

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE 2002

SCD UNIV.LIMOGES.



D 065 089909 3

THESE N° 325/1

Métabolisme des xénobiotiques,
modèles *in vitro* et outils analytiques :
application à l'étude du métabolisme de l'acide mycophénolique

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 16 septembre 2002

PAR

Nicolas PICARD

Né le 4 novembre 1977 à Bois Guillaume (Seine-Maritime)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur Gérard Lachâtre – Président

Monsieur le Professeur Pierre Marquet – Juge

Madame le Docteur Annick Rousseau – Juge

Monsieur le Docteur Thierry Cresteil – Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE: Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESEURS Madame le Professeur **CHULIA** Dominique
Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOU Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE- PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACIE GALENIQUE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACIE GALENIQUE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame **ROCHE** Doriane

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
ROUSSEAU Annick	PHYSIQUE-INFORMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
VIGNOLES Philippe	INFORMATIQUE

ASSISTANT

FAURE Monique

PHARMACIE GALENIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel

ANGLAIS

ATER

CALLISTE Claude

BIOPHYSIQUE

MARFAK Abdelghafour

BIOPHYSIQUE

POUGET Christelle

CHIMIE THERAPEUTIQUE

RIAH DEHKORDI Homayoun

PHYSIOLOGIE-PARASITOLOGIE

TALLET Dominique

PHARMACOLOGIE

A mes parents,

En témoignage de mon amour et de ma reconnaissance.

A Marianne,

*Qui m'a guidé et soutenu, me permettant de réaliser
l'un de mes rêves*

A ma sœur,

A ma famille et à celle de Marianne

Remerciements

A notre Président de Jury,

Monsieur le Professeur Gérard Lachâtre,

Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Limoges, Chef du service de Pharmacologie et Toxicologie du C.H.U. de Limoges.

Nous vous remercions de nous avoir permis d'effectuer notre stage de DEA au sein du service de Pharmacologie et Toxicologie.

Nous sommes très honorés de votre présence dans notre jury de thèse.

Qu'il nous soit permis de vous témoigner ici notre reconnaissance.

A nos Juges,

Monsieur le Professeur Pierre Marquet,

Professeur de Pharmacologie à la Faculté de Médecine de Limoges. Responsable de l'unité de pharmacologie biologique et pharmacocinétique du service de Pharmacologie et Toxicologie du C.H.U. de Limoges.

Nous vous remercions très sincèrement de nous avoir confié ce sujet passionnant, pour l'encadrement constant et de grande qualité. Vous nous avez initié à des techniques d'exception et nous avez accordé votre confiance.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer ici notre profonde gratitude.

Madame le Docteur Annick Rousseau,

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Limoges. Attaché du service de Pharmacologie et Toxicologie du C.H.U de Limoges.

Nous vous remercions de votre présence dans ce Jury, nous avons apprécié vos conseils et vos encouragements dans la réalisation de ce travail.

Monsieur le Docteur Thierry Cresteil,

Directeur de recherche CNRS, ICSN Gif-sur-Yvette.

Nous vous remercions de votre collaboration à ce travail. Nous sommes très sensibles à la présence d'un scientifique de votre compétence dans notre jury de thèse.

Je tiens également à remercier le Dr Damrong Ratanasavangh et Madame Dominique Riché du service de Pharmacologie du C.H.U. de Brest et le Dr Valérie Furlan du service de Pharmacie-toxicologie du C.H.U. du Kremlin-Bicêtre, pour leur accueil chaleureux et pour le temps consacré à ma formation aux techniques d'études *in vitro* du métabolisme.

Merci enfin à tous les membres du service de Pharmacologie et Toxicologie du C.H.U. de Limoges et en particulier à Monsieur Hervé Sayer, Madame Laure Larchet, Monsieur Jean-Louis Dupuy et Monsieur Jean-Hervé Comte pour tous leurs précieux conseils.

PLAN

Introduction

PREMIERE PARTIE :

Métabolisme des xenobiotiques : modèles d'étude *in vitro* et outils analytiques

- I. PHASES DE BIOTRANSFORMATION
- II. LES URIDINES DIPHOSPHO-GLUCURONOSYL TRANSFERASES
- III. LES ENZYMES DU CYP 450
- IV. ETUDES DES REACTIONS DE BIOTRANSFORMATION IN VITRO
- V. ETUDE DU METABOLISME DES XENOBIOTIQUES : OUTILS ANALYTIQUES

DEUXIEME PARTIE :

Etude *in vitro* et *in vivo* du métabolisme de l'acide mycophénolique chez l'homme

- I. INTRODUCTION
- II. MATERIEL ET METHODE
- III. RESULTATS
- IV. DISCUSSION
- V. PERSPECTIVES

Références bibliographiques

Tables des matières

Tables des illustrations

Liste des abréviations

AMP	acide mycophénolique
AMPG	AMP-phényl-glucuronate
AMPGI	AMP-phényl-glucoside
AMPaG	AMP-acyl-glucuronate
AMPaGI	AMP-acyl-glucoside
ASC	Aire sous la courbe
CYP 450	cytochrome P 450
DTT	dithiothréitol
IMPDH	inosine monophosphate déshydrogénase
UGT (UDPGT)	uridine diphospho-glucuronosyl transférases
UDP-AG	acide uridine diphospho-glucuronique (acide UDP-glucuronique)
LC-MS/MS	chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem
MMF	mycophénolate mofétil
MRM	multiple reaction monitoring
RMN	résonance magnétique nucléaire

Introduction

La susceptibilité de l'homme aux xénobiotiques (polluants, composés alimentaires, médicaments) est liée en partie aux phénomènes de biotransformation de ces xénobiotiques dans l'organisme. Le métabolisme est considéré classiquement comme une voie de détoxification, il peut cependant aboutir à des composés actifs et/ou toxiques. Les différences d'expression ou d'activité des enzymes du métabolisme, liées entre autres à des facteurs génétiques, environnementaux ou physiopathologiques rendent compte d'une grande variabilité interindividuelle dans la réponse pharmacologique ou toxique aux xénobiotiques.

Dans ce contexte, la connaissance des voies de biotransformation apparaît comme un enjeu important. Les études de métabolisme peuvent permettre d'identifier des métabolites actifs ou toxiques, de prédire et d'élucider des mécanismes d'interactions médicamenteuses.

Dans ce domaine, les études *in vivo*, sont difficilement envisageables sans avoir recours au préalable à un certain nombre de techniques *in vitro*. Ces modèles d'étude *in vitro* (cultures cellulaires, microsomes ou enzymes recombinantes), le plus souvent d'origine hépatique, permettent l'identification et la caractérisation des voies enzymatiques et sont particulièrement adaptés à l'étude d'interactions médicamenteuses. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), permettant une étude à la fois qualitative (identification structurale) et quantitative (étude de cinétique) s'impose comme technique de référence dans ces études de métabolisme (Debrauwer, 2000).

Le mycophénolate mofétil (MMF) est un immunosuppresseur efficace dans la prévention et le traitement des rejets de greffe rénale, cardiaque ou hépatique, en association avec d'autres agents immunosuppresseurs. Des interactions médicamenteuses pharmacocinétiques de mécanismes imparfaitement connus ont été rapportées. Une connaissance plus approfondie de son métabolisme pourrait permettre de comprendre les voies impliquées, et éventuellement de prédire d'autres interactions.

PREMIERE PARTIE :
Métabolisme des xenobiotiques : modèles d'étude *in vitro*
et outils analytiques

I. PHASES DE BIOTRANSFORMATION

Les xénobiotiques subissent un certain nombre de modifications chimiques dans l'organisme, visant dans la plupart des cas à augmenter leur caractère hydrophile, facilitant ainsi leur élimination. Ces réactions de biotransformation aboutissent classiquement à une diminution de la toxicité et de l'activité, mais il est possible dans certains cas de former des composés plus actifs ou toxiques.

Le métabolisme des xénobiotiques suit classiquement plusieurs étapes (Fig. 1).

