction du temps de culture (9, 16, 23, 30 jours de culture). Après coupe paraffine de l'épithélium cultivé sur filtres, les cellules subissent une coloration à l'APS (acide periodique Schiff), qui colore spécifiquement en rose les mucopolysaccharides extra- et intracellulaires constituant le mucus. Les images ont été étudiées dans le service d'histologie (HMR/RMV).

1.5. Courbe de croissance

La croissance des cellules Caco-2, HT29-MTX et la coculture a été suivie sur flacons de 25 cm², deux fois par semaine pendant 21 jours (3, 7, 10, 15, 17, 21 jours).

1.6. Mesure de la résistance transépithéliale

L'évolution de la résistance transépithéliale au cours du temps de culture est déterminée avec des cellulesensemencées sur filtres Transwell®, deux fois par semaine pendant 21 jours.

La mesure se fait à l'aide un voltohmmètre (EVOM, World Precision Instruments) équipé d'un couple d'électrodes de mesure concentriques (ENDOHM, WPI) (figure 8). Chaque filtre est placé entre les deux électrodes du système baignant dans le milieu de culture, puis la résistance est déterminée.

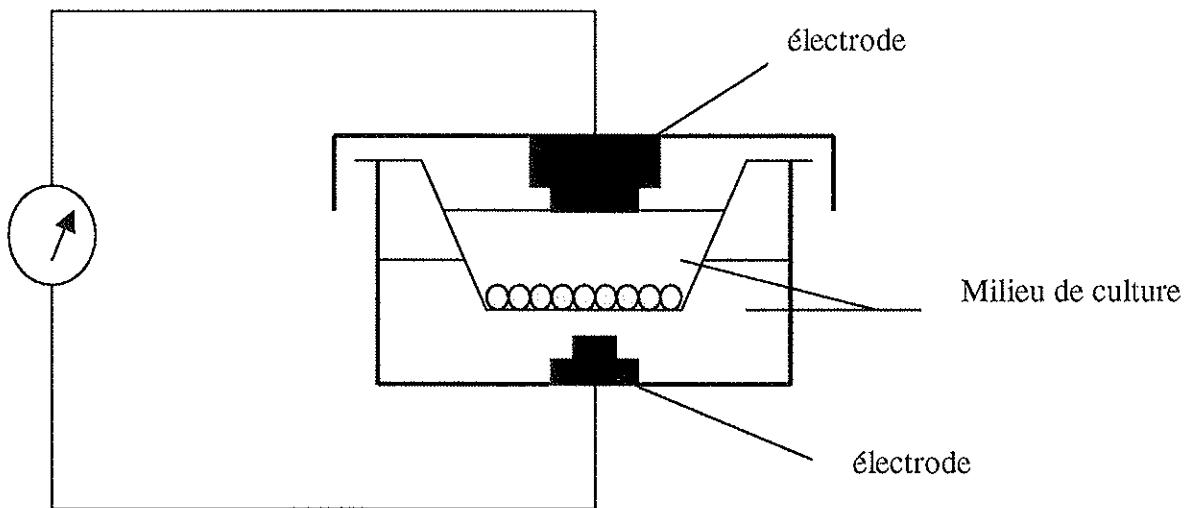


Figure 8 : Schéma simplifié du principe du voltohmmètre.

1.7. Etudes de perméabilités

1.7.1. Molécules

Les études de perméabilité ont été réalisées sur 19 molécules de référence choisies sur le critère de connaissance de la fraction absorbée chez l'Homme, et de leur mécanisme de passage à travers l'épithélium intestinal. Les molécules absorbées selon un mécanisme passif sont : l'acide salicylique, la caféine, la dexaméthasone, la naloxone, la phénytoïne, la progestérone, la testostérone, la clonidine, le chloramphénicol, l'hydrocortisone, le sumatriptan, la benzylpénicilline, le mannitol, les PEG 900 et 4000, le ganciclovir et l'inuline (1, 5, 26, 43, 48). Deux molécules, connues pour subir une sécrétion sur cellules Caco-2 ont été étudiées : la phénylalanine et la cimétidine. Leurs caractéristiques physico-chimiques (charge, logP) et leurs utilisations thérapeutiques sont indiquées en annexe I. Les références des molécules radioinertes et radiomarquées sont notées en annexe II.

1.7.2. Cinétiques de passage

Les cinétiques de passage des molécules de référence sont réalisées avec des cellules développées sur filtres et utilisent six filtres pour chaque molécule. Pour toutes les molécules, les cinétiques se font dans le sens de l'absorption (du milieu apical vers le milieu basolatéral). Pour celles qui subissent un efflux, des cinétiques dans le sens de la sécrétion (du milieu basolatéral vers le milieu apical) sont également réalisées.

- Préparation des solutions de travail :

Les solutions de travail sont préparées extemporanément avec du milieu de culture de manière différente selon que l'on dispose ou non de la molécule radioinerte et selon la nature du radioélément (tableau X).

Tableau X : Préparation des solutions de travail

Molécule radioinerte	Concentration	Radioélément	Activité volumique dans la solution de travail	Mannitol ¹⁴ C
oui	10 ⁻⁵ M	³ H	2 µCi/ml	0,2 µCi/ml
oui ⁽¹⁾	10 ⁻⁵ M	¹⁴ C	0,2 µCi/ml	0 µCi/ml
oui ⁽²⁾	10 ⁻⁵ M	¹⁴ C	0 µCi/ml	0,2 µCi/ml
non	Traceuse	³ H	2 µCi/ml	0,2 µCi/ml

⁽¹⁾ 3 filtres de travail avec, en parallèle, 3 filtres préparés selon ⁽²⁾.

- Contrôle de l'intégrité de la monocouche cellulaire

Avant de débiter la cinétique de passage, la résistance transépithéliale des cellules est mesurée à l'aide d'un voltohmmètre. Les cellules Caco-2, HT29-MTX et les coculture sont rejetées lorsque leur résistance transépithéliale est inférieure respectivement à 180 Ω.cm², 600 Ω.cm² et 450 Ω.cm². A la fin de la manipulation, la même mesure est effectuée pour vérifier l'intégrité de la monocouche cellulaire. Si la variation de TEER est supérieure à 30% entre le début et la fin de la cinétique, une toxicité de la molécule est évoquée.

- Déroulement de la cinétique :

Durant toute la cinétique, les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère contenant 10% de CO₂.

➤ Cinétiques d'absorption : la cinétique est réalisée en déposant 0,5mL de la solution de travail dans le compartiment apical, le compartiment basolatéral contenant

1,5mL de milieu de culture. Les études de transports sont faites durant 2 heures. Au T_0 , 100 μ l de solution de travail est prélevé deux fois comme standard. Toutes les 30 minutes, 600 μ L de solution sont prélevés dans le compartiment basolatéral. En fin de cinétique, 250 μ L du milieu apical sont prélevés afin de déterminer le taux de recouvrement.

➤ Cinétiques de sécrétion : la cinétique est réalisée en déposant 1,5mL de la solution de travail dans le compartiment basolatéral, le compartiment apical contenant 0,5mL de milieu de culture. Dans ce cas également, l'étude est menée sur deux heures et les standards sont préparés à T_0 . Toutes les 30 minutes, 200 μ L de solution sont prélevés dans le compartiment apical. En fin de cinétique, 600 μ L du milieu basolatéral sont prélevés afin de déterminer le taux de recouvrement.

➤ Dosage des échantillons :

Après prélèvement, les échantillons sont complétés avec 10 ml de liquide scintillant (ACS : Aqueous Counting Scintillant. AMERSHAM). La radioactivité est dosée à l'aide d'un compteur de radioactivité LKB 1214 RACKBETA. Le quenching est corrigé par la méthode de standardisation externe.

➤ Calcul des résultats :

❖ Calcul de la perméabilité apparente (P_{app})

La perméabilité apparente (P_{app}) de la monocouche cellulaire à la molécule et au mannitol est calculée en utilisant la formule suivante :

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \times \frac{1}{AC_0} (\text{cm} / \text{s})$$

où dQ/dt correspond au flux de molécule qui traverse la membrane à l'état stationnaire de non équilibre, A est l'aire du filtre ($1,13\text{cm}^2$), et C_0 la concentration initiale dans le compartiment donneur au temps initial.

❖ Calcul du taux de recouvrement

Le taux de recouvrement est déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de recouvrement} = \frac{\text{Quantité totale de molécule au temps final}}{\text{Quantité de molécule introduite au temps initial}} \times 100$$

Il permet de savoir si la molécule a subi un phénomène d'adsorption aux parois des puits ou si elle est retenue dans le compartiment intracellulaire.

1.8. Influence du mucus sur la TEER et la perméabilité apparente des cellules HT29-MTX et de la coculture

L'influence du mucus est déterminée en étudiant en parallèle l'évolution de la résistance transépithéliale sans et avec lavage de la couche de mucus, en utilisant comme témoin négatif les cellules Caco-2 qui subiront le même traitement. Le lavage consiste à agiter les cellules à 135 rpm pendant 10 minutes avec 2mL de solution saline de Hank fraîche côté basolatéral et 0,5mL côté apical (HBSS : Hank's Balanced Salt, GIBCOBRL) sur agitateur horizontal Thermolyne. Cette opération est effectuée deux fois (25).

La cinétique d'évolution de la résistance transépithéliale après lavage est étudiée sur cellules HT29-MTX et des cocultures pendant 21 jours. Les cinétiques de passage du mannitol et de la testostérone sont également réalisées avec et sans mucus sur cellules HT29-MTX, en utilisant comme témoins négatifs les cellules Caco-2.

1.9. Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées dans le laboratoire d'analyse statistique (T. Bodin. HMR/RMV).

Le test de Student a été utilisé pour analyser l'influence du mucus sur la TEER et sur les perméabilités.

Les corrélations perméabilité apparente-fraction absorbée ($\log P_{app}$ -fraction absorbée) chez l'Homme ont été établies en utilisant l'équation suivante (6) :

$$\text{Fraction absorbée} = \frac{0 - 100}{1 + \left(\frac{\log P_{app}}{A} \right)^B} + 100$$

La courbe est tracée par régression non linéaire. A correspond à $\log P_{app}$ pour une fraction absorbée de 50%, B est un facteur dépendant de la pente. Les paramètres A et B ont été déterminés grâce au logiciel de statistiques SAS.

Un test ANOVA a été réalisé pour analyser la différence éventuelle entre les modèles cellulaires étudiés.

1. RESULTATS

2.1. Morphologie et caractéristiques fonctionnelles

2.1.1. Aspect morphologique

2.1.1.1. Cellules Caco-2/TC7 (figures 9 et 10)

La microscopie électronique à balayage révèle que, après un développement pendant 21 jours, les cellules Caco-2/TC7 ont l'aspect d'entérocytes sains. Leurs dimensions correspondent aux données de la littérature (tableau XI). Les cellules Caco-2/TC7 sont polarisées avec une bordure en brosse au pôle apical.

Tableau XI : Dimensions des cellules Caco-2/TC7 (21 jours de culture)

	Diamètre de la cellule (μm)	Hauteur de la cellule (μm) (pôle apical au pôle basolatéral)	Hauteur des microvillosités (μm)
Cellules Caco-2 (HMR-RMV)	$13,30 \pm 0,30$	$17,90 \pm 0,09$	$1,11 \pm 0,23$
Données de la littérature (10)	ND	$17,70 \pm 0,6$	$1,60 \pm 0,20$

L'image en microscopie électronique à transmission (figure 10) montre un complexe jonctionnel reliant deux cellules entre elles, ce complexe est constitué par la succession d'une jonction serrée et de desmosomes. Les filaments maintenant les microvillosités sont visibles. La bordure en brosse est composée de microvillosités serrées

augmentant considérablement la surface apicale et les organites intracellulaires (mitochondries) ont une répartition polarisée (figure 10).

Cellules Caco-2 (30 jours de culture)

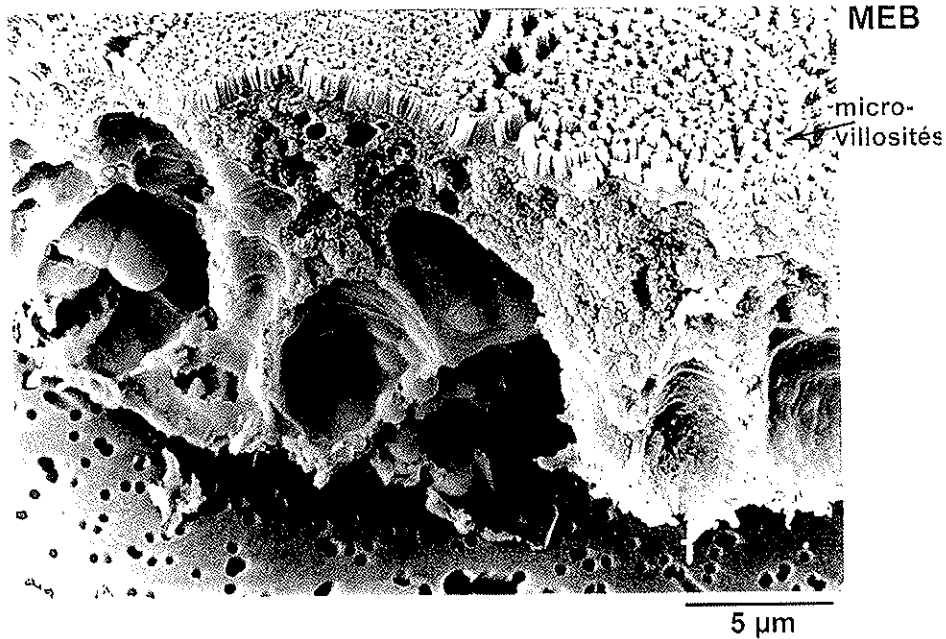


Figure 9 : Cellules Caco-2/TC7 cultivées pendant 21 jours sur filtres de polycarbonate. Image en microscopie électronique à balayage.

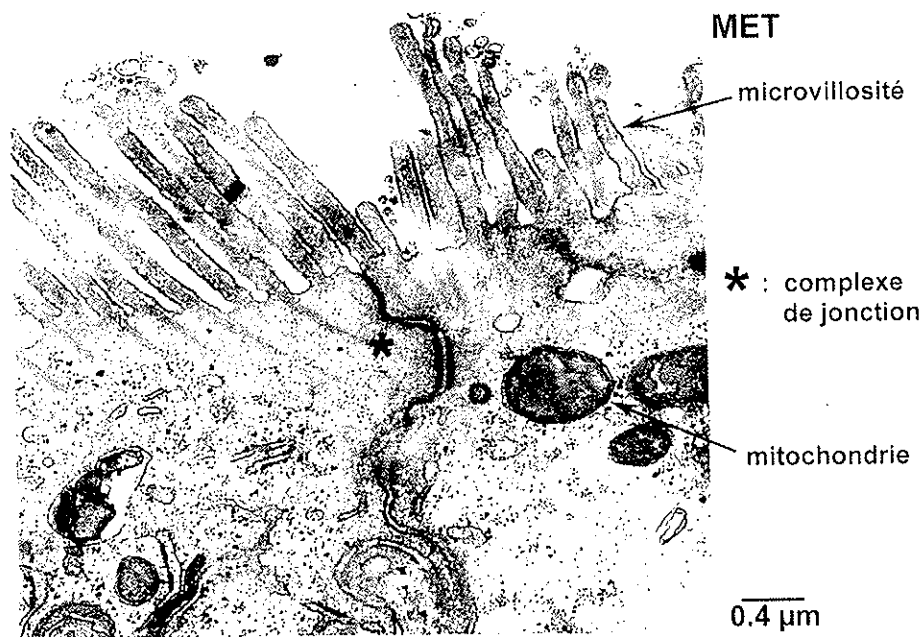


Figure 10 : Image de cellules Caco-2/TC7 en microscopie électronique à transmission. Les cellules sont reliées entre elles par un système jonctionnel.