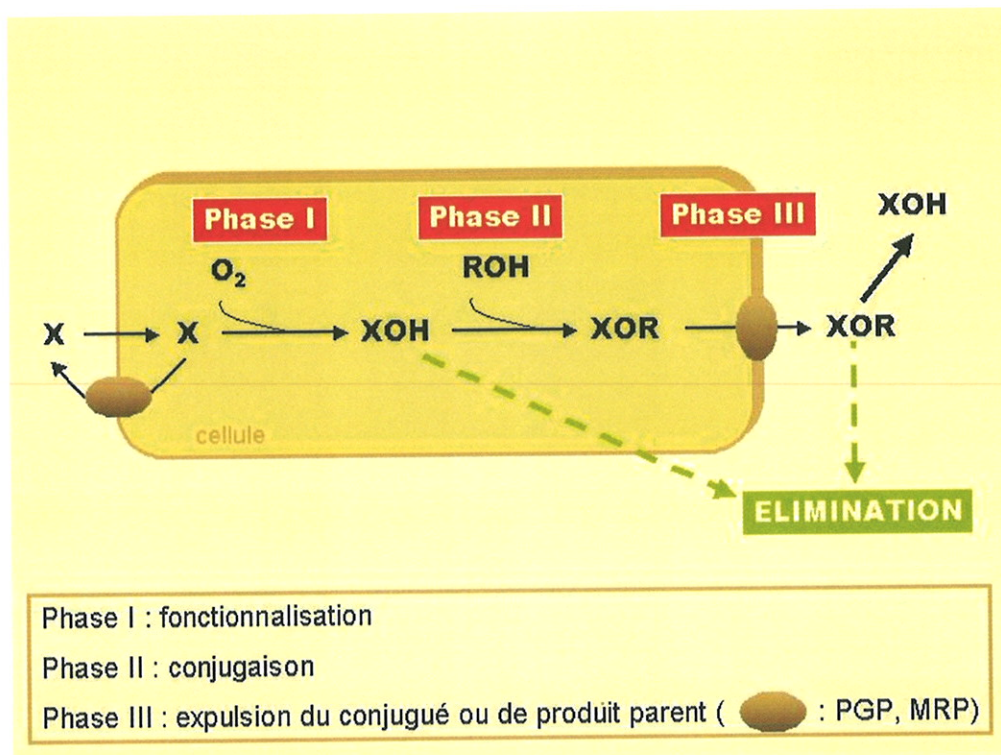


Figure 1 : phases de biotransformations des xénobiotiques (d'après Beaune et col., 2000)

Les enzymes les plus importantes impliquées dans le métabolisme de phase I sont représentées par le système des mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP 450). Il s'agit d'un système multi-enzymatique dont les isoformes, localisées dans le réticulum endoplasmique, catalysent plusieurs types de réaction dites de fonctionnalisation. Chez l'homme, il existe trois familles majeures de CYP 450 (CYP 1, CYP 2, CYP 3).

Les enzymes de phase II conjuguent les xénobiotiques, fonctionnalisés ou non, avec un groupement de nature variable (acide glucuronique, glutathion, résidu méthyle ou acétyle...). Le rôle de ces enzymes est de neutraliser un groupement réactif (thiol, amine, aldéhyde) tout en augmentant le caractère hydrophile du composé, ceci facilitant l'élimination du métabolite de l'organisme. La glucuroconjugaison et la sulfoconjugaison sont les principales réactions de phase II.

Si le métabolite est très hydrophile, il devra être transporté à travers la membrane par des protéines de phase III ou protéines d'efflux. Les protéines de phase III sont nombreuses, les principaux représentants étant la P-glycoprotéine (P-gp) ou glycoprotéine de perméabilité membranaire et les protéines MRP (multidrug resistance protein) impliquées dans certains mécanismes de résistance aux médicaments (Tableau 1).

Tableau 1 : principaux transporteurs d'efflux et médicaments concernés

<i>TRANSPORTEURS D'EFFLUX</i>	<i>MEDICAMENTS</i>
P-glycoprotéine	nombreux
Protéines MRP	
MRP 1	Nombreux anti-cancéreux
MRP 2	Glucuronates et glutathion-conjugués
MRP 3	Composés anioniques
MRP 4,5,6	Cisplatine

Le métabolite pourra ainsi être éliminé dans la bile ou les urines, mais il peut également, après transport dans le sang ou la bile être métabolisé de nouveau dans d'autres tissus possédant une autre catégorie d'enzymes du métabolisme (phase IV).

II. LES URIDINES DIPHOSPHO-GLUCURONOSYL TRANSFERASES

Les uridines diphospho-glucuronosyl transférase (UGT) représentent une famille multigénique d'enzymes intégrées à la membrane du réticulum endoplasmique. Elles permettent le transfert d'un groupement glucuronosyle à des molécules substrats endogènes ou exogènes (bilirubine, hormones stéroïdiennes, médicaments).

Un grand nombre de fonctions chimiques peuvent jouer le rôle de substrats (Fig. 2).

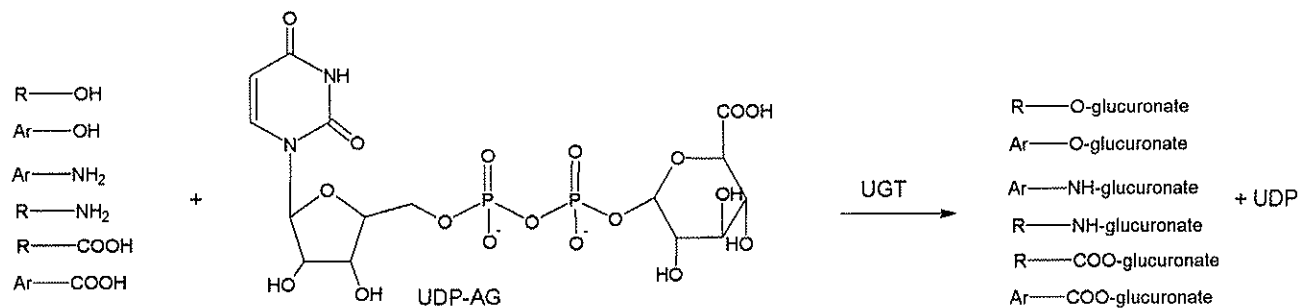


Figure 2 : schéma de la réaction de glucuroconjugaison (R : groupe alkyle ; Ar : groupe Aryle ; UDP-AG : acide uridine-5'-diphospho-αD-glucuronique)

La glucuro-conjugaison est souvent considérée comme un mécanisme de détoxification car : elle augmente le caractère hydrosoluble de la molécule facilitant son excrétion urinaire, et/ou elle réduit la distribution du composé vers sa cible en ralentissant voire empêchant son transfert passif à travers les membranes cellulaires. Cependant, dans certains cas la glucuro-conjugaison peut aboutir à une augmentation de l'activité biologique de la molécule et/ou à l'apparition de métabolites toxiques. Les acyl-glucuronates seraient notamment associés à des réactions immunoallergiques et toxiques (Ritter, 2000).

L'analyse de l'homologie des séquences en acides aminés permet de regrouper les UGT en deux familles (UGT 1 et UGT 2). Les UGT 1 ont moins de 45 % d'homologie avec les UGT 2. La famille des UGT 2 présente deux sous-familles 2A et 2B. Les UGT 1 ne comptent qu'une sous-famille 1A. Les UGT d'une même sous-famille ont plus de 60% d'homologie.

La famille des UGT 1 compte 9 isoformes dans l'espèce humaine (UGT 1A1, UGT 1A3-1A10) et 7 chez le rat (UGT 1A1-UGT1A3, UGT1A5-UGT1A8). La famille des UGT 2 est représentée par 6 iso-enzymes chez l'homme (UGT 2B4, UGT 2B7, UGT 2B10, UGT 2B11, UGT 2B15 et UGT 2B17) et 7 chez le rat (UGT 2A1, UGT 2B1, UGT 2B2, UGT 2B3, UGT 2B6, UGT 2B8, et UGT 2B12).

II.1. Localisation tissulaire des UDP-glucuronosyltransférases

Chez l'homme, le foie est qualitativement et quantitativement l'organe le plus important de glucuro-conjugaison, mais les UGT s'expriment dans de nombreux tissus extra-hépatiques (reins, poumons, tractus gastro-intestinal, prostate, rate, peau, cerveau ...) (tableau 2). Certaines isoformes sont quasi-ubiquitaires (UGT 1A6), d'autres spécifiques de certains tissus (UGT 1A7 et 1A10 intestinales) (Radomska-Pandya et col., 1999).

La contribution extra-hépatique de la glucuro-conjugaison est généralement minoritaire par rapport à celle d'origine hépatique mais peut jouer un rôle biologique spécifique.

II.2. Structure des gènes et polymorphismes génétiques

Les UGT 1 humaines dérivent d'un seul et même gène, complexe, situé sur le chromosome 2 au locus 2q.37. Ce gène est formé d'un exon 1 et de 4 exons communs (exons 2 à 5) codant pour une partie carboxyle terminale commune aux UGT 1. La nature de l'exon 1 est différente pour chaque isoforme d'UGT 1 (il existe 13 formes d'exon 1) (Fig.3).

Les UGT 2 sont codées par différents gènes du chromosome 4 (locus 4q.13).