2.1.1.2. Cellules HT29-MTX

La figure 11 présente une cellule HT29-MTX observée sur toute sa hauteur, en microscopie électronique à balayage. Les microvillosités apicales sont plus éparpillées et plus petites (de l'ordre $0,6 \mu\text{m}$) que celles des cellules Caco-2/TC7 et elles ne sont pas organisées pas en bordure en brosse. Les cellules ont une taille très proche de celle des cellules Caco-2/TC7 : à 25 jours de culture, leur hauteur est de $17,20 \pm 0,20 \mu\text{m}$ et leur diamètre apical est de $10 \mu\text{m}$. La sécrétion de mucus est visible au pôle apical après 11 jours de culture et elle s'intensifie jusqu'à 21 jours de culture. La présence de nombreuses vésicules de sécrétion au niveau de la membrane basolatérale de la cellule est le témoin d'une intense activité métabolique.

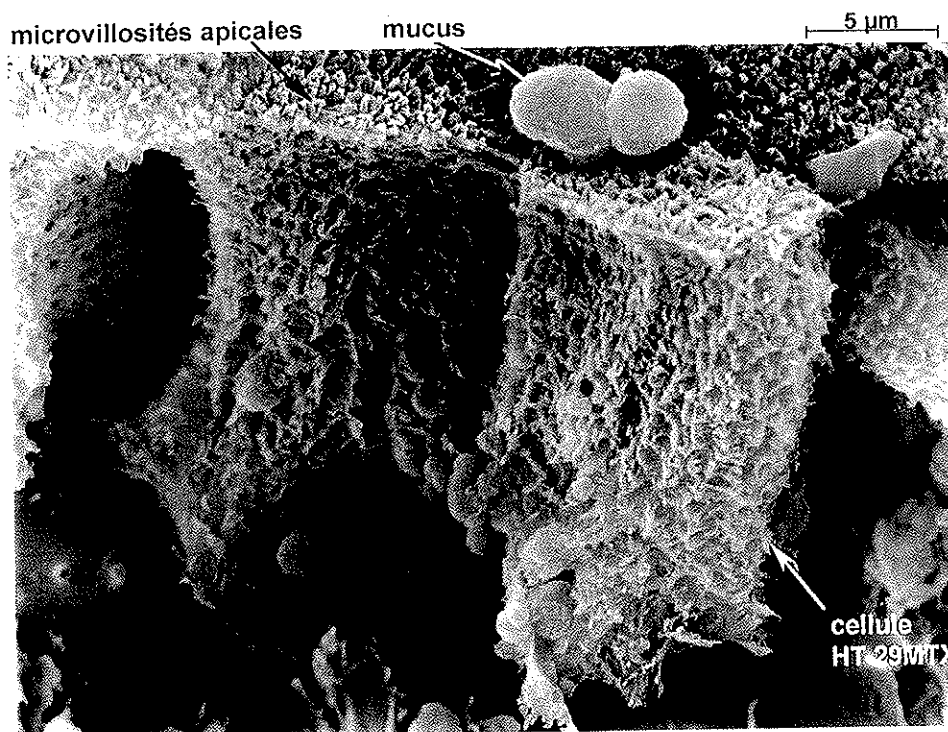


Figure 11 : Cellules HT29-MTX observées en microscopie électronique à balayage après 21 jours de culture. La surface apicale est développée en microvillosités et la sécrétion de mucus est visible.

L'évolution de la sécrétion de mucus au cours du temps observée en microscopie électronique est confirmée par la technique de microscopie optique après coloration à l'APS (figure 12). Les images montrent une évolution de la sécrétion à partir de 9 jours de culture, où la sécrétion est faible, jusqu'à 18 jours où elle devient maximale et constante. Par ailleurs, les images ont révélé une coloration intracellulaire, au-dessus du noyau et au pôle apical des cellules, témoignant d'une synthèse du mucus autour du noyau et d'un trafic intracellulaire polarisé.

2.1.1.3. Coculture

La figure 13A représente la coculture observée en microscopie électronique à balayage. Les cellules HT29-MTX sécrétant le mucus sont isolées au sein des cellules Caco-2/TC7 à bordure en brosse développée. Le plus souvent, les images de la coculture montrent des plages de cellules Caco-2/TC7 et des plages de cellules HT29-MTX (figure 13B).

Culture HT 29 MTX
Inclusion paraffine et réaction à l'APS
Coloration des mucopolysaccharides

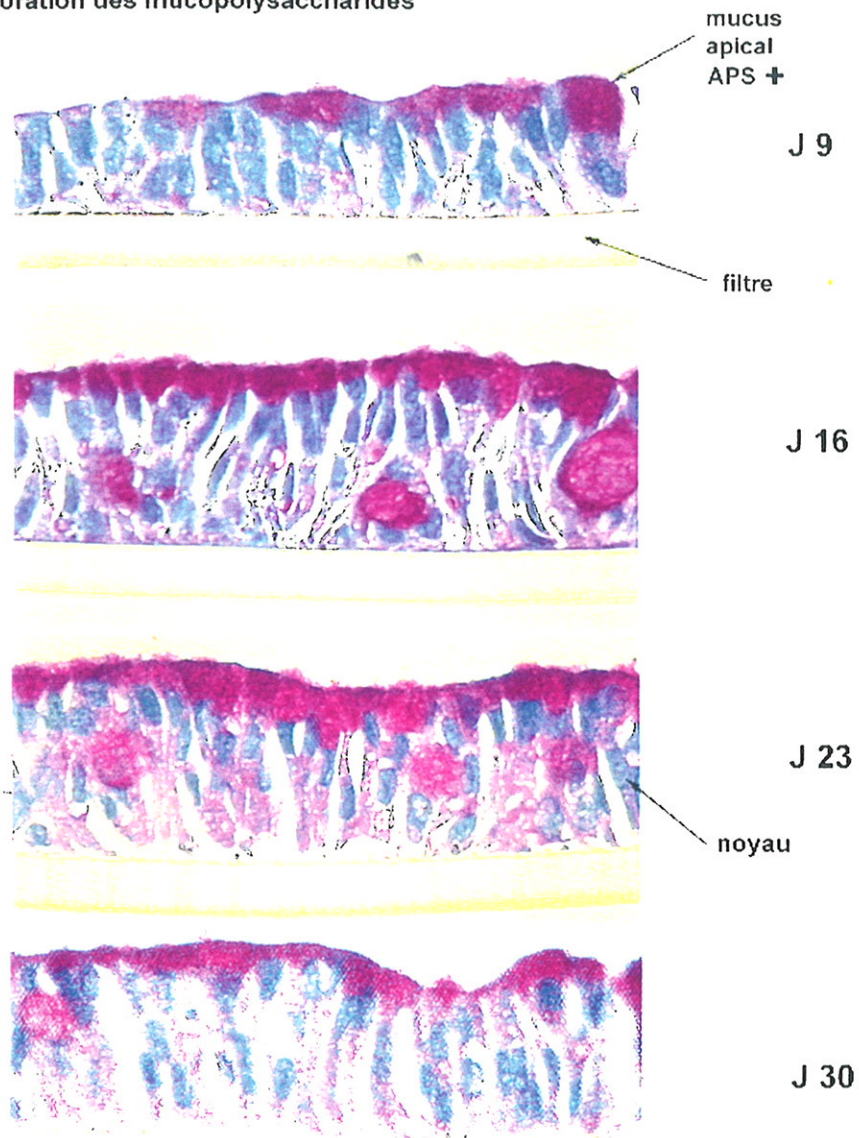


Figure 12 : Observation des cellules HT29-MTX en fonction de leur âge après coloration des mucopolysaccharides par réaction à l'APS

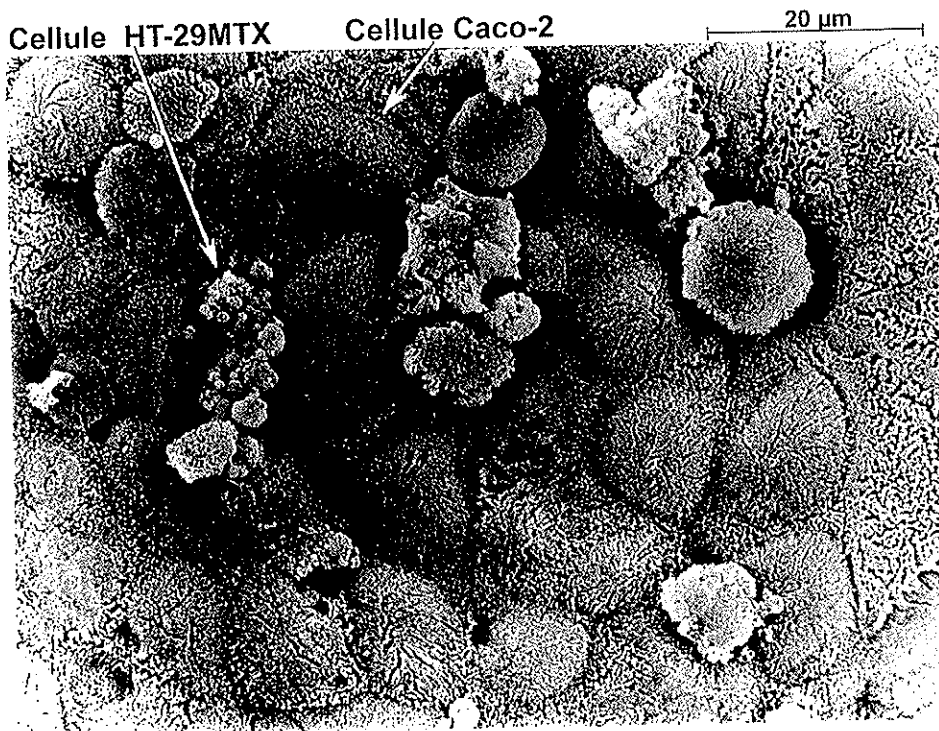


Figure 13A : Coculture observée en microscopie électronique à balayage, après 21 jours de culture.

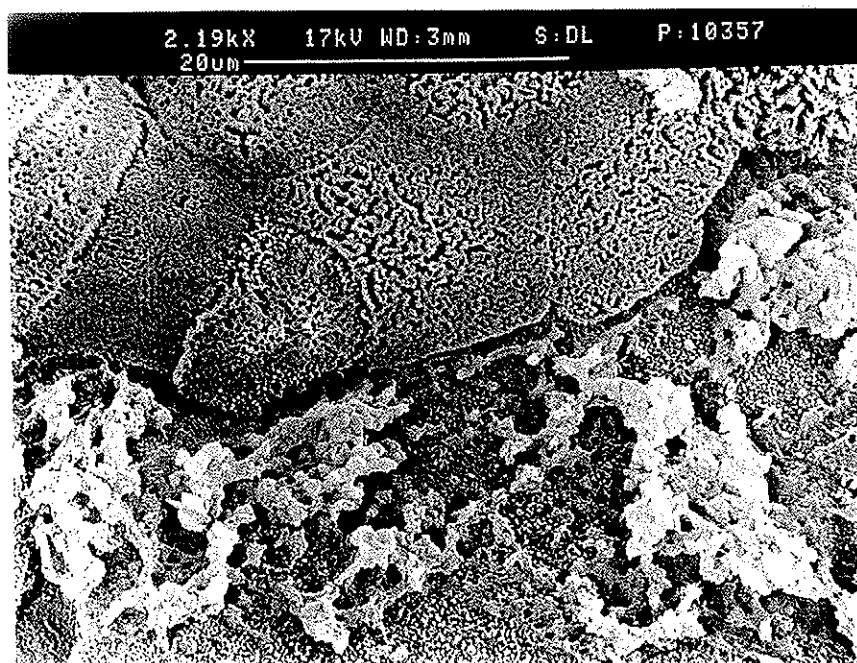


Figure 13B : Coculture observée en microscopie électronique à balayage, après 21 jours de culture

2.1.2. Croissance cellulaire

La figure 14 présente l'évolution du nombre des cellules de chaque modèle en fonction du temps de culture. Le graphique permet de souligner trois paramètres décrivant la croissance cellulaire des trois modèles : la vitesse de croissance, la période nécessaire à l'obtention d'une couche de cellules confluentes et la densité cellulaire moyenne dans la période post-confluente.

Les cellules Caco-2/TC7 présentent la vitesse de croissance la plus élevée, mais la croissance exponentielle est plus tardive que pour les autres modèles. La confluence est atteinte respectivement à 8, 9 et 11 jours de culture pour les cellules Caco-2/TC7, HT29-MTX et coculture. Enfin, la densité à maturité semble comparable pour les modèles HT29-MTX et coculture (de l'ordre de 6.10^6 cellules/ml), tandis qu'elle est plus faible, de l'ordre de 2.10^6 cellules/ml, pour les cellules Caco-2/TC7.

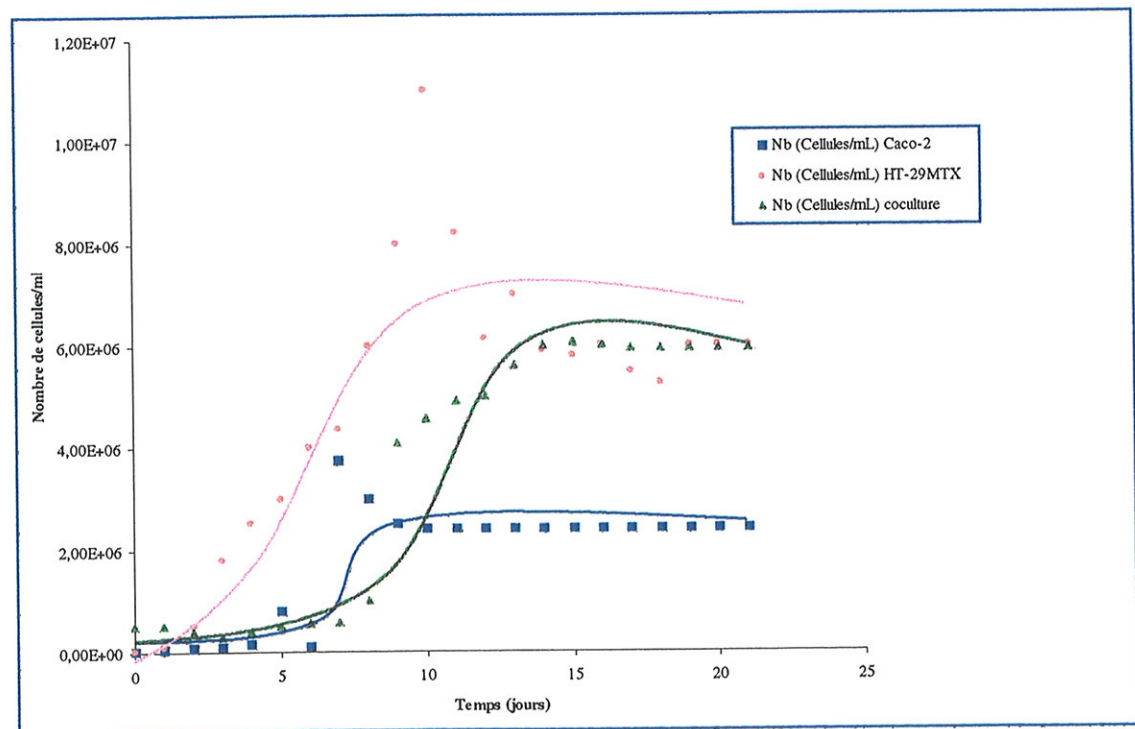


Figure 14 : Croissance des cellules des trois modèles en fonction du temps de culture

2.1.3. Evolution de la résistance transépithéliale en fonction du temps

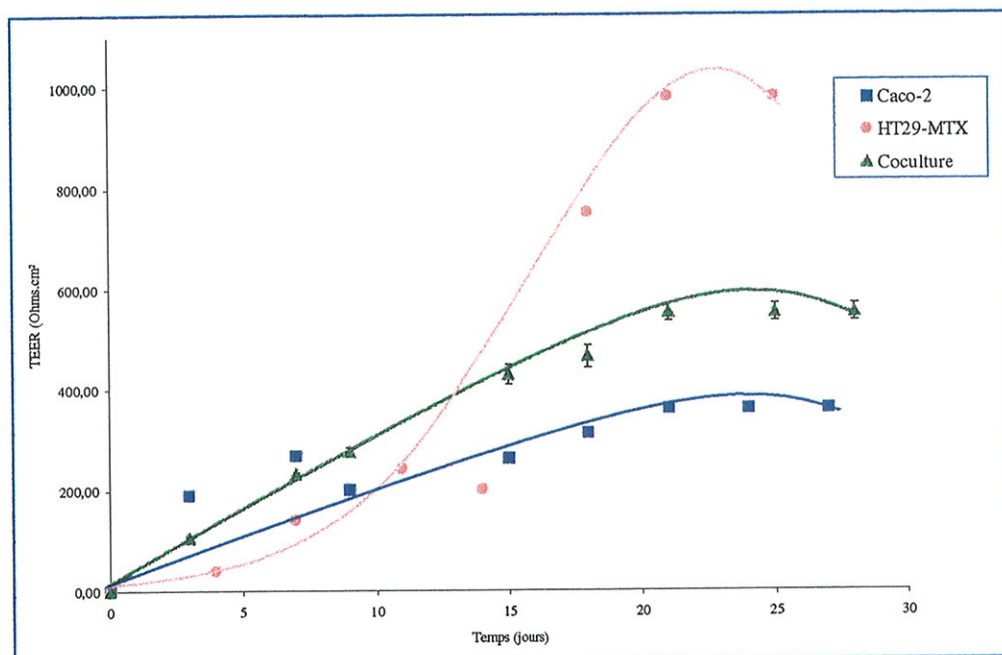


Figure 15 : Evolution de la résistance transépithéliale (TEER) des trois modèles cultivés sur filtres de polycarbonate (n=12)

Pour les trois modèles, la TEER croît progressivement en fonction du temps pour se stabiliser vers le 20^{ème} jour de culture (figure 15), ce qui confirme la nécessité d'attendre 21 jours de culture pour les utiliser pour les études de perméabilité.