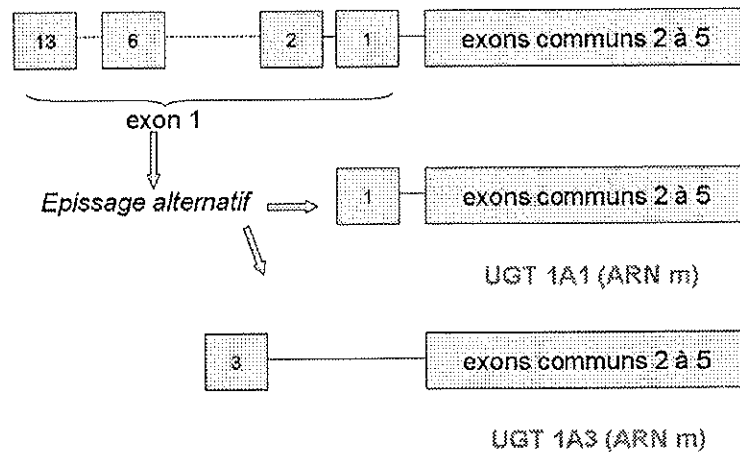


Figure 3 : structure du gène des UGT 1 : obtention des isoformes par épissage alternatif (D'après de Wildt et col., 1999)

A l'heure actuelle, les seuls polymorphismes génétiques démontrés pour les UGT concernent la glucuro-conjugaison de la bilirubine (syndrome de Gilbert, maladie de Crigler-Najjar). Des mutations ont été observées dans les gènes des UGT 1 et UGT 2, mais l'absence de substrats totalement spécifiques d'iso-UGT ne permet pas d'en évaluer les conséquences (de Wildt et col., 1999).

II.3. Variations de l'activité des UDP-glucuronosyltransférases et inductibilité

Hormis le déficit fœtal existant pour certaines isoformes d'UGT, il n'y a pas de modification d'expression des UGT en fonction de l'âge si l'état physiologique et anatomique reste normal. En revanche, il existe une différence d'activité des UGT en fonction du sexe des individus. Les microsomes d'individus mâles présentent une activité de glucuro-conjugaison des xénobiotiques très supérieure aux microsomes d'individus femelles, sauf dans le cas de la conjugaison d'hormones stéroïdiennes (métabolisme de l'œstradiol et de l'œstrone) (Catania et col., 1995 ; Strasser et col., 1997). Cette différence semble provenir d'une quantité plus importante d'UGT chez l'homme, mais il est probable qu'une régulation hormonale sexuelle des UGT intervienne. Une récente étude (Morissette et col., 2001), retrouve une activité de conjugaison de l'AMP plus importante chez l'homme que chez la femme. Les auteurs avancent l'hypothèse d'une compétition entre œstrogènes et AMP pour les UGT du groupe 1A (enzymes métabolisant les œstrogènes et

possiblement l'AMP : UGT 1A1, 1A3, 1A8, 1A10) qui entraînerait une diminution de la conjugaison de l'AMP. Enfin d'autres facteurs de variations d'activité des UGT ont été rapportés (nutritionnels, environnementaux, inter-ethniques...).

Parmi les inducteurs chimiques connus des UGT, le 3-méthylcholanthrène est rapporté comme induisant l'UGT 1A1 humaine et les UGT 1A6 et 1A7 chez le rat. Le phénobarbital est connu comme inducteur des isoformes 1A1 chez l'homme et 1A1 et 2B1 chez le rat. D'autres inducteurs sont connus : le clofibrate induit l'UGT 1A5 chez le rat, la dexaméthasone induit les UGT 1A2 et 1A1 chez le rat. (Ritter, 2000).

II.4. Spécificité de substrats des UDP-glucuronosyltransférases

Les substrats des UGT 1A5, 2B10 et 2B11 n'ont pas été identifiés à ce jour (Radomska-Pandya et col., 1999). Pour les autres UGT, aucun substrat totalement spécifique n'est connu, un substrat pouvant classiquement être pris en charge par plusieurs isoformes.

Les principaux substrats des différentes isoformes d'UGT humaines figurent au tableau 2.

Tableau 2 : principaux substrats et localisation des différentes isoformes d'UGT humaines (Radominska-pandya et col., 1999)

<i>Iso-enzyme</i>	<i>localisation</i>	<i>Principaux substrats endogènes</i>	<i>Principaux xénobiotiques substrats</i>
UGT 1A1	Foie/vésicule biliaire/intestin	bilirubine, estriol, β-estradiol, 2-OH-estriol, 2-OH-estrone, 2-OH-estradiol	morphine
UGT 1A3	Foie/vésicule biliaire	2-OH-estrone, 2-OH-estradiol, estrone, 5,6-epoxy-ARt†*, 4-OH-ARt††, acide lithocholique	Kétoprofène, ibuprofène, naproxène, ciprofibrate, clofibrate, acide valproïque, morphine
UGT 1A4	Foie/vésicule biliaire/intestin	androstérone, épiandrostérone	amitriptyline, imipramine, clozapine
UGT 1A5	inconnu	inconnu	inconnu
UGT 1A6	Foie/vésicule biliaire/intestin/estomac	inconnu	naproxène, paracétamol
UGT 1A7	Estomac/intestin	inconnu	inconnu
UGT 1A8	Intestin	estrone, dihydrotestostérone, 2-OH-estrone, 4-OH-estrone, 2-OH-estradiol, 4-OH-estradiol	morphine, ciprofibrate, clofibrate, valproate, furosémide
UGT 1A9	Foie	Thyroxine, triiodothyronine	fénoprofène, furosémide, acide rétinolique, acide méfénamique, paracétamol
UGT 1A10	Vésicule biliaire/intestin/estomac	2-OH-estrone, 4-OH-estrone, dihydrotestostérone	inconnu
UGT 2B4	Foie	androstérone, acide hydeoxycholique	inconnu
UGT 2B7	Foie/intestin/reins	4-OH-estrone, 4-OH-estradiol, androstérone, epitesterone, acide hydeoxycholique, acide linoléique	AINS, acide clofibrrique, acide valproïque, morphine, naloxone, codéine, buprénorphine
UGT 2B10	Foie	inconnu	inconnu
UGT 2B11	Prostate/foie/reins/glandes mammaires/peau/poumons	inconnu	inconnu
UGT2B15	Foie/prostate/peau	dihydrotestostérone	inconnu
UGT 2B17	Prostate	testostérone, dihydrotestostérone, étiocholanone, androstérone	inconnu

* : ARt† : acide rétinolique tout trans

II.5. Réactions de bio-activation par glucuro-conjugaison

Les principales réactions de bioactivation par les UDP-glucuronosyltransférases sont celles qui conduisent à la formation d'acyl-glucuronates par estérification d'acides carboxyliques avec l'acide glucuronique. L'incidence et la fréquence de telles réactions sont liées au grand nombre de médicaments à fonction acide et au rôle important de la glucuroconjugaison dans leur élimination.

Les acides carboxyliques sont représentés dans de nombreuses classes thérapeutiques : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les hypolipémiants (clofibrate), les anti-convulsivants (acide valproïque, barbituriques). Il existe également des composés endogènes à fonction acide carboxylique, notamment la bilirubine et l'acide rétinolique.

La réactivité des acyl-glucuronates est liée au caractère électrophile du groupe carbonyle. Cette réactivité est tout d'abord à l'origine d'une instabilité importante avec un hydrolyse facilitée, entraînant la libération de la molécule et une augmentation de la demi-vie du médicament.

Les acyl-glucuronates peuvent également donner lieu à des mécanismes de réactivité intramoléculaire avec notamment la réaction de migration intramoléculaire du groupe acyle au cours de laquelle celui-ci se déplace de sa position initiale en C1 sur l'acide glucuronique aux positions C2, C3 puis C4 (Fig.4).