A maturité, la TEER des cellules HT29-MTX est très élevée en comparaison à celle des cellules Caco-2/TC7 et la résistance transépithéliale de la coculture est intermédiaire entre celle des cellules Caco-2/TC7 et celle des cellules HT29-MTX (tableau XII).

Tableau XII : Valeurs moyennes des TEER des trois modèles à maturité (n = 12)

	Caco-2/TC7	HT29-MTX	Coculture
TEER ($\Omega.cm^2$) \pm esm	360,67 \pm 6,66	980,30 \pm 0,35	552,58 \pm 17,45

2.1.4. Effet du mucus sur la résistance transépithéliale des cellules HT29-MTX et de la coculture

L'étude de l'évolution de la TEER des cellules HT29-MTX et de la coculture après lavage du mucus (figure 16) montre que le mucus a un effet significatif sur la TEER à partir du 18^{ème} jour de culture, date à laquelle la sécrétion de mucus est maximale. Cet effet est très significatif pour les cellules HT29-MTX ($p < 0,01$) avec une diminution de la TEER de 46% après retrait du mucus, à 22 jours de culture (figure 16A).

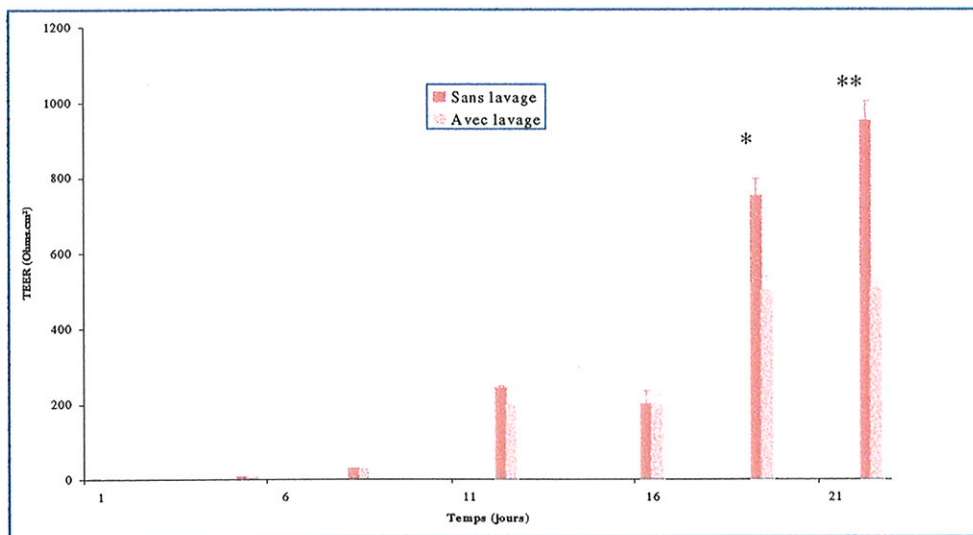


Fig. 16A : Evolution de la TEER des cellules HT29-MTX. L'effet du mucus est hautement significatif à partir de 18 jours de culture (n = 12)

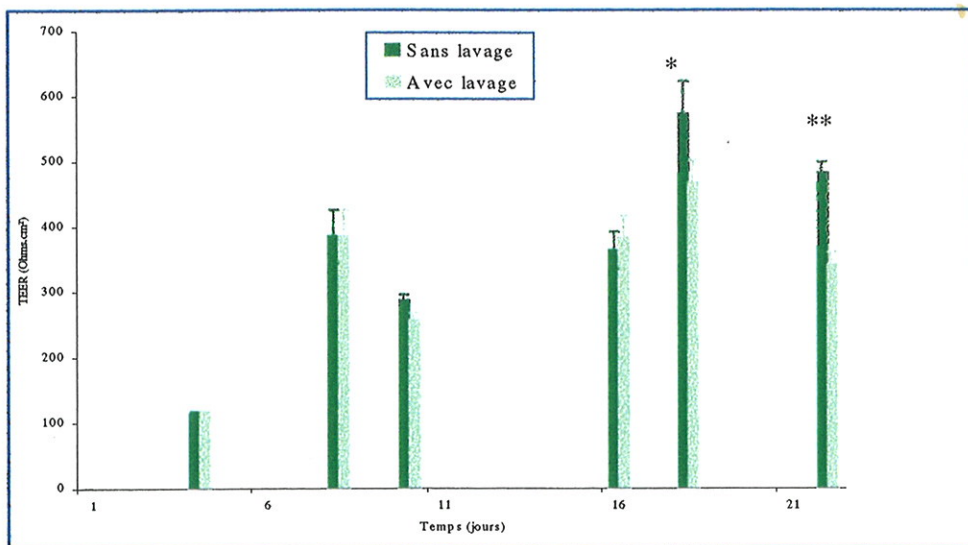


Fig. 16B : Influence du lavage au HBSS sur la coculture (n = 12)

Pour la coculture, où la sécrétion est théoriquement moins dense que sur les cellules HT29-MTX seules, l'élimination du mucus par le lavage est seulement significative à 18 jours ($p < 0,05$). L'effet du mucus devient hautement significatif à 22 jours de culture, avec une diminution de la TEER de 29% après lavage ($p < 0,01$).

Par ailleurs, dans les phases de la croissance cellulaire et les premières phases de différenciation, où la sécrétion de mucus est faible, le lavage n'affecte en rien la TEER mesurée.

2.2. Etude des perméabilités apparentes sur les trois modèles

Dans ce chapitre, sont présentés successivement les perméabilités apparentes de 18 molécules diffusant passivement sur les trois modèles étudiés, puis les résultats obtenus avec des molécules prises en charge par des transporteurs protéiques, afin de comparer les trois modèles et, enfin, le rôle du mucus sur la perméabilité de molécules de référence lipophiles (testostérone) et hydrophiles (mannitol) sur le modèle HT29-MTX.

2.2.1. Passage passif

Les résultats de perméabilité obtenus sur les 18 molécules de référence étudiées sur les trois modèles sont présentés, avec leur masse molaire, leur ClogP et leur fraction absorbée chez l'Homme dans le tableau XIII. Les perméabilités à une molécule donnée sont généralement très proches, sur les trois modèles. Deux molécules donnent cependant des résultats très différents selon le modèle considéré. Il s'agit du propranolol, dont

la perméabilité est 1,7 fois et 2,1 fois plus importante sur cellules Caco-2/TC7 que sur cellules HT29-MTX et sur coculture respectivement. Dans le cas du sumatriptan, la perméabilité apparente est 2,1 fois plus faible sur modèle Caco-2/TC7 que sur les deux autres modèles.

Tableau XIII : Perméabilités apparentes déterminées sur les trois modèles, caractéristiques physico-chimiques et fraction absorbée chez l'Homme pour les molécules diffusant passivement (n = 6)

Molécule	PM (g/mol)	LogP ⁽¹⁾	Perméabilité apparente Papp (x10 ⁻⁶ cm/s)			Abs. % ⁽²⁾
			Caco-2/TC7	HT-29MTX	Coculture	
Acide salicylique	138,12	0,3	3,55+/-0,16	2,61+/-0,14	1,91+/-0,36	100
Caféine	149,20	-0,2	24,70+/-0,53	30,50+/-0,85	19,50+/-0,81	100
Dexaméthasone	392,50	-0,3	6,85+/-0,16	3,14+/-0,77	3,04+/-0,57	100
Naloxone	363,80	1,2	14,10+/-0,73	10,30+/-0,15	13,10+/-0,40	100
Phénytoïne	252,25	2,3	12,80+/-0,92	15,10+/-0,7	9,96+/-0,26	100
Progestérone	314,47	3,1	9,47+/-0,51	9,30+/-0,11	6,10+/-0,21	100
Testostérone	288,40	2,6	16,50+/-1,98	11,33+/-0,49	16,90+/-0,40	100
Clonidine	266,60	2,2	15,60+/-0,43	13,40+/-0,41	17,20+/-1,00	95
Chloramphénicol	323,10	-0,4	3,80+/-0,14	3,86+/-0,1	5,54+/-0,09	90
Propranolol	295,80	3,0	12,50+/-0,41	7,28+/-0,2	5,93+/-0,17	90
Hydrocortisone	362,47	-0,4	7,70+/-0,39	5,87+/-0,25	6,45+/-0,38	89
Sumatriptan	225,00	ND	0,97+/-0,06	2,07+/-0,04	2,02+/-0,09	55
Benzylpénicilline	333,40	ND	0,40+/-0,08	0,51+/-0,01	0,54+/-0,03	30
Mannitol	182,00	-3,6	0,46+/-0,02	0,64+/-0,07	0,55+/-0,02	16
PEG 900	900,00	ND	0,92+/-0,03	0,73+/-0,4	0,89+/-0,04	10
Ganciclovir	255,00	-3,0	0,61+/-0,02	0,70+/-0,02	1,05+/-0,04	8
Inuline	5000,00	ND	0,49+/-0,03	ND	ND	0
Méthoxy-inuline	5031,00	ND	2,77+/-0,57	3,76+/-0,97	3,95+/-0,88	ND
PEG 4000	4000,00	ND	0,40+/-0,04	ND	0,36+/-0,02	0

(1) Log P déterminé par la méthode CLIP (ClogP)

(2) Fraction absorbée chez l'Homme (1, 5, 26, 43, 48)

L'inuline a été étudiée sur cellules Caco-2/TC7 et la méthoxy-inuline sur les trois modèles, pour mettre en évidence l'influence de la structure moléculaire sur la perméabilité (figure 17 : structures moléculaires de l'inuline et de la méthoxy-inuline).

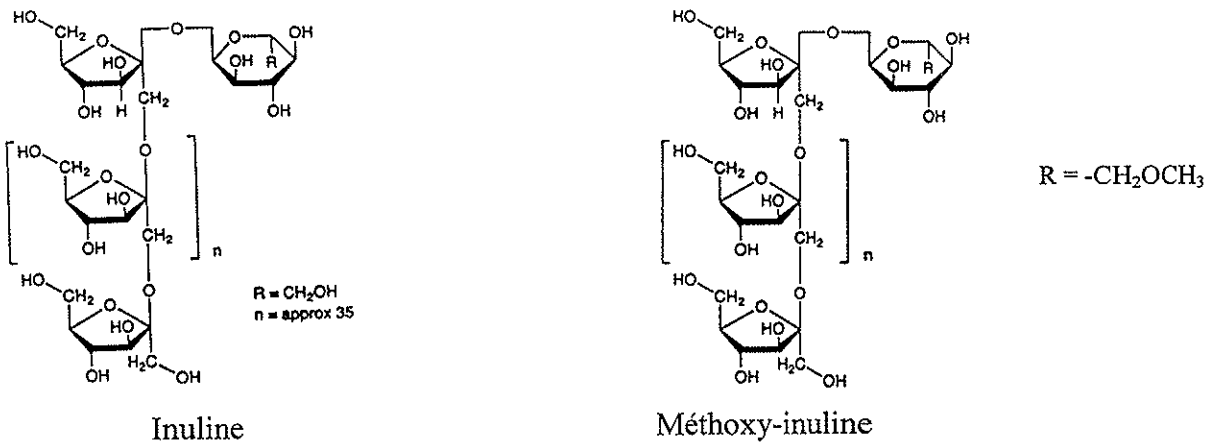


Figure 17 : Structure moléculaire de l'inuline et de la méthoxy-inuline

La perméabilité apparente de l'inuline sur cellules Caco-2/TC7 est 5,6 fois plus faible que celle de la méthoxy-inuline, plus lipophile. La méthoxy-inuline, quant à elle, a une perméabilité comparable sur les trois modèles.

2.2.2. Etudes de sécrétion

L'étude a porté sur deux molécules ayant montré des résultats suggérant l'implication d'un transporteur (26), la phénylalanine et la cimétidine (tableau XIV).

Dans le cas de la phénylalanine, aucun effet du sens de passage n'a pu être mis en évidence, alors que la molécule est connue pour être prise en charge par transporteur des dipeptides.

Pour la cimétidine étudiée sur lignée Caco-2/TC7, l'effet du sens de passage est hautement significatif. A dose traceuse et à concentration de 10^{-4} M, le passage dans le sens de l'absorption est de l'ordre de 7 fois plus faible que le passage dans le sens de l'efflux (figure 18).

Tableau XIV : Perméabilités apparentes à la cimétidine et à la phénylalanine dans le sens de l'absorption (AB : apical vers basolatéral) et dans le sens de la sécrétion (BA : basolatéral vers apical). n = 6

Molécule	[c] (M)	Papp (10 ⁻⁶ cm/s)					
		Caco-2/TC7		HT29-MTX		Coculture	
		AB	BA	AB	BA	AB	BA
Phénylalanine	Traceur	2,68±/0,14	3,46±/0,08	2,08±/0,01	1,96±/0,001	2,31±/0,01	2,65±/0,01
Cimétidine	Traceur	0,39±/0,01	3,00±/0,65	0,86±/0,27	0,74±/0,06	0,40±/0,01	1,41±/0,11
Cimétidine	10 ⁻⁴	0,34±/0,08	2,40±/0,20	0,38±/0,02	0,57±/0,04	0,39±/0,01	1,38±/0,10

L'étude de la cimétidine sur le modèle HT29-MTX ne montre pas de perméabilité différentielle entre le passage dans le sens de l'absorption et de la sécrétion (figure 19). Par ailleurs, la perméabilité à la cimétidine étudiée à concentration traceuse dans le sens de l'absorption est 2,2 fois plus importante sur le modèle HT29-MTX, qui n'exprime pas les systèmes d'efflux, que sur modèle Caco-2/TC7.

Les résultats obtenus sur coculture sont intermédiaires entre ceux du modèle Caco-2/TC7 et ceux du modèle HT29-MTX. La perméabilité mesurée, à concentration traceuse et à 10⁻⁴M, est 3,5 fois plus importante dans le sens de l'efflux que celle qui est obtenue dans le sens de l'absorption, montrant un transport à efflux moins important qu'avec les cellules Caco-2/TC7 cultivées seules, mais significatif contrairement aux résultats obtenus sur cellules HT29-MTX.