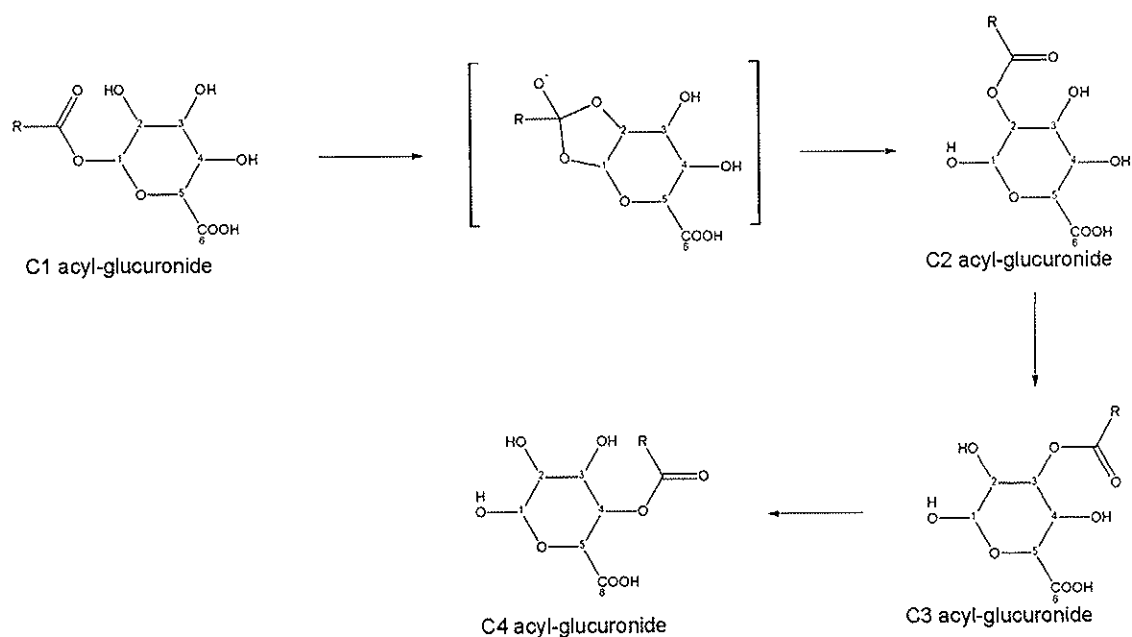


Figure 4 : schéma de la réaction de migration intramoléculaire du groupe acyle des acyl-glucuronates

Deux autres types de réaction intramoléculaire ont été décrites : la transacylation et la glycation (Ritter, 2000). Dans la réaction de transacylation, les acyl-glucuronides réagissent directement avec les protéines, le résidu glucuronique se détache et seul le groupe aglycone forme l'adduit. Dans la réaction de glycation les deux groupes se fixent sur la protéine en faisant intervenir les produits de migration du groupe acyle. Le résidu glucuronique de ces composés s'ouvre pour donner des intermédiaires aldéhydiques très réactifs qui peuvent se fixer sur les groupes amines de protéines ou d'ADN.

Les AINS et d'autres médicaments sont associés à plusieurs types d'effets secondaires de type cytotoxique (hépatotoxicité, néphrotoxicité), carcinogène ou immuno-allergique. Les acyl-glucuronates sont supposés impliqués dans ces effets secondaires par leur réactivité électrophile avec des macromolécules cellulaires (protéines, ADN).

La bio-activation par glucuro-conjugaison peut également se traduire par une augmentation des propriétés pharmacologiques. La morphine-6-O-glucuronate est un exemple bien connu de glucuronate possédant une activité pharmacologique supérieure à la morphine elle-même.

Les glucuronates des rétinoïdes (acide tout-*trans*-rétinoïque, tout-*trans*-rétinol) sont également un exemple intéressant. Ces glucuronates sont retrouvés dans le plasma avec une concentration supérieure aux formes non conjuguées et leur activité apparaît au moins similaire sinon supérieure à celle des composés non conjugués.

III. LES ENZYMES DU CYP 450

Le terme de cytochrome P450 se réfère à un groupe d'enzymes membranaires localisé dans le réticulum endoplasmique. Les enzymes du cytochrome P450 sont associées à une seconde protéine : la NADPH-cytochrome P 450 réductase. Les CYP 450 catalysent une grande variété de réactions d'oxydation (tableau 3).

Les enzymes du CYP 450 s'expriment dans de nombreux tissus, mais sont majoritairement représentées au niveau hépatique.

Tableau 3 : Réactions catalysées par les enzymes du CYP 450 et exemple de substrats (d'après Hardman et Limbird, 1998)

Réaction	Mécanisme	Exemples
Hydroxylation aromatique		phénytoïne, phénobarbital, propranolol
Hydroxylation aliphatique	$\text{R}-\text{CH}_2\text{CH}_3 \xrightarrow{+\text{O}} \text{R}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_3$	tolbutamide, ibuprofène, pentobarbital
N-desalkylation	$\text{R}-\text{NH}-\text{CH}_3 \xrightarrow{+\text{O}} \text{R}-\text{NH}_2 + \text{CH}_2\text{O}$	imipramine, diazépam, codéine
O-desalkylation	$\text{R}-\text{O}-\text{CH}_3 \xrightarrow{+\text{O}} \text{R}-\text{OH} + \text{CH}_2\text{O}$	codéine, indométhacine
N-oxydation	$\text{R}-\text{NH}_2 \xrightarrow{+\text{O}} \text{R}-\text{NH}-\text{OH}$	chlorphéniramine
S-oxydation		quinidine
Désamination	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \xrightarrow{+\text{O}} \text{R}-\text{CHO} + \text{NH}_3$	diazépam, amphétamines

III.1. Les isoformes de CYP 450

Il existe de nombreuses isoformes de CYP 450, chacune étant le produit d'un gène particulier. Ces isoformes sont classées en fonction de leur similarité de séquence en acides aminés (Nelson et col., 1996). Cette classification permet de distinguer :

- Les familles :

Les isoformes d'une même famille ont au moins 40 % d'homologie.

Sur environ 74 familles de CYP 450, 17 sont retrouvées chez l'homme.

Les familles sont repérées par un chiffre arabe : CYP 2 ; CYP 3.

- Les sous-familles :

Pour appartenir à la même sous-famille, les isoformes doivent avoir au moins 55 % d'homologie. 30 sous-familles ont été caractérisées chez l'homme.

Les sous-familles sont identifiées par une lettre majuscule : CYP 3A ...

- Les isoformes, identifiées par un second chiffre arabe: CYP 3A4.

Il y a plus de 30 iso-enzymes de CYP 450 identifiées chez l'homme, parmi elles certaines ont un rôle prépondérant dans le métabolisme des médicaments et dans la survenue d'interactions médicamenteuses : les CYP 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 (Spatzenegger et Jaeger, 1995). L'importance relative de ces isoformes est liée en partie à leur abondance et à leur capacité à métaboliser des structures chimiques retrouvées fréquemment (Le CYP 2D6 métabolise préférentiellement les structures à fonction amine) .

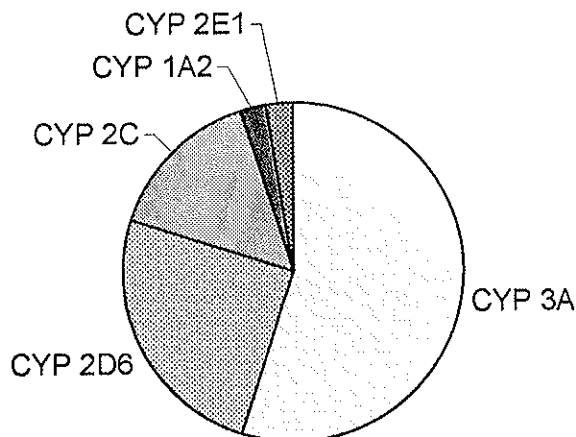


Figure 5 : proportion des médicaments métabolisés par les principales enzymes du CYP 450, un même médicament pouvant être inclus dans plus d'une catégorie. (Hardman et Limbird, 1998)

III.2. Polymorphisme des CYP 450

Les différences génétiques dans la capacité des individus à métaboliser un médicament par la voie des CYP 450 sont considérées comme un facteur explicatif important des différences inter-individuelles de biotransformation au sein d'une population. Il peut s'agir d'une déficience en une enzyme spécifique (CYP 2C19 ou CYP 2D6 par exemple) ou d'une modification de la séquence d'acide aminé de la protéine enzymatique avec une activité conservée mais avec des paramètres cinétiques modifiés (exemple du CYP 2C9).

Les différences phénotypiques dans la quantité de médicament éliminée selon une voie contrôlée par un polymorphisme aboutissent à la classification des individus en bons métaboliseurs (rapides), métaboliseurs lents, ou ultrarapides.

III.3. CYP 450 et P-glycoprotéine

La protéine d'efflux P-gp est souvent associée à la présence de cytochrome P 450 et plus particulièrement du CYP 3A4. Cette association présente un intérêt stratégique pour l'élimination des xénobiotiques, grâce à une action complémentaire, la P-gp éliminant les composés non métabolisés par le CYP 450. Cette association P-gp – CYP 450 contribue à

l'élimination d'un grand nombre de médicaments : les inhibiteurs des canaux calciques, la ciclosporine, des macrolides ...

III.4. Interactions médicamenteuses et CYP 450

Les interactions médicamenteuses impliquant les enzymes du CYP 450 résultent soit d'une inhibition soit d'une induction enzymatique.