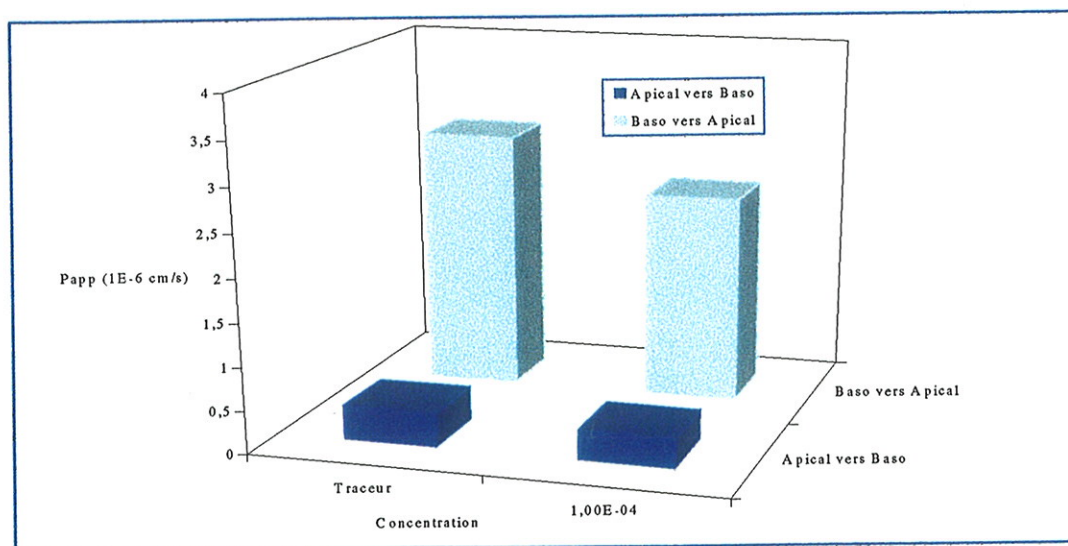


Figure 18 : Effet du sens de passage et de la concentration en cimétidine sur la perméabilité apparente sur modèle Caco-2/TC7

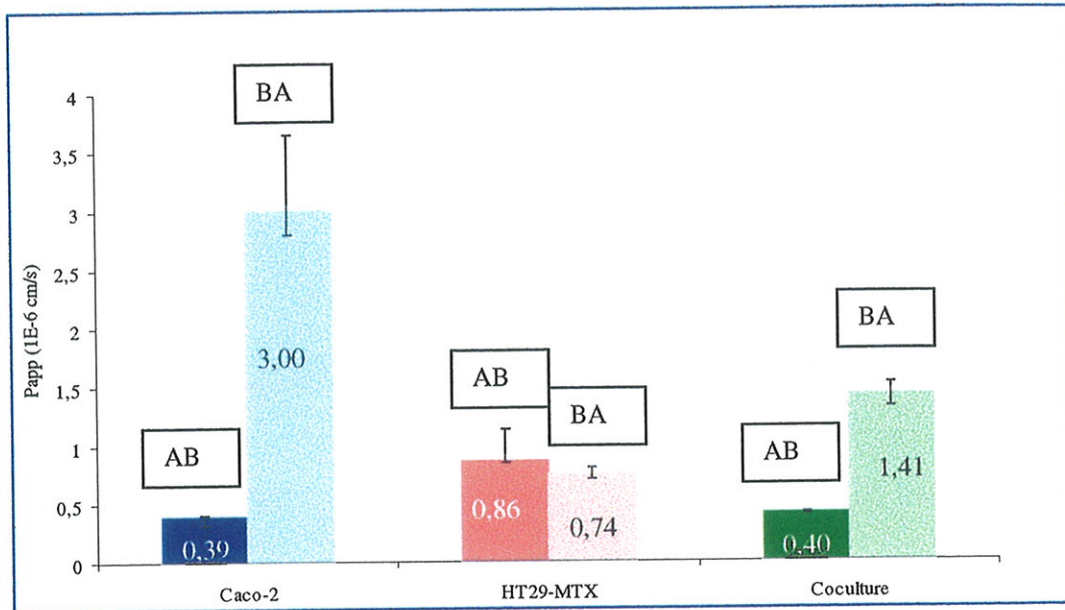


Figure 19 : Effet du sens de passage sur la perméabilité des trois modèles à la cimétidine (concentration traceuse)

2.2.3. Effet du mucus sur la perméabilité des cellules HT29-MTX

L'effet du mucus sur les perméabilités apparentes à des molécules hydrophiles (mannitol) et lipophiles (testostérone) est étudié sur cellules HT29-MTX, en utilisant les cellules Caco-2/TC7 comme témoins négatifs. Les résultats des cinétiques de passage sont illustrés dans la figure 20.

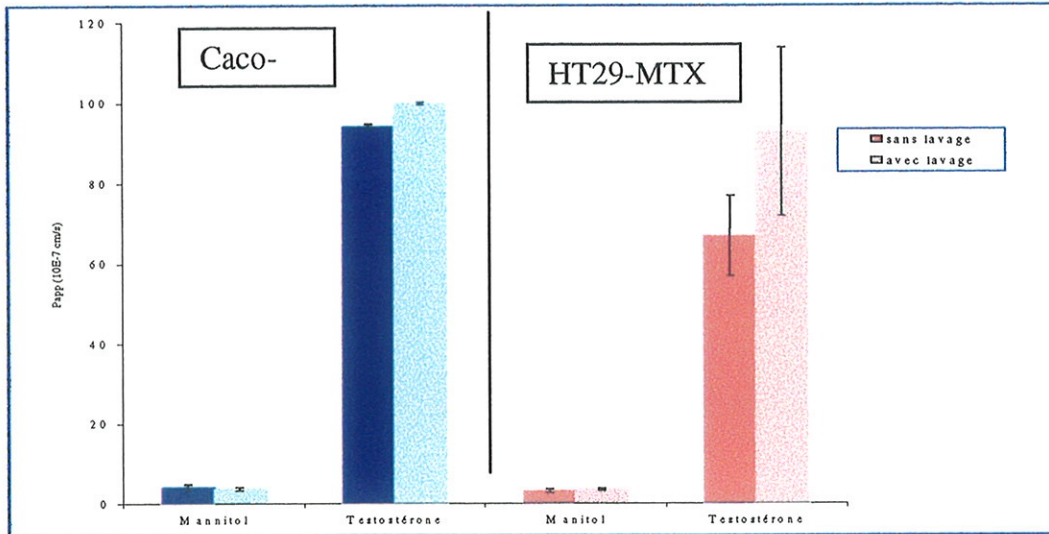


Figure 20 : Effet du mucus sur la perméabilité des cellules HT29-MTX et Caco-2/TC7 (n = 6)

Pour les deux molécules, les deux modèles utilisés permettent d'obtenir des perméabilités apparentes similaires. Par ailleurs, quel que soit le modèle cellulaire utilisé et pour les deux molécules, le lavage n'affecte pas significativement les perméabilités mesurées.

3. DISCUSSION

Les cellules Caco-2/TC7 sont utilisées depuis longtemps dans l'industrie pharmaceutique comme outil de prédiction de l'absorption intestinale des principes actifs. Cependant, un certain nombre de limitations a été formulé quant à leur réel pouvoir prédictif, dans la mesure où le modèle n'intègre pas l'effet du mucus sur l'absorption. De plus, pour les molécules moyennement résorbées chez l'Homme, la fiabilité du modèle serait limitée. En effet, pour cette catégorie de molécules, hormis les caractéristiques de perméabilité intrinsèque, les constantes physico-chimiques et les données biopharmaceutiques (vitesse de dissolution *in vivo*, solubilité *in vivo*, formulation galénique...) peuvent moduler la réelle fraction absorbée chez l'Homme. Enfin, compte tenu du taux d'expression des transporteurs dans les cellules Caco-2/TC7 généralement différent de celui de l'intestin, ce modèle serait peu ou pas prédictif de l'absorption des molécules dont le passage implique une reconnaissance cellulaire.

Dans ce cadre, l'objectif de notre étude est la mise au point de deux nouveaux modèles de cultures cellulaires : le modèle HT29-MTX et une coculture Caco-2/TC7 HT29-MTX, afin de comparer leurs potentiels prédictifs à celui du modèle Caco-2/TC7. Nos travaux s'articulent autour de quatre axes :

- caractérisation en terme de morphologie et de propriétés fonctionnelles (TEER principalement) des trois modèles ;
- étude de la perméabilité de molécules de référence franchissant la barrière par un mécanisme passif, établissement de corrélations entre la perméabilité *in vitro* et le pourcentage d'absorption chez l'Homme et comparaison des trois modèles entre eux ;
- étude de quelques molécules transportées activement ;

- approche du rôle du mucus dans le phénomène de diffusion de molécules lipophiles et hydrophiles.

3.1. Morphologie et caractéristiques fonctionnelles

La vitesse de croissance des cellules Caco-2/TC7 est beaucoup plus rapide que celle des cellules HT29-MTX et de la coculture, mais la phase exponentielle des cellules Caco-2/TC7 débute vers le quatrième jour de culture et s'achève à 8 jours pour atteindre l'état stationnaire. La densité cellulaire qui en résulte est plus faible que celle des cellules HT29-MTX et de la coculture. Pour ces deux derniers modèles, la croissance cellulaire débute dès le deuxième jour de culture et s'achève vers les neuvième et onzième jours respectivement. Les TEER des trois modèles restent proches jusqu'à la date à laquelle la confluence est atteinte. Cependant, dans la période de post-confluence, la TEER des cellules HT29-MTX croît sensiblement plus vite que celle des cellules Caco-2/TC7, tandis que la coculture évolue de façon intermédiaire. Dans le cas de Walter et de Wikman-Larhed (43, 45), la TEER des cellules HT29-MTX est plus faible que celle des cellules Caco-2/TC7, et la résistance de la coculture est inférieure à celle des cellules Caco-2/TC7, et les auteurs prévoient des perméabilités sur coculture supérieures à celles obtenues sur modèle Caco-2/TC7. La résistance transépithéliale de la coculture que nous avons réalisée est 1,5 fois plus élevée que celle des cellules Caco-2/TC7, elle correspondrait à des jonctions serrées étroites.

La microscopie électronique à transmission réalisée sur cellules Caco-2/TC7 à 21 jours de culture montre une différenciation en entérocytes avec une bordure en brosse bien développée maintenue par des filaments, des jonctions serrées et des desmosomes, des

vésicules de sécrétion lipidique au pôle basolatéral. Les images en microscopie à balayage sur les trois lignées montrent une polarisation des cellules Caco-2/TC7 et HT29-MTX, ces dernières sécrétant du mucus à leur pôle apical. L'observation des cellules HT29-MTX en microscopie optique après coloration du mucus montre que la sécrétion de mucus et la taille des cellules sont maximales aux alentours de 20 jours de culture et cette date correspond également à celle pour laquelle la résistance transépithéliale atteint un plateau. Ces observations indiquent la nécessité d'attendre trois semaines de culture pour utiliser les cellules à un niveau de différenciation optimal. De même, la résistance transépithéliale des deux autres modèles se stabilise à trois semaines de culture et leur utilisation se fera préférentiellement à partir de 21 jours de culture. A partir de 29 jours de culture, les cellules HT29-MTX présentent des espaces intercellulaires dilatés, pouvant témoigner d'une souffrance cellulaire ou d'une dégénérescence : au-delà de cette date, les cellules ne seront plus utilisées pour les études.

Contrairement à ce que Wikman-Larhed (45) a observé, à savoir qu'un ensemencement à 1% de cellules HT29-H aboutit à une coculture contenant environ 50% de cellules caliciformes, dans nos conditions opératoires, la quantité de cellules HT29-MTX, après 21 jours de culture, semble du même ordre que celle qui est utilisée pour l'ensemencement (50%). L'aspect classique de la coculture en microscopie électronique montre des zones bien distinctes de cellules Caco-2/TC7 et des zones de cellules HT29-MTX, alors que dans les conditions physiologiques, les cellules caliciformes sont dispersées au sein des entérocytes. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que les cellules de même nature s'attirent et se regroupent sous l'effet de mécanismes de reconnaissance. Wikman-Larhed propose une autre cause qui serait la vitesse de croissance importante des cellules HT29-H (45). Dans nos conditions, nos résultats montrent que la vitesse de croissance ne peut pas être responsable du regroupement des cellules par lignée, puisque la croissance

des cellules Caco-2/TC7 est plus rapide que celle des cellules HT29-MTX. En revanche, l'évolution de la surface occupée par les cellules pourrait partiellement expliquer ce phénomène. En effet et à titre d'exemple, à 5 jours de culture, les cellules Caco-2/TC7 occupent une surface 9 fois plus faible que les cellules HT29-MTX qui peuvent se regrouper. En revanche, à 7 jours de culture, les surfaces occupées par les cellules Caco-2/TC7 sont plus importantes que celles occupées par les cellules HT29-MTX avec un ratio HT29-MTX/Caco-2/TC7 de l'ordre de 0,7.

3.2. Etudes de perméabilités

Dans ce chapitre, nous analysons les résultats de perméabilités obtenus sur les trois modèles de culture cellulaire. Dans un premier temps, les modèles sont comparés entre eux afin de dégager une éventuelle différence en terme de perméabilité des molécules empruntant théoriquement la voie diffusionnelle, puis celles qui sont transportées activement. Ensuite, les résultats obtenus avec les molécules hydrophiles et lipophiles sont analysés dans le but de dégager le rôle possible du mucus dans le processus de résorption. Enfin, une analyse critique des corrélations entre les valeurs de perméabilités mesurées et la fraction absorbée chez l'Homme est particulièrement développée.

3.2.1. Comparaison des modèles

Les perméabilités mesurées sur coculture et sur cellules HT29-MTX sont le plus souvent légèrement inférieures à celles qui sont déterminées sur le modèle

Caco-2/TC7, contrairement aux travaux de Walter (43). Ce phénomène est plus marqué pour le propranolol. La caféine et la phénytoïne étudiées sur cellules HT29-MTX, et la clonidine et le chloramphénicol étudiés sur coculture présentent des perméabilités sensiblement supérieures à celles obtenues sur cellules Caco-2/TC7 (tableau XIII, page 58). Cependant, pour le sumatriptan, les valeurs obtenues sur cellules HT29-MTX et coculture sont très supérieures à celles obtenues sur cellules Caco-2/TC7.

Selon certains auteurs, le sumatriptan serait pris en charge par un système à efflux différent du système P-gp 170 (17). Cette prise en charge peut être tenue responsable de la différence marquée de perméabilités obtenues d'une part sur les modèles HT29-MTX et coculture, et, d'autre part, sur le modèle Caco-2/TC7. En effet, les cellules HT29-MTX sont dépourvues de systèmes à efflux (27) et il n'y a pas d'effet sens de passage sur les perméabilités mesurées.

Pour le propranolol, qui est chargé positivement à pH physiologique, la diminution de la perméabilité sur cellules HT29-MTX par rapport aux cellules Caco-2/TC7 peut être due au mucus qui possède de fortes charges négatives liées aux groupements sulfates estérifiés sur des résidus N-acétylglucosamines et à la présence d'acide sialique dans la structure du mucus (20). Cette hypothèse peut être confirmée par les valeurs élevées de TEER enregistrées sur un épithélium de cellules HT29-MTX. En effet, la résistance transépithéliale étant le reflet macroscopique des mouvements ioniques de part et d'autre de la membrane, le mucus pourrait être à l'origine d'une résistance à la diffusion des ions. Cette étude devrait être complétée par l'étude d'autres molécules afin de dégager le rôle de la charge moléculaire dans la diffusion à travers le mucus.

A l'exception de ces observations, il convient de souligner que, pour les molécules lipophiles et neutres (testostérone, progestérone), les modèles n'ont pas montré de différence

significative sur les perméabilités mesurées, suggérant l'absence d'effet du mucus sur l'absorption des molécules lipophiles.

Par ailleurs, des corrélations linéaires entre les modèles pris deux à deux peuvent être établies avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,92. Ces observations montrent que, bien que les modèles ne soient pas équivalents, les molécules qui diffusent passivement conservent la même hiérarchie, en terme de perméabilité, quel que soit le modèle utilisé (figure 21).