L'inhibition enzymatique fait intervenir le plus souvent une compétition avec un autre médicament pour la liaison au site enzymatique (inhibition compétitive), dépendant des concentrations relatives des médicaments et de l'affinité des enzymes concernées. Elle entraîne une élévation du taux de la molécule mère, avec des effets pharmacologiques prolongés et une incidence accrue de la toxicité médicamenteuse. D'autres mécanismes d'inhibition enzymatique existent : les inhibitions non compétitives, dans ce cas le second médicament n'est pas substrat de l'enzyme mais se fixe de façon irréversible ou quasi irréversible au site enzymatique empêchant l'accès du substrat.

L'induction enzymatique intervient lorsque un produit stimule la synthèse ou ralentit la destruction de la protéine enzymatique. Dans certains cas, un composé peut induire à la fois la biotransformation d'autres composés et son propre métabolisme, c'est le cas par exemple de la carbamazépine.

Les inducteurs sont généralement spécifiques d'une famille de CYP 450, mais des substances de structure variée peuvent avoir des effets similaires.

Tableau 4 : exemples d'inducteurs et d'inhibiteurs des principales isoformes de CYP 450

<i>Isoformes de CYP 450</i>	<i>Inducteurs</i>	<i>Inhibiteurs</i>
CYP 3A4	carbamazépine dexaméthasone phénobarbital phénytoïne rifampicine	Antidépresseurs (fluvoxamine > fluoxétine > sertraline) antifongiques azolés (kétoconazole > itraconazole > fluconazole) cimétidine clarithromycine diltiazem érythromycine Inhibiteurs des protéases
CYP 2E1	éthanol isoniazide	disulfiram
CYP 2B6	phénobarbital	thiotépa
CYP 1A2	fumée de cigarette dioxine	fluvoxamine
CYP 2D6	dexaméthasone	quinidine

IV. ETUDES DES REACTIONS DE BIOTRANSFORMATION IN VITRO

Les techniques *in vitro* ont une place importante dans l'étude de la biotransformation des xénobiotiques. Ces modèles permettent l'identification des voies de biotransformation, leur caractérisation (calcul des paramètres cinétiques des enzymes étudiées) et éventuellement l'étude d'interactions médicamenteuses potentielles. Les modèles utilisés sont le plus souvent d'origine hépatique mais il est important de considérer le métabolisme extra-hépatique par utilisation d'autres modèles (rénaux, intestinaux...).

Ces études nécessitent l'utilisation complémentaire de différents modèles biologiques *in vitro*. Enfin, l'extrapolation au métabolisme *in vivo* doit prendre en compte l'effet et l'importance de facteurs physiologiques spécifiques tels que la quantité d'enzyme, la taille des organes, le débit sanguin et la présence d'inhibiteurs ou d'activateurs.

IV.1. Utilisations des fractions sub-cellulaires

Les fractions sub-cellulaires les plus utilisées sont les microsomes et le cytosol hépatique. Ils sont obtenus après centrifugation puis ultracentrifugation d'homogénats d'organes.

Les microsomes sont des vésicules principalement constituées de membranes de réticulum endoplasmique. Ils sont formés lors de l'homogénéisation et du fractionnement de la cellule (Fig. 6). La fraction cytosolique est constituée par le surnageant de l'ultracentrifugation.

Les cytochromes P 450 et les UGT sont localisés dans les membranes des microsomes. Le cytosol comporte d'autres enzymes tels que les sulfotransférases.

Les fractions sub-cellulaires peuvent être conservées à - 80°C ou dans l'azote liquide. Elles constituent une source concentrée d'enzymes du métabolisme.

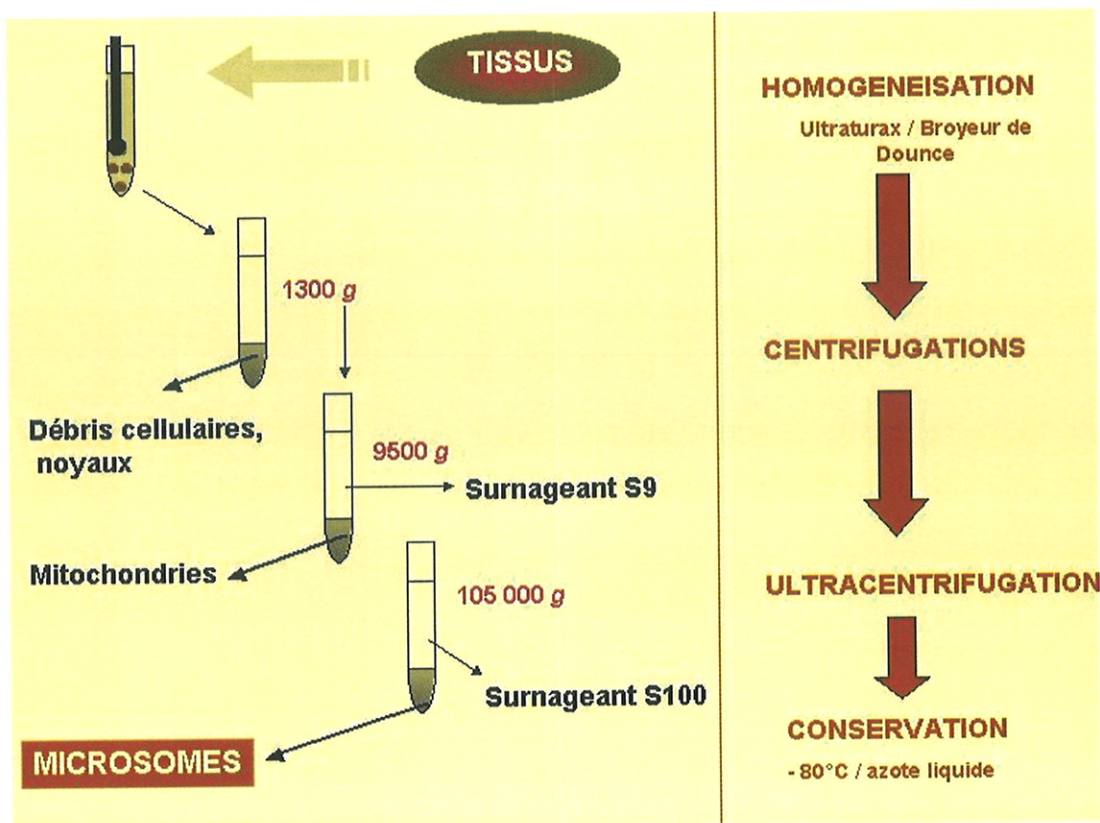


Figure 6 : schéma illustrant la préparation des microsomes

Les fractions sub-cellulaires permettent donc l'étude de métabolisme des composés étudiés, avec l'avantage que l'apparition des métabolites ou la disparition de la molécule parente sont obligatoirement dues au métabolisme et non à des phénomènes d'absorption. Ces fractions sont utiles lors de l'identification des enzymes impliquées dans le métabolisme avec une stratégie passant par plusieurs étapes :

- localisation du métabolisme (microsomes ou cytosol)
- détermination des cofacteurs (NADPH pour le CYP 450, UDP-AG pour les UGT, UDP-glucose pour les réactions de glucoconjugaison)
- utilisation de substrats inhibiteurs ou inducteurs enzymatiques sélectifs pour l'identification des isoformes enzymatiques.

Il est également possible de réaliser des études de corrélation ou d'immuno-inhibition.

Les différentes fractions cellulaires ne possédant pas toutes les enzymes responsables des biotransformations, il est indispensable d'étudier séparément les différentes isoformes enzymatiques dans un second temps.

IV.2. Lignées cellulaires transfectées et enzymes recombinantes

Les enzymes recombinantes sont issues de lignées cellulaires transfectées par un vecteur transportant une séquence d'ADNc codant pour une isoforme enzymatique particulière.

Ces lignées surexpriment une isoforme particulière d'enzyme.

Il s'agit de lignées cellulaires de mammifères, d'insectes, de bactéries (*Escherichia coli*) ou de levures (*Saccharomyces cerevisiae*). Le vecteur de transfection est le plus souvent de type viral (baculovirus).

Le système d'expression bactérien a l'avantage d'être à développement rapide avec un milieu de culture peu coûteux par rapport aux cellules d'insectes ou de mammifères. Ce système est idéal pour l'obtention de grandes quantités d'enzyme pour des études structurales.

Les levures présentent les mêmes avantages que le système d'expression bactérien. Elles permettent d'obtenir un niveau d'expression enzymatique important.

L'utilisation de cellules de mammifère est plus complexe. Ce modèle permet d'étudier simultanément la formation de métabolites et les éventuelles conséquences toxiques (cytotoxicité, carcinogénèse).

Les enzymes recombinantes représentent un complément essentiel aux études de métabolisme utilisant les microsomes. Elles permettent de disposer de différentes isoformes d'enzymes de grande pureté. Il est également possible d'étudier ainsi l'effet d'enzymes à faible taux d'expression *in vivo*.

Les systèmes transfectés peuvent être utilisés directement pour l'identification de métabolites produits par des enzymes spécifiques, par incubation des cellules avec le produit à étudier. Ils permettent également l'étude des paramètres cinétiques (K_m , V_{max}) ou d'inhibition (K_i , CI_{50}) de l'isoenzyme impliquée (Crespi et Miller, 1999).

IV.3. Autres modèles

Un certain nombre d'autres modèles peuvent être utilisés dans les études de métabolisme :

- La culture primaire d'hépatocytes permet de travailler en disposant de l'ensemble des enzymes du métabolisme hépatique et en tenant compte des phénomènes de diffusion trans-membranaire des xénobiotiques. Ce modèle est cependant contraignant et délicat à utiliser.
- Les tranches d'organes (slices) représentent également un modèle intéressant dans lequel l'environnement cellulaire est conservé.
- Enfin, la modélisation moléculaire, technique « *in silico* » et non plus *in vitro*, peut être utilisée pour l'étude de l'interaction enzyme-substrat.

V. ETUDE DU METABOLISME DES XENOBIOTIQUES : OUTILS ANALYTIQUES

Les produits du métabolisme des xénobiotiques ou la molécule elle-même peuvent être actifs ou toxiques à faible concentration dans les milieux biologiques. Les études de métabolisme nécessitent par conséquent des outils à la fois très sensibles et spécifiques. La spectrométrie de masse, rassemblant ces deux exigences, est décrite comme une technique analytique de référence dans ce type d'étude (Debrauwer, 2000). L'apparition de spectromètres de masse de plus en plus performants avec les systèmes quadripolaires en tandem, de trappe à ions (ion trap) ou d'analyseurs de temps de vol (time of flight), contribue largement à ce développement. L'essor de cette technique est également lié à l'introduction d'interfaces d'ionisation douce, avec en particulier les sources à électrospray, qui permettent l'étude de composés polaires ou labiles en limitant leur dégradation.

La spectrométrie de masse en tandem utilise deux filtres de masse quadripolaires séparés par une cellule de collision constituée elle-même d'un quadripole.

Suite à l'introduction d'un échantillon à analyser contenant plusieurs molécules, les ions moléculaires correspondants seront formés dans la source d'ionisation, par ajout d'un ou plusieurs protons en mode d'ionisation positif ou par retrait d'un ou plusieurs protons en mode d'ionisation négatif.

En mode de balayage des ions fils (product ion scan), le premier quadripole (Q1) permet la sélection d'un des ions moléculaires formés en fonction de son rapport m/z et seul cet ion pénétrera en cellule de collision. Il sera fragmenté par un gaz inerte pour former des ions fils. Ces ions passent dans le troisième quadripole (Q3) et génèrent le spectre de fragmentation de l'ion moléculaire sélectionné (Fig.7).

Dans le mode de suivi des ions précurseurs (precursor ion scan), un ion fragment d'intérêt est sélectionné en Q3 et la recherche des ions précurseurs correspondants est réalisée en Q1. Le spectre de masse qui en résulte donne tous les ions moléculaires qui donnent un fragment de rapport m/z égal à celui sélectionné.

Lorsque le mode MRM (multiple reaction monitoring) est utilisé, un petit nombre de transitions ions moléculaires-ions fils sont suivies, avec un gain de spécificité important par rapport au système de détection simple masse.

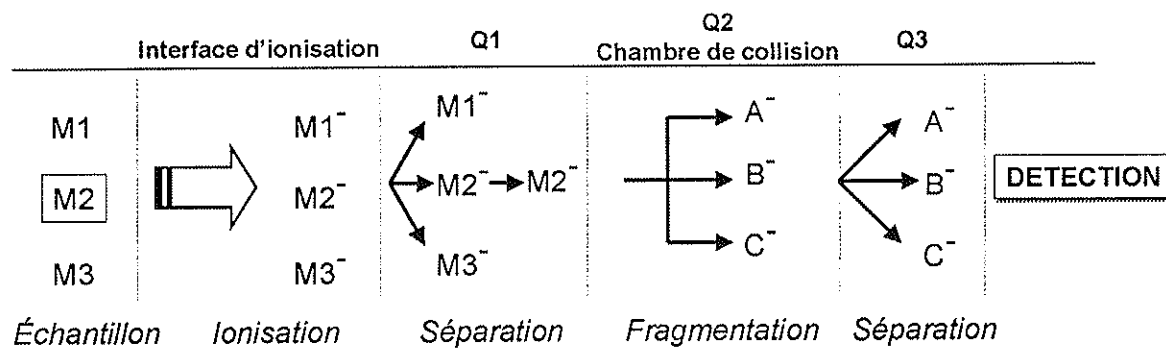


Figure 7 : balayage des ions fils produits par fragmentation par la technique de masse en tandem

D'autres outils analytiques tels que la résonance magnétique nucléaire (RMN) sont complémentaires, permettant une étude structurale plus approfondie des métabolites.

DEUXIEME PARTIE :

**Etude *in vitro* et *in vivo* du métabolisme
de l'acide mycophénolique chez l'homme**

I. INTRODUCTION

I.1. Le mycophénolate mofétil (MMF) et l'acide mycophénolique (AMP)

Le mycophénolate mofétil (MMF) est un immunosuppresseur efficace dans la prévention et le traitement des rejets de greffe rénale, cardiaque ou hépatique, en association avec d'autres agents immunosuppresseurs. Le MMF est l'ester 2-morpholinoéthyle de l'acide mycophénolique (Fig. 8). L'acide mycophénolique (AMP) est un produit de fermentation de *penicillium stoloniferum*. C'est la fraction active de la molécule. Le mycophénolate mofétil a été essentiellement développé pour augmenter la biodisponibilité orale de l'acide mycophénolique.

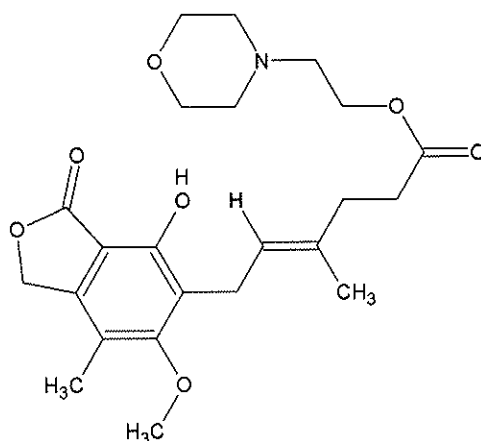


Figure 8 : structure du mycophénolate mofétil : 2-morpholinoéthyl (E)-6-(1,3)-dihydro-4-hydroxy-6-méthoxy-7-méthyl-3-oxo-5-isobenzofuranyl)-4-méthyl-4-hexénoate

I.1.1. Mode d'action

L'activité immunosuppressive du MMF est liée à la concentration d'AMP. L'acide mycophénolique est un puissant inhibiteur non compétitif et sélectif de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) ; il inhibe, sans incorporation à l'ADN, la synthèse *de novo* des nucléotides à base de guanine. L'effet sélectif sur le système immunitaire vient de la dépendance des cellules B et T pour la voie de synthèse *de novo* par rapport à la voie alterne de biosynthèse purique qui passe par l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase. Le MMF supprime la prolifération lymphocytaire et la formation d'anticorps par les cellules B. Il peut également inhiber le recrutement de leucocytes par les sites inflammatoires en déplaçant les nucléotides guanosines

leucocytaires, et en inhibant la glycosylation des glycoprotéines lymphocytaires impliquées dans l'adhérence aux cellules endothéliales.

I.1.2. Pharmacocinétique et métabolisme

Après administration orale, le MMF est rapidement absorbé puis complètement hydrolysé en AMP, son métabolite actif (le MMF n'est pas mesurable dans le plasma). L'AMP est principalement métabolisé en un métabolite glucuro-conjugué inactif : le 7-O-glucuronate d'AMP ou AMP-phényl-glucuronate (AMPG).

Une fraction négligeable est excrétée sous forme d'AMP et environ 90 % de la dose administrée sont éliminés dans les urines sous forme d'AMPG (Bullingham et col., 1998). Aux concentrations thérapeutiques, 95 % de l'AMP est lié à l'albumine plasmatique. L'étude de Morissette et col. (2001) ne met pas en évidence de déplacement de la liaison AMP-albumine par l'AMPG.