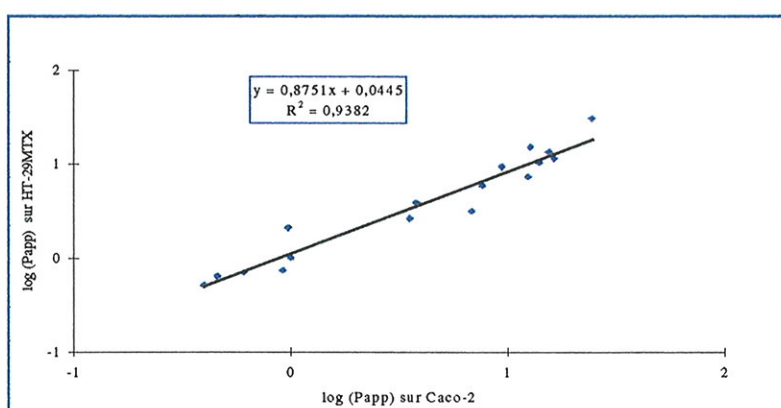


Figure 21A : Corrélation Caco-2/TC7-HT29-MTX. $R^2 = 0,9438$

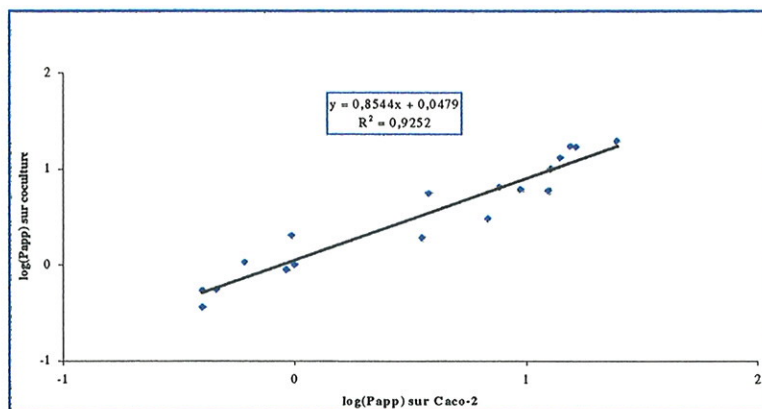


Figure 21B : Corrélation Caco-2/TC7- Coculture. $R^2 = 0,925$

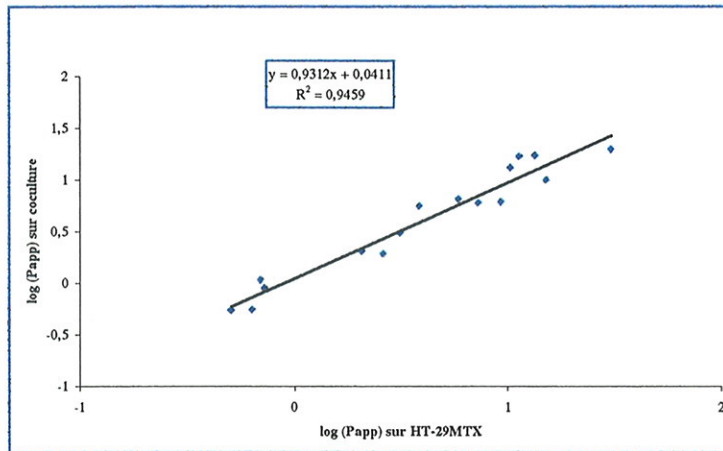


Figure 21C : Corrélation HT29-MTX-Coculture. $R^2 = 0,946$

Enfin, deux molécules faisant appel à une reconnaissance cellulaire dans le processus d'absorption sont étudiées sur les trois modèles. Il s'agit de la phénylalanine qui emprunte le transporteur des dipeptides, et de la cimétidine dont les travaux antérieurs ont montré que sa résorption est sous le contrôle d'une pompe à efflux qui serait différente de la P-gp 170 dans la mesure où son effet n'est pas inhibé par le vérapamil (42).

Pour la phénylalanine, aucun des modèles ne montre de passage orienté, soutenant l'implication d'un transporteur actif des dipeptides. Ces résultats sont compatibles avec les données de la littérature tendant à montrer une sous-expression de ce type de transporteur dans les cellules Caco-2/TC7 (26). Afin de confirmer cette hypothèse, d'autres travaux sont nécessaires, notamment l'étude du passage en fonction de la concentration.

Les résultats montrent que, sur les cellules Caco-2/TC7, la perméabilité à la cimétidine étudiée à une concentration traceuse est dix fois plus importante dans le sens de la sécrétion que dans le sens de l'absorption. A 10^{-4} M, sur cellules Caco-2/TC7, les perméabilités dans les deux sens restent sensiblement différentes, témoignant d'une non-saturation de la pompe. Cet effet n'existe pas sur le modèle HT29-MTX. Il semble qu'un système d'efflux exprimé sur les cellules Caco-2/TC7 et pas sur le modèle HT29-MTX soit responsable de la sécrétion de la

molécule. L'efflux est plus modéré sur le modèle de coculture, qui comporte à la fois des cellules dépourvues de systèmes d'efflux et des cellules Caco-2/TC7 surexprimant ces transporteurs.

Ainsi, les cellules HT29-MTX peuvent être utilisées afin d'améliorer les structures chimiques et les caractéristiques physico-chimiques de molécules appartenant à une même série, pour une meilleure optimisation du potentiel d'absorption, en s'affranchissant des phénomènes d'efflux. Il serait utile d'approfondir cette étude avec d'autres molécules prises en charge par des pompes à efflux (érythromycine, azithromycine...).

3.2.2. Rôle du mucus

Le mucus intestinal est un lubrifiant, qui piège les bactéries, virus et parasites et permet une détoxification de l'organisme par complexation des métaux lourds. Il protège la muqueuse intestinale contre l'attaque des protéases et interagit avec le système immunitaire. Il interviendrait dans la diffusion des molécules, et notamment des macromolécules (20).

Des auteurs (35) ont étudié le rôle du mucus et ont montré qu'il constitue une barrière à la diffusion des molécules lipophiles. L'étude comparative des perméabilités obtenues sur cellules HT29-MTX et sur cellules Caco-2/TC7 a montré que la perméabilité sur cellules HT29-MTX est 6 fois moins importante que celle mesurée sur cellules Caco-2/TC7, suggérant un rôle de barrière du mucus (44). Ce rôle de barrière s'exercerait plus spécifiquement sur les molécules lipophiles puisque l'étude du mannitol ne montre pas de différence significative entre les deux modèles. Cette hypothèse est confortée par l'augmentation de la perméabilité à la testostérone, après lavage des cellules HT29-MTX qui n'affecte pas la perméabilité au

mannitol. Cependant, d'autres travaux du même auteur montrent des résultats en contradiction avec ceux obtenus antérieurement. En effet, dans ces études, les perméabilités à la testostérone sont identiques sur les deux modèles Caco-2/TC7 et HT29-MTX. C'est pourquoi, l'utilisation du modèle Caco-2/TC7 serait limitée pour l'étude des molécules lipophiles.

Afin de clarifier la contribution du mucus à la diffusion des molécules, nous avons comparé d'une part les perméabilités de 18 molécules de référence ayant un ClogP variant de $-3,6$ à $+3,0$ sur les deux modèles, et, d'autre part, l'effet de la suppression du mucus des cellules HT29-MTX sur la perméabilité d'une molécule de référence hydrophile (mannitol) et d'une molécule de référence lipophile (testostérone).

Globalement, les perméabilités déterminées sur les 18 molécules de référence à l'aide des deux modèles sont proches, sauf pour le sumatriptan et le propranolol, dont les résultats ont été analysés plus haut. Pour les molécules lipophiles, telles que la testostérone et la progestérone, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les perméabilités déterminées sur modèles Caco-2/TC7 et HT29-MTX. En outre, un lavage de la couche de mucus n'entraîne pas d'augmentation de la perméabilité à la testostérone et au mannitol, contrairement aux résultats de certaines études (25).

Cependant, le lavage s'accompagne d'une diminution de la TEER, uniquement sur les cellules HT29-MTX. Dans la mesure où la perméabilité au mannitol reste constante après retrait du mucus, le lavage n'altère pas les jonctions serrées et la diminution de la TEER peut être attribuée au retrait du mucus. En effet, le mucus pourrait jouer un rôle de barrière au transfert des ions de part et d'autre de la membrane. Ce rôle peut être conforté par la diminution de la perméabilité sur cellules HT29-MTX d'une molécule chargée à pH physiologique, comme c'est le cas pour le propranolol. Ainsi, le mucus sécrété par les cellules HT29-MTX ne constituerait pas une barrière à la diffusion des molécules lipophiles, mais,

probablement, une barrière à la diffusion des molécules chargées. D'autres études sont nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

3.2.3. Prédiction de l'absorption chez l'Homme

Dans la littérature, il est montré qu'il est possible d'établir des corrélations perméabilité sur modèle cellulaire-fraction absorbée chez l'Homme. De nombreux résultats de ce type ont été publiés pour les cellules Caco-2/TC7 (5, 48). Aucune corrélation portant sur un grand nombre de molécules n'a été publiée pour les modèles HT29-MTX et coculture.

Ces corrélations sont réalisées en utilisant l'équation suivante, décrite par Artursson

(5) :

$$\text{Fraction absorbée} = \frac{0 - 100}{1 + \left(\frac{\log P_{app}}{A} \right)^B} + 100$$

Les courbes sigmoïdes établies présentent des pentes différentes, en fonction du modèle de culture cellulaire considéré (figures 22, 23, 24, 25). Les valeurs des paramètres A et B de l'équation des courbes sont indiquées dans le tableau XV avec leur intervalle de confiance ($p < 0,05$).

Le paramètre permettant la meilleure appréciation de la qualité de la régression correspond au rapport : $\frac{\text{Carré moyen}}{\text{Variance résiduelle}}$, ce rapport doit être maximal. Le modèle Caco-2/TC7 est celui pour lequel ce rapport est le plus élevé et le modèle de coculture est celui pour lequel la régression est la moins bonne.

Tableau XV : Paramètres A et B de la régression non linéaire pour les modèles Caco-2/TC7, HT29-MTX et coculture. Les équations ont été déterminées à partir des perméabilités à 17 molécules. Valeur du rapport $\frac{\text{Carré moyen}}{\text{Variance résiduelle}}$ pour chaque modèle

	Caco-2/TC7	HT29-MTX	Coculture
A	-5,595	-5,643	-5,683
Intervalle de confiance*	[-5,796 ; -5,394]	[-5,897 ; -5,388]	[-5,975 ; -5,391]
B	-24,064	-21,546	-18,158
Intervalle de confiance*	[-42,164 ; -5,929]	[-40,048 ; -3,044]	[-33,305 ; -2,981]
Carré moyen	110,932	77,476	58,657
Variance résiduelle			

*p < 0,05

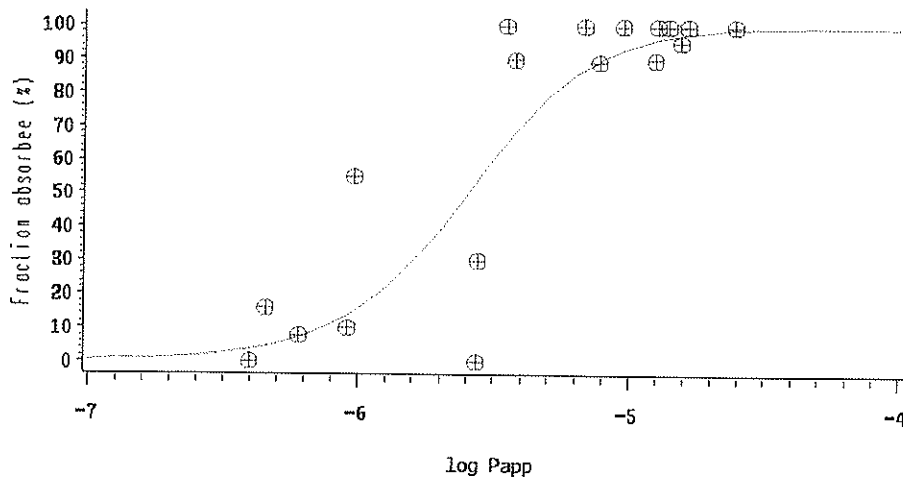


Figure 22 : Corrélation Caco-2/TC7-Fraction absorbée chez l'Homme

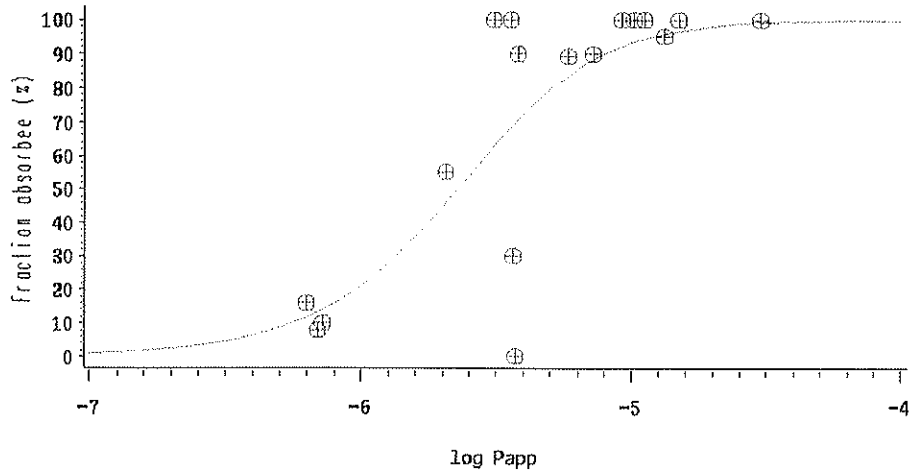


Figure 23 : Corrélation HT29-MTX- Fraction absorbée chez l'Homme

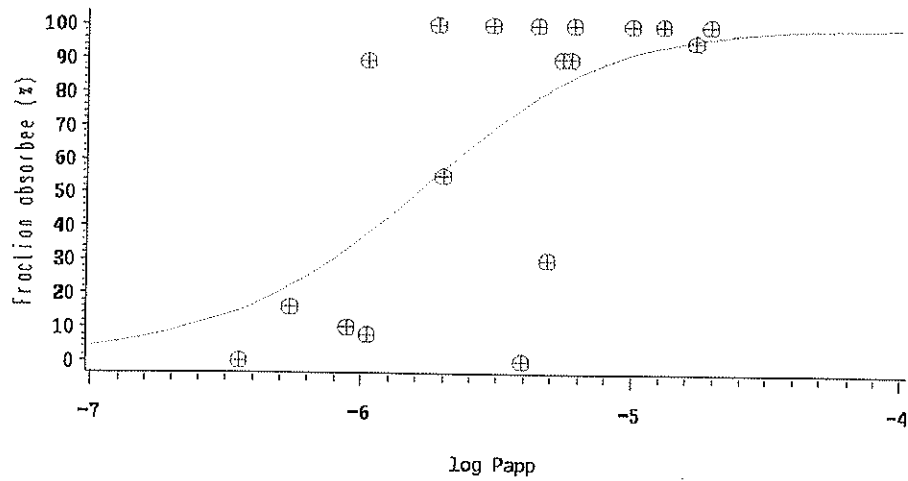


Figure 24 : Corrélation Coculture-Fraction absorbée chez l'Homme

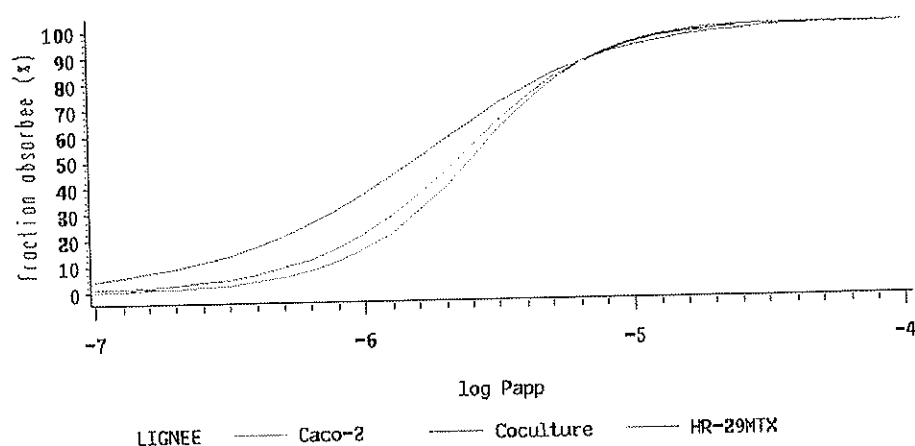


Figure 25 : Corrélations obtenues pour les trois modèles

Les courbes tracées ne permettent pas une prédiction précise de l'absorption chez l'Homme, mais mettent en évidence des tendances permettant de différencier trois types de molécules (tableau XVI) :

- celles qui sont fortement résorbées (Fraction absorbée > 90%),
- celles pour lesquelles la résorption est moyenne (20 < Fraction absorbée < 90%),
- celles qui sont faiblement résorbées (Fraction absorbée < 20%).