L'étude des concentrations plasmatiques de l'acide mycophénolique chez l'homme a révélé l'existence d'une cinétique particulière, comprenant un premier pic plasmatique précoce d'AMP suivi d'un second pic intervenant 6 à 12 heures après la prise ; ce phénomène semble lié à une circulation entéro-hépatique de l'AMPG avec hydrolyse en AMP par la flore du colon. Ce mécanisme qui présente une forte variabilité inter-individuelle, a été proposé pour expliquer la survenue de certains effets secondaires digestifs ou certaines interactions médicamenteuses (Bullingham et col., 1998).

La présence d'autres métabolites a été rapportée : Mojarrhabi et Mackenzie (1997) observaient 2 glucuro-conjugués supplémentaires de l'AMP après incubation sur cellules COS-7 transfectées avec une UDP-glucuronosyltransférase intestinale, proposant un acyl-glucuronate et un di-glucuronate d'AMP ; Bullingham et col. (1998) suggéraient également la présence d'un acyl-glucuronate d'AMP dans les urines de patients sous MMF. Des études ultérieures (Shipkova et col., 1999) par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, dans le sérum de patient, ont permis de confirmer la présence d'acyl-glucuronate d'AMP (AMPaG) et de détecter un autre métabolite : le 7-O-glucose AMP (AMPGI) (Fig.9). Il a été montré *in vitro* que l'AMPaG est actif et l'AMPGI inactif (Shipkova et col., 2001 (b)). Un métabolite non encore identifié (M-3) et semblant être produit par un cytochrome P450 a également été détecté dans le sérum, mais son activité n'a pas été étudiée (Shipkova et col., 2001 (a)). Enfin, un métabolite

supplémentaire, supposé être l'AMP-acyl-glucoside (AMPaG) a été détecté à partir d'incubations en présence de microsomes rénaux (seuls capables de le former), mais ce métabolite n'a pas été retrouvé chez des patients traités (Shipkova et col., 2001 (a)).

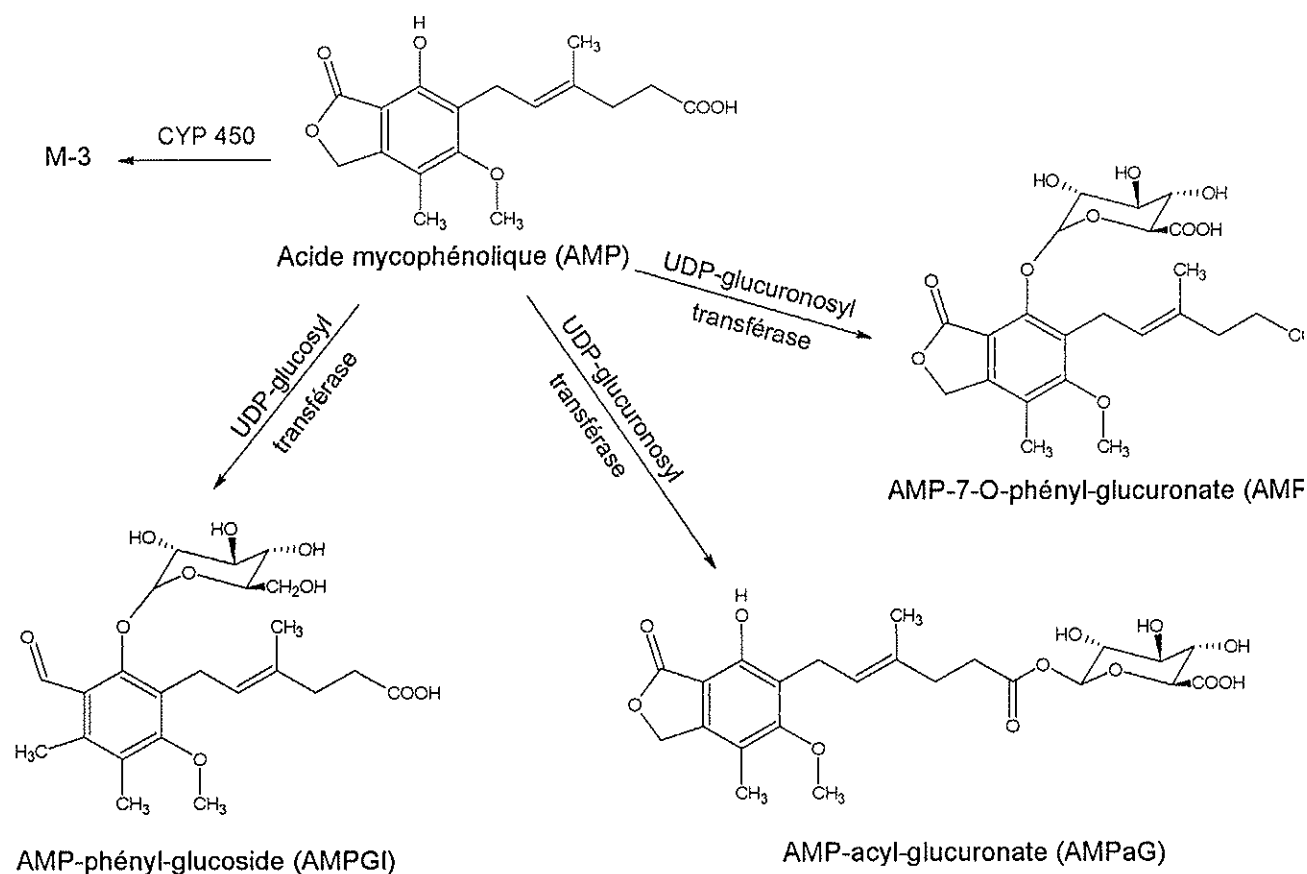


Figure 9 : voies métaboliques et structures chimiques de l'acide mycophénolique et de ses conjugués (D'après Shipkova et col., 1999)

La nature des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'AMP a été déterminée à l'aide d'études *in vitro* sur microsomes hépatiques humains (Shipkova et col., 1999). Il s'agit d'UDP-glucuronosyltransférases (UGT) et d'UDP-glucosyltransférases. L'étude de Shipkova et col. (2001(a)) utilisant des microsomes humains hépatiques, rénaux, et intestinaux suggère la présence d'UGT en plus grande quantité et avec une affinité plus importante pour l'AMP au niveau rénal pour la formation d'AMPG et d'AMPGI.

Deux autres équipes mettaient en évidence une activité métabolique rénale supérieure à l'activité hépatique pour la transformation de l'AMP en AMPG (Vietri et col. 2000 ; Zucker et col., 1999). L'existence d'un métabolisme intestinal est probable car l'AMPG, l'AMPGI et l'AMPaG ont été retrouvés à partir d'un modèle *ex-vivo* d'étude de la biotransformation intestinale (Braun et col., 2000).

Bowalgaha et Miners (2001) retrouvent des clairances microsomaux hépatiques, rénales et intestinales de l'AMP comparables aux études précédentes, mais concluent à un rôle majoritaire du foie dans la clairance systémique de l'AMP, du fait des rapports massiques entre les organes.

Les études du métabolisme de l'AMP utilisant des isoformes d'UGT recombinantes ont abouti à des résultats contradictoires. Les travaux de Mackenzie (Mojarrabi et Mackenzie, 1997 ; Mackenzie et col., 2000) sont en faveur d'une activité importante des UGT 1A10 et 1A8 (exprimées seulement au niveau digestif). Les UGT 1A1, 1A3, 1A4, 1A6 seraient inactives sur l'AMP ; l'activité de l'UGT 1A9 n'a pas été clairement établie. Pour Shipkova et col. (2001 a), les UGT 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7 et 2B15 seraient capables de former l'AMPG, les UGT 1A7 et 2B4 étant les plus actives.

I.1.3. Interactions médicamenteuses

Zucker et col. (1997) rapportent des concentrations d'AMP et une activité immunosuppressive *in vitro* supérieures chez des patients transplantés rénaux recevant du tacrolimus par rapport à ceux recevant de la ciclosporine en association au MMF. Une seconde étude *in vitro* (Zucker et col. ; 1999) met en évidence une inhibition compétitive, dose-dépendante de la formation de l'AMPG par le tacrolimus. Des études *in vivo* vont également dans le sens d'une inhibition de la glucuroconjugaison de l'AMP par ce produit (Hübner G.I. et col., 1999 ; Morissette et col. 2001). Deux études cliniques (Smack Gregoor et col. (1999) ; van Gelder et col., 2001) montrent que la combinaison MMF-ciclosporine diminuerait l'exposition à l'AMP. Les auteurs envisagent une diminution du cycle entérohépatique de l'AMP par la ciclosporine, mais une interaction enzymatique n'a pas été formellement éliminée.