Tableau XVI : Classification des molécules en terme de perméabilité apparente sur les modèles Caco-2/TC7, HT29-MTX et coculture

	Perméabilité apparente (10^{-6} cm/s)		
	Caco-2/TC7	HT29-MTX	Coculture
Forte résorption (> 90%)	$> 7,70 \pm 0,39$	$> 5,87 \pm 0,25$	$> 1,05 \pm 0,04$
Résorption intermédiaire (20-90%)	$0,46 \pm 0,02$ à $7,70 \pm 0,39$	$0,64 \pm 0,07$ à $5,87 \pm 0,25$	$0,55 \pm 0,02$ à $1,05 \pm 0,04$
Faible résorption (< 20%)	$< 0,46 \pm 0,02$	$< 0,64 \pm 0,07$	$< 0,55 \pm 0,02$

Pour les molécules moyennement absorbées, la fenêtre permettant la discrimination des molécules est plus ou moins large selon le modèle. Elle est de 1,22 unités log pour le

modèle Caco-2/TC7, de 0,96 et de 0,28 unités log pour les modèles HT29-MTX et coculture. C'est donc le modèle Caco-2/TC7 qui permettra la prévision de la résorption chez l'Homme avec le plus de précision.

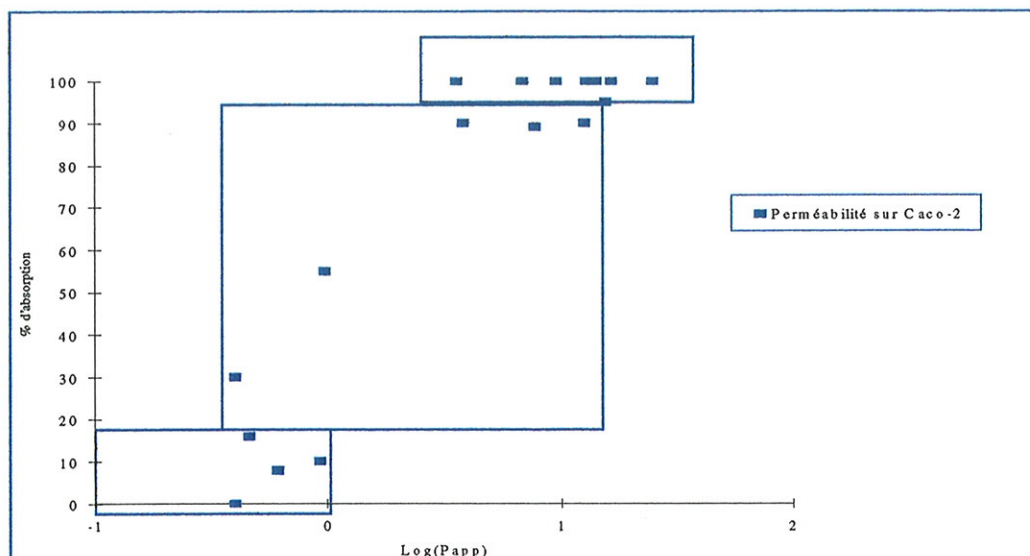


Figure 26A : Mise en évidence des trois types de molécules en fonction de leur perméabilité sur modèle Caco-2/TC7

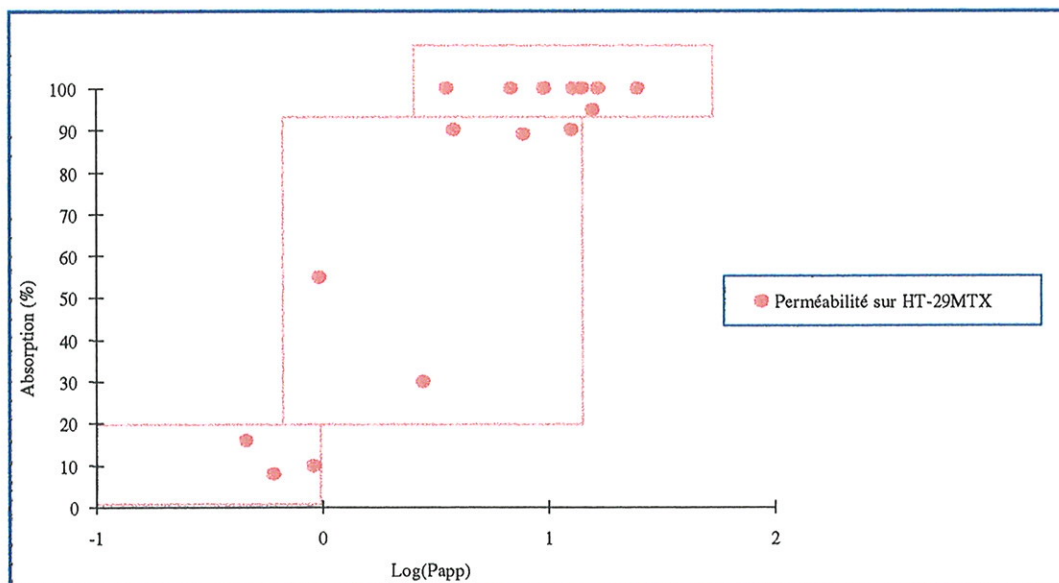


Figure 26B : Mise en évidence des trois types de molécules classées en fonction de leur perméabilité sur modèle HT29-MTX

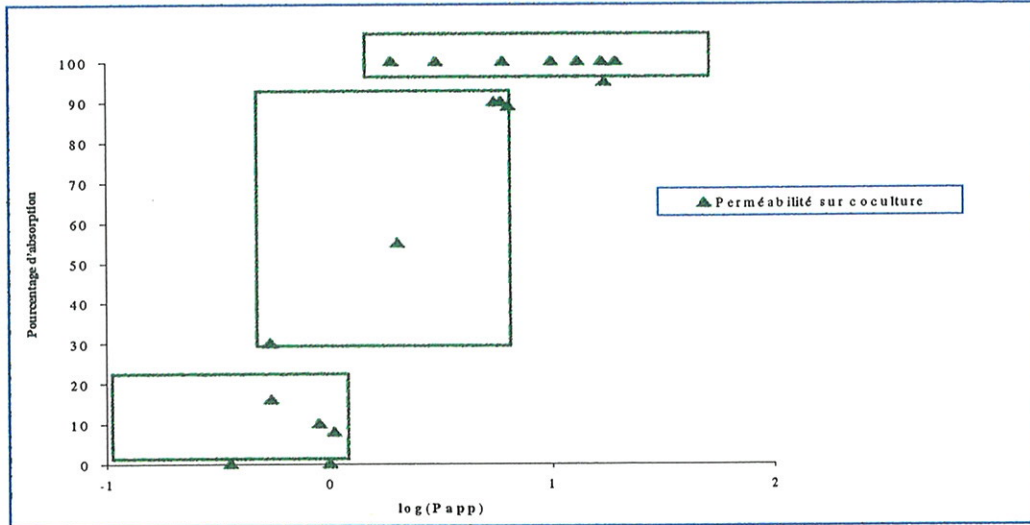


Figure 26C : Mise en évidence des trois types de molécules en fonction de leur perméabilité apparente sur coculture

D'après ces résultats, le modèle Caco-2/TC7 semble être le modèle le plus adapté pour la prédiction de l'absorption intestinale. Ces études ne tiennent cependant pas compte des paramètres biopharmaceutiques pouvant interagir avec l'absorption. Il est, de plus, indispensable d'étudier un plus grand nombre de molécules dont l'absorption est moyenne, pour pouvoir établir des corrélations plus significatives et pour pouvoir différencier plus précisément les trois zones. Le modèle de coculture ne donne pas des résultats suffisamment précis pour être utilisé dans la prédiction de l'absorption chez l'Homme.

❖ *Cas de l'inuline : Relation structure chimique - absorption*

Les modèles de culture cellulaires permettent de déterminer, à partir d'un squelette chimique donné, quels sont les groupements à modifier (ajouter ou ôter) pour optimiser l'absorption. Le cas de la résorption de l'inuline illustre cet intérêt. La perméabilité de l'inuline sur laquelle un groupement méthoxy- a été greffé est plus de cinq fois supérieure à celle de l'inuline. La méthoxy-inuline devrait donc être mieux résorbée *in vivo* que l'inuline.

L'augmentation de la lipophilie de la molécule s'accompagne d'une augmentation considérable de son passage sur les modèles cellulaires testés.

❖ *Comparaison avec les données de la littérature*

Les corrélations établies sur le modèle Caco-2/TC7 décrites dans la littérature présentent des résultats proches des nôtres, dans la zone d'absorption intermédiaire (38, 48). Cependant, dans les deux cas, cette zone est plus étroite que celle que nous avons déterminée : pour Yee, cette zone correspond à une unité log et pour Artursson, elle est de 0,84 unités log.

Aucune étude n'a porté sur l'établissement de corrélations *in vitro-in vivo*, à l'aide des cellules HT29-MTX.

Seul Walter (43) a étudié la perméabilité de la coculture à des molécules de références, pour les corréler à l'absorption chez l'Homme. Les résultats portent sur 7 molécules dont la résorption est comprise entre 99,90% et 40%. La comparaison de nos résultats et de ceux de cette équipe est présentée dans la figure 27. Les perméabilités déterminées par Walter lui permettent de tracer une courbe de type exponentiel (43). Cependant, parmi les 7 molécules qu'il a choisies, la ranitidine et la cimétidine d'une part, et le propranolol et l'aténolol d'autre part appartiennent à deux séries chimiques, ce qui permet d'obtenir une meilleure corrélation qu'avec des molécules de séries chimiques différentes.

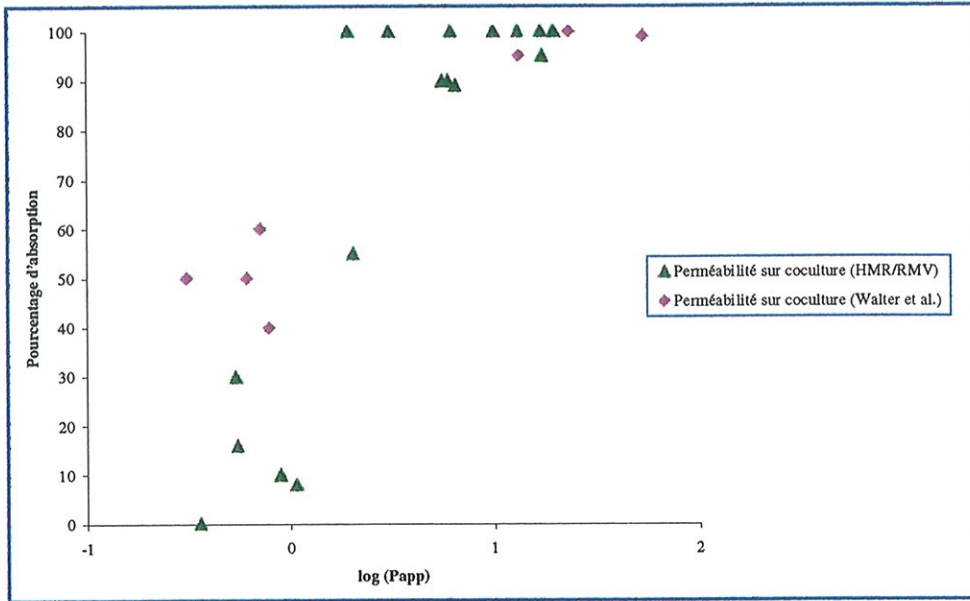


Figure 27 : Coculture. Comparaison avec les données de la littérature (43)

CONCLUSION

Actuellement, la recherche chimique synthétise de grandes quantités de molécules de structures très proches et il est indispensable de pouvoir prédire rapidement et de façon fiable leur absorption intestinale chez l'Homme. Le modèle de Caco-2/TC7, constitué de cellules qui se différencient spontanément en entérocytes, est couramment utilisé dans ce but. Notre étude a consisté à réaliser une coculture composée à 50% de cellules Caco-2/TC7 et à 50% de cellules HT29-MTX et de le comparer aux deux lignées étudiées séparément. Théoriquement, ce modèle devrait constituer une amélioration du modèle Caco-2/TC7 car il combine dans un même système les entérocytes et le mucus sécrété par les cellules caliciformes.

Dans cette étude, les résultats obtenus sur le modèle Caco-2/TC7 corroborent ceux de la littérature et montrent une corrélation sigmoïde entre la perméabilité et la fraction absorbée chez l'homme, ce qui permet de classer les molécules en terme de potentiel d'absorption dans une large étendue de perméabilités ($0,40 \cdot 10^{-6}$ à $24,70 \cdot 10^{-6}$ cm/s).

Pour le modèle HT29-MTX, notre étude a mis en évidence que le mucus n'a pas de rôle sur l'absorption des molécules lipophiles, mais il pourrait jouer un rôle dans le processus de diffusion des molécules chargées positivement. Des travaux complémentaires s'avèrent nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer le rôle de barrière du mucus vis à vis de molécules chargées. Par ailleurs, une bonne corrélation sigmoïde entre la perméabilité mesurée à l'aide du modèle HT29-MTX et la fraction absorbée chez l'Homme a été montrée, suggérant la possibilité d'utiliser cette lignée comme nouveau modèle pour le criblage des molécules de la recherche. Cependant, le modèle Caco-2/TC7 demeure un meilleur modèle permettant une bonne distinction des molécules dont la résorption intestinale est moyenne chez l'Homme

Néanmoins, contrairement aux cellules Caco-2/TC7, les cellules HT29-MTX sont dépourvues de système à efflux, ce qui rendrait ce dernier modèle plus adapté à l'optimisation de la structure de molécules prises en charges par la pompe à efflux et issues d'une même série chimique. Il pourrait, à ce titre, constituer une alternative ou un complément intéressant au modèle Caco-2/TC7 dans l'appréhension des phénomènes de résorption intestinale. Des études de molécules transportées activement devront être réalisées en plus grand nombre pour évaluer l'intérêt du modèle HT29-MTX dans la prédiction de l'absorption chez l'Homme et compléter nos travaux préliminaires sur ce modèle.

Enfin, les travaux portant sur la coculture ont montré que l'épithélium formé se développe en monocouche comme pour les lignées Caco-2 et HT29-MTX prises séparément. Cependant, les cellules appartenant à la même lignée se regroupent en paquets contrairement à l'état physiologique. Des études complémentaires devront permettre de vérifier la présence de jonctions serrées entre les cellules Caco-2 et les HT29-MTX par la technique d'immunofluorescence en microscopie optique après marquage spécifique de l'une des deux lignées et des protéines ZO1 des jonctions serrées. Dans nos conditions, bien qu'une corrélation sigmoïde ait été trouvée entre perméabilité et fraction absorbée chez l'homme, celle-ci s'est avérée peu fiable et ne permet pas une prédiction correcte de la résorption.

Enfin, pour ces trois modèles, il est indispensable d'approfondir les résultats de prédiction de l'absorption chez l'homme par étude de la perméabilité d'un plus grand nombre de molécules, surtout de résorption intermédiaire.

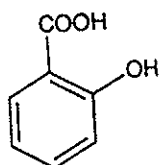
ANNEXES

ANNEXE I

CARACTERISTIQUES DES MOLECULES DE REFERENCE

Acide salicylique

Formule développée



Poids moléculaire : 138,12 g/mol

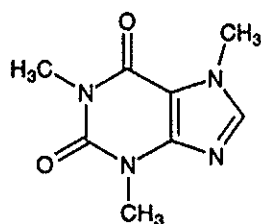
log P : 0,3

Charge au pH physiologique (7,4) : -

Utilisation thérapeutique : anti-inflammatoire

Caféine

Formule développée



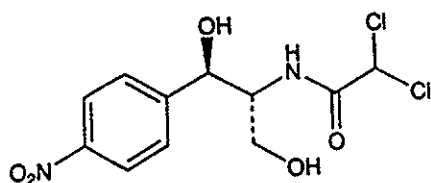
Poids moléculaire : 149,2 g/mol

log P : -0,2

Neutre à pH physiologique

Chloramphénicol

Formule développée



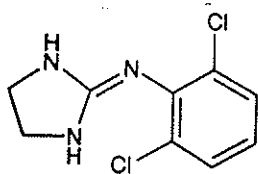
Poids moléculaire : 323,1 g/mol

log P : -0,4

Utilisation thérapeutique : antibiotique

Clonidine : (2-[2,6-dichloroaniline]-2-imidazoline)

Formule développée



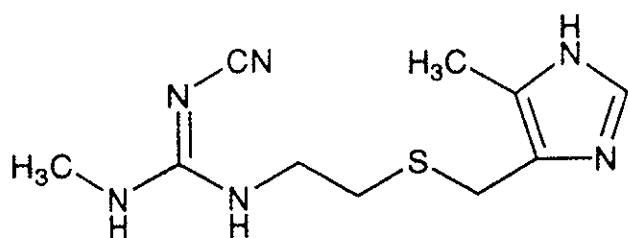
Poids moléculaire : 266,6 g/mol

log P : 2,2

Utilisation thérapeutique : antihypertenseur

Cimétidine

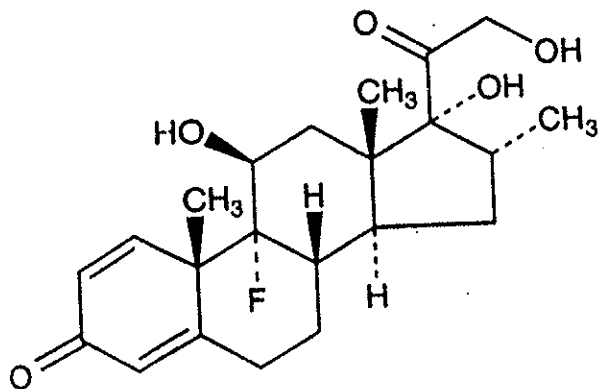
Formule développée



Poids moléculaire : 252 g/mole

Utilisation thérapeutique : anti-ulcéreux
(anti-H₂)**Dexaméthasone**

Formule développée



Poids moléculaire : 392,5 g/mole

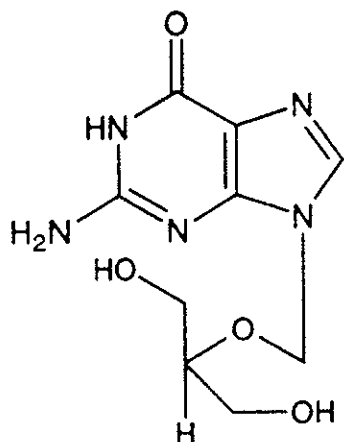
log P : -0,3

Utilisation thérapeutique : anti-inflammatoire
stéroïdien

Neutre à pH physiologique

Ganciclovir

Formule développée



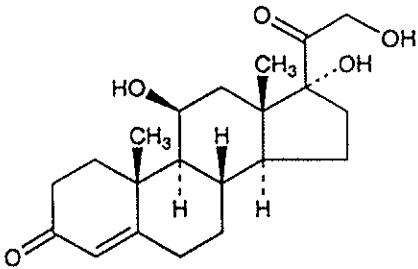
Poids moléculaire : 255,00 g/mol

log P : -3

Utilisation thérapeutique : antiviral

Hydrocortisone

Formule développée



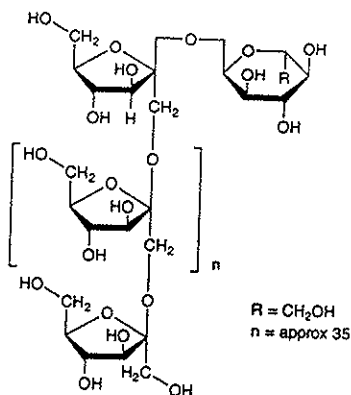
Poids moléculaire : 362,47 g/mol

log P : -0,4

Utilisation thérapeutique : anti-inflammatoire stéroïdien

Inuline

J

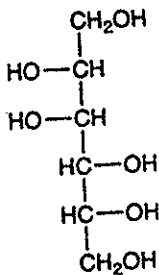


Poids moléculaire : 5000 g/mole

Neutre au pH physiologique (7,4)

Mannitol

Formule développée



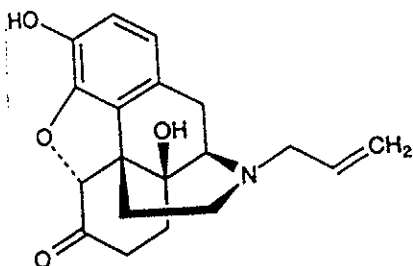
Poids moléculaire ; 182 g/mol

log P : -3,6

Neutre au pH physiologique (7,4)

Naloxone

Formule développée



Poids moléculaire : 363,8 g/mol

log P : 1,2

Utilisation thérapeutique : antagoniste des opiacés (traitement des intoxications aux opiacés)

PEG 900 : Polyéthylène glycol 900

Formule développée

Poids moléculaire : 900 g/mol
Neutre au pH physiologique (7,4)

PEG 4000 : Polyéthylène glycol 4000

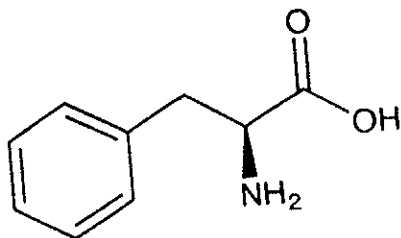
Formule développée

Poids moléculaire : 4000 g/mol
Utilisation thérapeutique : préparation aux explorations coliques

Phénylalanine

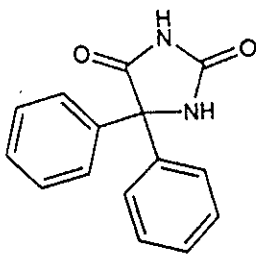
Formule développée

Poids moléculaire : 165,00 g/mol

**Phénytoïne**

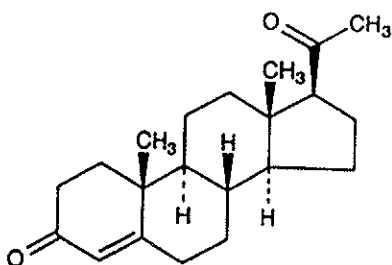
Formule développée

Poids moléculaire : 252,25 g/mol
log P : 2,3
Utilisation thérapeutique : anti-épileptique
Neutre au pH physiologique

**Progestérone**

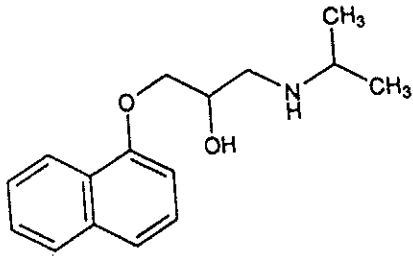
Formule développée

Poids moléculaire : 314,47 g/mol
log P : 3,1
Neutre au pH physiologique (7,4)
Utilisation thérapeutique : hormonothérapie



Propranolol : chlorhydrate de DL-(1-[isopropylamino]-3-[1-naphtyloxy]-2-propanol)

Formule développée



Poids moléculaire : 295,8 g/mol

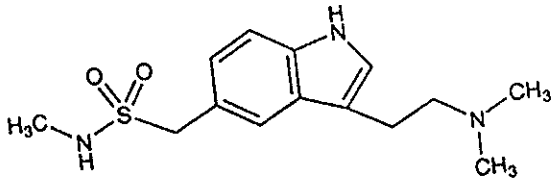
log P : 3,0

Charge au pH physiologique (7,4) : +

Utilisation thérapeutique : Béta-bloquant

Sumatriptan

Formule développée



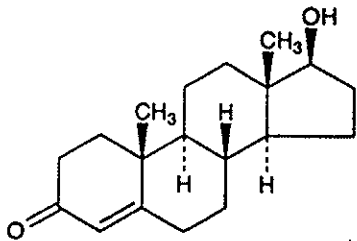
Poids moléculaire : 295,40 g/mol

log P : ND

Utilisation thérapeutique : anti-migraineux

Testostérone : 4-androstène-17-β-ol-3-one

Formule développée



Poids moléculaire : 288,4 g/mol

log P : 2,6

Neutre au pH physiologique

Utilisation thérapeutique : traitement de l'hypogonadisme masculin

ANNEXE II

REFERENCES DES MOLECULES ET RADIOMOLECULES

Molécule	Référence produit non marqué	Référence radiomolécule
Acide salicylique	FLUKA	Salicylic acid [7-14C] NEN
Benzylpénicilline	SIGMA B-6291	[Phényl-4(n)-3H]Benzylpénicilline AMERSHAM
Caféine anhydre	FLUKA 27600	Caféine [1-méthyl-14C] NEN
Chloramphénicol	SIGMA C-0378	Chloramphénicol [Ring3,5-3H] NEN
Cimétidine	SIGMA C-4522	[N-méthyl-3H]Cimétidine AMERSHAM
Clonidine	SIGMA C-7897	Clonidine hydrochloride [benzene ring-3H] NEN
Dexaméthasone	SIGMA D-4902	Dexamethasone [6,7-3H(N)] NEN
DL-Propranolol	SIGMA 0884	Propranolol L-[4,3H] NEN
Ganciclovir	-	Ganciclovir [8,3H] ARC
Hydrocortisone micronisée	FLUKA 78020	Hydrocortisone [1,2-3H (N)] NEN
Inuline	Référence interne	Inuline-méthoxy [méthoxy-14C] NEN
L-Phénylalanine	Référence interne	Phénylalanine [ring-2,3,4,5] NEN
Mannitol	-	Mannitol D-[1-14C] NEN
Naloxone	-	Naloxone [n-allyl-2,3-3H] NEN
PEG 900	-	PEG [1,2-3H] ARC
PEG 4000	MERCK	PEG [1,2 -3H] NEN
Phénytoïne	JANSSEN	Diphénylhydantoïne 5,5-(4-14C) NEN
Progestérone	Référence interne	Progestérone [1,2-3H (N)] NEN
Sumatriptan	-	[Diméthylamino-N-méthyl-3H] sumatrtan NEN
Testostérone	SIGMA T-1500	RU 18,5 MBq

ANNEXE III : LISTE DES ABREVIATIONS

Caco-2/TC7 : cellules Caco-2 clone TC7

DMEM : milieu de culture de Dubelcco

HBSS : tampon de Hank

HT29-MTX : cellules HT29 différenciées en présence de méthotrexate

MEB : microscopie électronique à balayage

MET : microscopie électronique à transmission

MTX : méthotrexate

Papp : perméabilité apparente

PBS : tampon phosphate

P-gp : P-glycoprotéine

TEER : résistance transépithéliale

REFERENCES

REFERENCES

1. **Adson A., Raub T.J., Burton P.S., Barsuhn C.L., Hilgers A.R., Audus K.L., Ho N.F.H.**
Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial cell monolayers.
J. Pharm. Sci. 83 (11) : **1529-1536** (1994)

2. **Amidon G.L., Sinko P.J., Fleisher D.**
Estimating human oral fraction dose absorbed : a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds.
Pharm. Res. 10 : **651-654** (1988)

3. **Anderson J.M., Van Itallie C.M.**
Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability
Am. J. Physiol. 269 (Gastrointest. Liver Physiol. 32) : **G467-G475** (1995)

4. **Artursson P.**
Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa.
Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 8 (4) : **305-330** (1991)

5. **Artursson P., Karlsson J.**
Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 175 (3) : **880-885** (1991)

6. **Artursson P., Palm K., Luthman K.**
Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport.
Adv. Drug Deliv. Rev. 22 : **67-84** (1996)

7. **Artursson P., Karlsson J., Ocklind G., Schipper N.**
Studying transport processes in absorptive epithelia.
In : *Cell culture models of epithelia. A practical approach.*
A.Shaw. Ed. IRL Press (1996)

8. **Bai J.P.F., Hu M., Subramanian P., Mosberg H.I., Amidon G.L.**

Utilization of peptide carrier system to improve intestinal absorption : targeting prolidase as a prodrug-converting enzyme.

J. Pharm. Sci. 81 (2) : **113-116** (1992)

9. **Bai J.P.F., Chang L.L.**

The involvement of dipeptidyl peptidase IV in brush-border degradation of GRF(1-29)NH₂ by intestinal mucosal cells.

J. Pharm. Pharmacol. 47 : **698-701** (1995)

10. **Bailey C.A., Bryla P., Malick A.W.**

The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development. Adv. Drug Deliv. Reviews 22 : **85-103** (1996)

11. **Boulenc X.**

Intestinal cell models. Their use in evaluating the metabolism and absorption of xenobiotics.

S.T.P. Pharma Sci. 7 (4) : **259-269** (1997)

12. **Briske-Anderson M.J., Finley J.W., Newman S.M.**

The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells.

P.S.E.B.M. 214 : **248-257** (1997)

13. **Caro I., Boulenc X., Rousset M., Meunier V., Bourrié M., Julian B., Joyeux H., Roques C., Berger Y., Zweibaum A., Fabre G.**

Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs.

Int. J. Pharm. 116 : **147-158** (1995)

14. **Carrière V., Lesuffleur T., Barbat A., Rousset M., Dussaulx E., Costet P., De Waziers I., Beaune P., Zweibaum A.**

Expression of cytochrome P-450 3A in HT29-MTX cells and Caco-2 clone TC7.

FEBS Lett. 355 : **247-250** (1994)

15. Chantret I., Barbat A., Dussaulx E., Brattain M.G., Zweibaum A.

Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells ; a survey of twenty cell lines.

Cancer Res. 48 : **1936-1942** (1988)

16. Collett A., Sims E., Walker D., He Y.L., Ayrton J., Rowland M., Warhurst G.

Comparison of HT29-18-C₁ and Caco-2 cells lines as models for studying intestinal paracellular drug absorption.

Pharm. Res. 13 (2) : **216-221** (1996)

17. Delie F., Rubas W.

A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption : advantages and limitations of the Caco-2 model.

Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14 (3) : **221-286** (1997)

18. Elias H., Pauly J.E., Burns E.R.

In : *Histologie et microanatomie du corps humain.*

Ed. Desoer. Liège (1981)

19. Fogh J., Fogh J., Orfeo T.

One hundred and twenty-seven cultured human cell lines producing tumors in nude mice.

J. Natl. Cancer Inst. 59 (1) : **221-226** (1977)

20. Forstner J.F., Forstner G.G.

Chapter 33 : Gastrointestinal mucus.

In : *Physiology of the gastrointestinal tract. Third edition. Vol. 2. (1994)*

21. Hidalgo I.J., Raub T.J., Borchardt R.T.

Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability.

Gastroenterology 96 : **736-749** (1989)

22. **Hilgers A.R., Conradi R.A., Burton P.S.**

Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa.

Pharm. Res. 7 (9) : **902-910** (1990)

23. **Hillgren K.M., Kato A., Borchardt R.T.**

In vitro systems for studying intestinal drug absorption.

Med. Res. Rev. 15 (2) : **83-109** (1995)

24. **Hunter J., Jepson M.A., Tsuruo T., Simmons N., Hirst B.H.**

Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators.

J. Biol. Chem. 268 (20) : **14991-14997** (1993)

25. **Karlsson J., Wikman A., Artursson P.**

The mucus layer as a barrier to drug absorption in monolayers of human intestinal epithelial HT29-H goblet cells.

Int. J. Pharm. 99 : **209-218** (1993)

26. **Lennernäs H., Palm K., Faberholm U., Artursson P.**

Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo.

Int. J. Pharm. 127 : **103-107** (1996)

27. **Lesuffleur T., Barbat A., Dussaulx E., Zweibaum A.**

Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells.

Cancer Res. 50 : **6334-6343** (1990)

28. **Lesuffleur T., Kornowski A., Luccioni C., Muleris M., Beaumatin J., Dussaulx E., Dutrillaux B., Zweibaum A.**

Adaptation to 5-fluorouracil of the heterogeneous human colon tumor cell line HT-29 results in the selection of cells committed to differentiation.

Int. J. Cancer. 49 : **721-730** (1991)

29. **Lesuffleur T., Barbat A., Luccioni C., Beaumatin J., Clair M., Kornowski A., Dussaulx E., Dutrillaux B., Zweibaum A.**

Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted HT-29 cells.

J. Cell Biol. 115 (5) : 1409-1418 (1991)

30. **Lesuffleur T., Roche F., Hill A.S., Lacasa M., Fox M., Swallow D.M., Zweibaum A., Real F.X.**

Characterization of a mucin cDNA clone isolated from HT-29 mucus-secreting cells. The 3' end of MUC5AC?

J. Biol. Chem. 270 (23) : 13665-13673 (1995)

31. **Madara J.L., Trier J.S.**

The functional morphology of the mucosa of the small intestine.

In : *Physiology of the gastrointestinal tract. Vol. 2.* Raven Press (New York) Third edition (2202p.) (1994)

32. **Maoret J.J., Font J., Augeron C., Codogno P., Bauvy C., Aubery M., Laboisse C.L.**

A mucus-secreting human cancer cell line.

Biochem. J. 258 : 793-799 (1989)

33. **Meunier V., Bourrié M., Berger Y., Fabre G.**

The human intestinal epithelial cell line Caco-2 ; pharmacological and pharmacokinetic applications.

Cell Biol. and Toxicol. 11 : 187-194 (1995)

34. **Mikogami T., Heyman M., Spik G., Desjeux J.F.**

Apical-to-basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line HT29cl. 19A.

Am. J. Physiol. 267 (Gastrointest. Liver Physiol. 30) : G308-G315 (1994)

35. Murer H., Hopfer U.

The functional polarity of the intestinal epithelial cell : studies with isolated plasma membrane vesicles.

In : *Intestinal permeation. Proceedings of the fourth workshop conference Hoechst. S. Reizensburg.*

19-22, October 1975. Vol. 4. Excerpta medica (Amsterdam-Oxford). 449p. (1977)

36. Phillips T.E., Huet C, Bilbo P.R., Podolsky D.K., Louvard D., Neutra M.R.

Human intestinal goblet cells in monolayer culture : characterization of a mucus-secreting subclone devived from the HT29 colon adenocarcinoma cell line.

Gastroenterology 94 : **1390-1403** (1988)

37. Powell D.W.

Barrier function of epithelia.

Am. J. Physiol. 241 (Gastrointest. Liver Physiol 4) : **G275-G288** (1981)

38. Raeissi S.D., Guo Z., Dobson G.L., Artursson P., Hidalgo I.J.

Comparison of CYP3A activities in a subclone of Caco-2 cells (TC7) and human intestine.

Pharm. Res. 14 (8) : **1019-1025** (1997)

39. Rubas W., Crowmell M.E.M., Shahrokh Z., Villagran J., Nguyen T.N., Wellton M., Nguyen T.H., Mrsny R.J.

Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue.

J. Pharm. Sci. 85 (2) : **165-169** (1996)

40. Specht W.

Morphology of the intestinal wall.

In : *Intestinal permeation. Proceedings of the fourth workshop conference Hoechst.*

S. Reizensburg

19-22, October 1975. Vol. 4. Excerpta medica. 449p. (Amsterdam-Oxford). 449p. (1977)

41. **Stewart B.H., Chan O.H., Lu R.H., Reyner E.L., Schmid H.L., Hamilton H.W., Steinbaugh B.A., Taylor M.D.**

Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple *in vitro* and *in situ* models : Relationship to absorption in humans.

Pharm. Res. 12 (5) : **693-699** (1995)

42. **Thomas C.**

Validation du modèle Caco-2. Rapport de DESS. 85p. (1997)

43. **Walter E., Janich S., Roessler B.J., Hilfinger J.M., Amidon G.L.**

HT-29/Caco-2 cocultures as an *in vitro* model for the intestinal epithelium : *in vitro-in vivo* correlation with permeability data from rats and humans.

J. Am. Sci. 85 (10) : **1070-1076** (1996)

44. **Wikman A., Karlsson J., Carlstedt I., Artursson P.**

A drug absorption model based on the mucus layer producing human intestinal goblet cell line HT29-H.

Pharm. Res. 10 (6) : **843-852** (1993)

45. **Wikman-Larhed A., Artursson P.**

Co-cultures of human intestinal goblet (HT-29H) and absorption (Caco-2) cells for studies of drug and peptide absorption.

Eur. J. Pharm. Sci. 3 : **171-183** (1995)

46. **Wils P., Warnery A., Phung-Ba V., Scherman D.**

Differentiated intestinal epithelial cell lines as *in vitro* models for predicting the intestinal absorption of drugs.

Cell Biol. and Toxicol. 10 : **393-397** (1994)

47. **Winne D.**

The influence of unstirred layers on intestinal absorption.

In : *Intestinal permeation. Proceedings of the fourth workshop conference Hoechst. Vol. 4 Schliss Reisingburg, 19-22 october 1975. Excerpta medica (Amsterdam – Oxford).* 449p. (1977)

48. Yee S.

In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man - Fact or Myth.

Pharm. Res. 14 (6) : 763-766 (1997)

49. Yu H., Cook T.J., Sinko P.J.

Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 monolayers at high passages.

Pharm. Res. 14 (6) : 757-762 (1997)

TABLE DES MATIERES
TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	3
PLAN	6
INTRODUCTION.....	8
TRAVAUX ANTERIEURS.....	10
1. MECANISMES DE L'ABSORPTION INTESTINALE	10
1.1. <u>Structure anatomique de l'intestin</u>	10
1.2. <u>Structure cytologique de la muqueuse intestinale</u>	12
1.3. <u>Mécanismes de passage à travers l'épithélium intestinal</u>	13
1.3.1. <u>Polarisation de l'épithélium intestinal</u>	14
1.3.2. <u>Passage paracellulaire</u>	16
1.3.3. <u>Passage transcellulaire</u>	17
2. METHODES D'ETUDE DE LA RESORPTION INTESTINALE	19
2.1. <u>Intestin isolé et perfusé</u>	19
2.2. <u>Intestins isolés <i>in vitro</i></u>	20
2.3. <u>Vésicules de la membrane de la bordure en brosse</u>	21
2.4. <u>Cultures cellulaires</u>	21
2.4.1. <u>Cellules Caco-2/TC-7</u>	22
2.4.1.1. <u>Aspect morphologique</u>	22
2.4.1.2. <u>Aspect biochimique</u>	23
2.4.2. <u>Cellules HT29-MTX</u>	26
2.4.2.1. <u>Aspect morphologique</u>	26
2.4.2.2. <u>Aspect biochimique</u>	27
2.4.3. <u>Utilisation des cultures cellulaires</u>	28
2.4.3.1. <u>Modèle Caco-2</u>	28
2.4.3.2. <u>Modèles HT29-MTX</u>	30
2.4.4. <u>Coculture de cellules intestinales</u>	31
2.4.4.1. <u>Aspect morphologique</u>	31
2.4.4.2. <u>Perméabilité des cocultures</u>	32
CONCLUSION.....	36
TRAVAUX PERSONNELS	37
1. MATERIEL ET METHODES	38
1.1. <u>Les cellules</u>	38
1.2. <u>Culture cellulaire</u>	38
1.2.1. <u>Entretien des lignées</u>	39
1.2.2. <u>Culture sur filtres</u>	40
1.3. <u>Microscopie électronique</u>	40

1.4. <u>Microscopie optique</u>	41
1.5. <u>Courbe de croissance</u>	41
1.6. <u>Mesure de la résistance transépithéliale</u>	42
1.7. <u>Etudes de perméabilité</u>	43
1.7.1. Molécules	43
1.7.2. Cinétiques de passage	43
1.8. <u>Influence du mucus des cellules HT29-MTX et de la coculture</u>	46
1.9. <u>Statistiques</u>	47
3. RESULTATS	48
2.1. <u>Morphologie et caractéristiques fonctionnelles</u>	48
2.1. 1. <u>Aspect morphologique</u>	48
2.1.1.1. Cellules Caco-2	48
2.1.1.2. Cellules HT29-MTX	50
2.1.1.3. Coculture	51
2.1.2. <u>Croissance cellulaire</u>	54
2.1.3. <u>Evolution de la résistance transépithéliale en fonction du temps</u>	55
2.1.4. <u>Effet du mucus sur la résistance transépithéliale</u>	56
2.2. <u>Etude des perméabilités apparentes sur les trois modèles</u>	57
2.2.1. <u>Passage passif</u>	57
2.2.2. <u>Etudes de sécrétion</u>	59
2.2.3. <u>Effet du mucus sur la perméabilité des cellules HT29-MTX</u>	61
3. DISCUSSION	63
3.1. <u>Morphologie et caractéristiques fonctionnelles</u>	64
3.2. <u>Etudes de perméabilités</u>	66
3.2.1. <u>Comparaison des modèles</u>	66
3.2.2. <u>Rôle du mucus</u>	70
3.2.3. <u>Prédiction de l'absorption chez l'Homme</u>	72
CONCLUSION	80
ANNEXES	82
ANNEXE I : STRUCTURE DES MOLECULES	83
ANNEXE II : REFERENCE DES PRODUITS	88
ANNEXE III : LISTE DES ABREVIATIONS	89
REFERENCES	90

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Transporteurs de la bordure en brosse des entérocytes	14
<u>Tableau II</u> : Evolution de la maturité des jonctions serrées et de la membrane cellulaire des cellules Caco-2 parentales en fonction du temps de culture	23
<u>Tableau III</u> : Activité des principaux systèmes enzymatiques de la membrane apicale des entérocytes sains, des cellules Caco-2 et HT-29MTX.....	24
<u>Tableau IV</u> : Différenciation des cellules HT-29 en fonction du milieu de culture	26
<u>Tableau V</u> : Perméabilités apparentes de molécules de référence sur cellules Caco-2. Comparaison des données de la littérature.....	29
<u>Tableau VI</u> : Relation absorption in vivo-perméabilité sur cellules Caco-2	30
<u>Tableau VII</u> : Classification des molécules en fonction de leur perméabilité sur coculture	35
<u>Tableau VIII</u> : Composition des milieux de culture sur flacon	39
<u>Tableau IX</u> : Composition des milieux de culture sur filtres.....	40
<u>Tableau X</u> : Préparation des solutions de travail	43
<u>Tableau XI</u> : Dimensions des cellules Caco-2 (21 jours de culture)	48
<u>Tableau XII</u> : Valeurs moyennes des TEER des trois modèles à maturité.....	55
<u>Tableau XIII</u> : Perméabilités apparentes déterminées sur les trois modèles pour les molécules diffusant passivement	58
<u>Tableau XIV</u> : Perméabilités apparentes à la cimétidine et à la phénylalanine dans le sens de l'absorption et de la sécrétion	60
<u>Tableau XV</u> : Paramètres A et B de la régression non linéaire pour les modèles Caco-2, HT29-MTX et coculture	73
<u>Tableau XVI</u> : Classification des molécules en terme de perméabilité apparente sur les modèles Caco-2, HT29-MTX et coculture	75

FIGURES

<u>Figure 1</u> : Structure de l'intestin.....	11
<u>Figure 2</u> : Mécanismes de transports à travers les entérocytes.....	13
<u>Figure 3</u> : Résistance à la diffusion à travers l'épithélium intestinal	15
<u>Figure 4</u> : Activités des principales enzymes de la bordure en brosse des cellules Caco-2 et HT29-MTX, d'après BOULENC	25
<u>Figure 5</u> : Evolution de la TEER des cocultures en fonction de la quantité de HT29 et en fonction du temps, d'après Walter.....	33
<u>Figure 6</u> : Perméabilité des trois modèles à différents polyéthylène glycol, d'après Wikman-Larhed	34
<u>Figure 7</u> : Perméabilité des cellules Caco-2, HT29-H et cocultures à des molécules hydrophiles, d'après Wikman-Larhed.....	34
<u>Figure 8</u> : Schéma simplifié du principe du voltohmmètre.	42
<u>Figure 9</u> : Cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours sur filtres de polycarbonate. Image en microscopie électronique à balayage.	49
<u>Figure 10</u> : Image de cellules Caco-2 en microscopie électronique à transmission	49

<u>Figure 11</u> : Cellules HT29-MTX observées en microscopie électronique à balayage après 21 jours de culture.....	50
<u>Figure 12</u> : Observation des cellules HT29-MTX en fonction de leur âge après coloration des mucopolysaccharides par réaction à l'APS)	52
<u>Figure 13</u> : Coculture observée en microscopie électronique à balayage.....	53
<u>Figure 14</u> : Croissance des cellules des trois modèles en fonction du temps de culture	54
<u>Figure 15</u> : Evolution de la résistance transépithéliale (TEER) des trois modèles cultivés sur filtres de polycarbonate	55
<u>Figure 16</u> : Effet du mucus sur la résistance transépithéliale des cellules HT29-MTX et de la coculture	56
<u>Figure 17</u> : Structure moléculaire de l'inuline et de la méthoxy-inuline.....	59
<u>Figure 18</u> : Effet du sens de passage et de la concentration en cimétidine sur la perméabilité apparente sur modèle Caco-2.....	60
<u>Figure 19</u> : Effet du sens de passage sur la perméabilité des trois modèles à la cimétidine (concentration traceuse).....	61
<u>Figure 20</u> : Effet du mucus sur la perméabilité des cellules HT29-MTX et Caco-2.....	62
<u>Figure 21</u> : Corrélations linéaires entre les modèles Caco-2, HT29-MTX et coculture	68
<u>Figure 22</u> : Corrélations Caco-2-Fraction absorbée chez l'Homme	73
<u>Figure 23</u> : Corrélations HT29-MTX- Fraction absorbée chez l'Homme	74
<u>Figure 24</u> : Corrélations Coculture-Fraction absorbée chez l'Homme	74
<u>Figure 25</u> : Corrélations obtenues pour les trois modèles	75
<u>Figure 26</u> : Classification des molécules sur les trois modèles	76
<u>Figure 27</u> : Coculture. Comparaison avec les données de la littérature	79

BON A IMPRIMER N° 17

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

UNIVERSITAIRE DE LIMOGES
Pharmacie
and

381006126

651

12/10/98

15 jours DES RÉCEPTION

on à l'intérieur de l'ouvrage. Merci.

RESUME

Les cellules Caco-2 se différencient en entérocytes et sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour appréhender l'absorption intestinale des molécules. L'absence de mucus dans ce modèle peut représenter une limite dans la mesure où il a été suggéré que le mucus de nature intestinale constitue une barrière à la diffusion des molécules lipophiles à travers l'épithélium intestinal. Un système de coculture, composé à la fois de cellules ayant des propriétés d'absorption (cellules Caco-2) et de cellules productrices de mucus (cellules HT29-MTX), a été étudié et comparé à chacune des lignées constituantes. L'étude a porté sur les caractéristiques morphologiques des modèles et sur la perméabilité des trois modèles à 19 molécules de référence. L'influence du mucus sur la résistance transépithéliale et sur la perméabilité de deux molécules (mannitol et testostérone) a également été analysée. La coculture obtenue, préparée avec 50% de cellules Caco-2/TC7 et 50% de cellules HT29-MTX, forme une monocouche de cellules différenciées présentant des plages d'entérocytes et de cellules caliciformes. Pour les trois modèles, Caco-2, HT29-MTX et coculture, trois classes de molécules ont pu être distinguées en fonction de leur perméabilité sur chaque modèle : faiblement résorbées (<20%), moyennement résorbées (20-90%) et fortement résorbées (>90%). Le modèle Caco-2 permet une meilleure prédiction de l'absorption que les modèles HT29-MTX et coculture. Le mucus produit par les cellules HT29-MTX ne constitue pas une barrière à la diffusion des molécules lipophiles, mais semble diminuer la perméabilité aux molécules chargées positivement au pH intestinal. Le modèle HT29-MTX pourrait présenter un intérêt particulier dans l'optimisation d'une série de molécules prises en charge par des systèmes d'efflux surexprimés sur cellules Caco-2.

MOTS-CLES

Caco-2, HT29-MTX, coculture, absorption intestinale, corrélation in vitro-in vivo, mucus

JURY

Présidente Madame le Professeur Dominique CHULIA
Juges Monsieur le Professeur Philippe ARNAUD
Monsieur le Professeur Claude BROSSARD
Madame Martine LARTIGUE
Monsieur Jean PACHOT