La fixation à l'albumine plasmatique de l'AMP n'est pas modifiée par la ciclosporine, la prédnisone, la digoxine et la phénytoïne (Nowak et col. 1995).

Tableau 5 : principales interactions médicamenteuses rapportées pour le mycophénolate mofétil (Cilia et Col., 2002)

<i>Médicament ou classe thérapeutique</i>	<i>Effet</i>	<i>Mécanisme d'action supposé</i>
tacrolimus	Augmentation de l'ASC et de la C _{max} d'AMP	Inhibition de la glucuroconjugaison
ciclosporine	Diminution de l'ASC d'AMP	Inhibition du passage de l'AMPG du foie vers la bile
anti-acides	Diminution de l'ASC de l'AMP	Diminution de l'absorption de l'AMP
métronidazole	Diminution de l'ASC de l'AMP et de l'AMPG	Suppression du cycle entérohépatique par inhibition des bactéries anaérobies intestinales
fer	Diminution de la C _{max} et de l'ASC d'AMP	Formation de complexes chélatés diminuant l'absorption intestinale
anti-inflammatoires non stéroïdiens	Augmentation de la C _{max} d'AMP	Faible inhibition de la glucuroconjugaison de l'AMP (sauf pour l'acide niflumique)

I.2. Objectifs de l'étude

Les objectifs de ce travail sont :

- de confirmer la présence des métabolites de l'AMP, identifiés par une seule équipe à ce jour (Shipkova et col., 1999), dans le sérum et l'urine de patients traités, ainsi que de rechercher d'autres métabolites potentiels,
- de confirmer la nature des métabolites après production *in vitro* sur microsomes humains,
- d'étudier la nature des iso-enzymes d'UGT responsables de la production des métabolites glucuro-conjugués.
- de rechercher l'iso-enzyme du CYP 450 responsable de la production de M-3

II. MATERIEL ET METHODE

II.1. Réactifs

L'acide mycophénolique, l'UDP-glucose, l'UDP-acide glucuronique, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrate (NADPH), le triton X-100, le glycérol, le dithotréthol (DTT) et la β -glucuronidase ont été obtenus chez Sigma (St Louis, MO, USA). L'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) chez Acros (New Jersey, USA), le $MgCl_2$, le TRIS-HCl et le saccharose chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Le 7-O-glucuronate d'AMP a été obtenu auprès d'Analytical Services International Ltd (Londre, Angleterre). Tous les réactifs utilisés étaient de la meilleure qualité disponible commercialement.

II.2. Modèles biologiques *in vitro*

II.2.1. **Microsomes de rats et microsomes humains (Dragacci et col., 1987)**

Les microsomes hépatiques de rats mâles Sprague-Dawley témoins et induits ont été préparés par le service de pharmacologie du CHU de Brest selon un protocole validé. Les inducteurs enzymatiques utilisés ont été le phénobarbital et le 3-méthylcholanthrène.

Les prélèvements tissulaires nécessaires à la préparation de microsomes humains (cortex rénal, foie) ont été obtenus à partir de pièces opératoires. L'histologie des tissus prélevés était normale. Les prélèvements ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide, puis conservés à $-80^{\circ}C$. Les microsomes ont été préparés à partir d'un pool de prélèvements (foie : $n= 3$, rein : $n= 4$) pour limiter les variabilités interindividuelles de métabolisme et l'influence éventuelle de la prise d'inducteurs ou d'inhibiteurs enzymatiques.

L'ensemble des manipulations de préparation des microsomes a été réalisé en chambre froide ($4^{\circ}C$) pour éviter l'altération des enzymes microsomales. Brièvement, un homogénat tissulaire est obtenu par utilisation successive d'un broyeur Ultraturax (IKA Werke, Staufen, Allemagne) et d'un broyeur de Dounce (Wheaton, Millvill, USA), dans un tampon phosphate pH 8,0 d'isolement des microsomes contenant du saccharose (0,25 M), de l'EDTA (10 mM) et du DTT (0,1 mM). Un premier cycle de centrifugation (10 minutes

à 1300 g puis 20 minutes à 10000 g) permet de sédimenter les noyaux, les débris cellulaires et les mitochondries.

Les microsomes sont ensuite sédimentés par ultracentrifugation du surnageant (1 heure à 100000 g). La suspension microsomale est réalisée dans un tampon phosphate pH 8,0 de conservation des microsomes contenant EDTA (1mM), DTT (1mM) et glycérol (20% du volume du tampon), elle est aliquotée et conservée à -80° C jusqu'à utilisation.

Un dosage des protéines totales dans la préparation est réalisé par la méthode de Bradford (1976) dont la substance de référence est l'albumine sérique bovine. Il permet de valider les préparations microsomales et de standardiser les résultats d'activité enzymatique.

II.2.2. Incubation de l'acide mycophénolique en présence de microsomes

La suspension microsomale (200 µL, 1mg de protéines par mL) a été incubée en présence d'AMP (1mM) pendant 30 minutes à 37°C dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 contenant 10mM de MgCl₂. Dans des expériences séparées, les co-substrats suivants ont été utilisés : NADPH, acide UDP-glucuronique ou UDP-glucose (concentration finale de 3mM). Lorsque l'étude portait sur les UGT, les microsomes ont été activés par une pré-incubation de 30 minutes dans la glace en présence de Triton X-100 (1mg/mL). Les incubations sont stoppées par ajout de 500µL d'éthanol glacé. Après centrifugation, le surnageant est conservé à -20°C jusqu'à analyse. Des incubations contrôles, sans co-substrats d'une part, sans microsomes d'autre part, ont été systématiquement réalisées.

Une procédure d'extraction en phase solide des métabolites sur colonne échangeuse d'anions (Oasis MAX, Waters, Milford, Mass. USA) a été utilisée. Les surnageants sont dilués au 1/3 puis déposés sur la colonne qui est alors lavée par un mélange tampon acétate de sodium pH 7,0 / méthanol (10/90 ; v/v). Les métabolites sont élués par du méthanol contenant 2% d'acide formique, évaporés à sec puis repris par 50 µL d'un mélange acétonitrile / tampon formiate 2 mM pH 3,0 (90/10 ; v/v).

II.2.3. Cellules transfectées avec les différentes isoformes de CYP 450

Cette partie de l'étude a été réalisée par le Dr Thierry Cresteil, ICSN-CNRS UPR 2301 à Gif-sur-Yvette, qui a développé des lignées cellulaires humaines (Ad 293) stables transfectées avec l'ADNc de l'un des cytochromes P 450 humains 1A1, 1A2, 2A6, 2C8,

2C9, 2C18, 2C19, 2E1, 2E1-2, 3A4, 3A5, et 3A7 et de la NADPH-CYP réductase humaine. De l'AMP (1mM) a été incubé en présence de chacune de ces lignées cellulaires. Après 24 heures d'incubation, le surnageant de culture a été prélevé et immédiatement envoyé à Limoges dans la carboglace pour analyse.

L'extraction des métabolites a été réalisée comme précédemment. Deux incubations contrôles ont été réalisées : sans cellule et avec cellules non transfectées.

II.3. Préparation des échantillons biologiques de patients sous MMF

Les urines utilisées pour la recherche et l'identification des métabolites de l'AMP ont été recueillies chez des patients transplantés rénaux (n=7) du service de néphrologie du CHU de Limoges. Le recueil concernait les urines de 12 heures pour garantir une présence optimale des métabolites. Les patients recevaient tous une combinaison de ciclosporine (posologie adaptée par méthode pharmacocinétique) et de MMF (1g matin et soir). Les urines ont été aliquotées et conservées à -20°C.

Dans des expériences séparées, l'urine (2,5 mL) d'un patient sous MMF a subi une hydrolyse enzymatique par incubation pendant 2 heures à 56°C en présence de β -glucuronidase (9,8 UI/mL) en milieu tamponné (tampon acétate de sodium pH 4,8), préalablement à l'extraction.

Des échantillons de sérum obtenus à partir de prélèvements sanguins réalisés dans le cadre d'une étude pharmacocinétique des mêmes patients transplantés rénaux (étude Primocine, PHRC régional 2001) ont été également analysés.

Les échantillons d'urine (2,5 à 4 mL) et de sérums (1 ml) ont été traités selon le protocole d'extraction décrit pour les surnageants d'incubation.

II.4. Identification et dosage des métabolites de l'AMP

II.4.1. Chromatographie préparative préalable à l'identification

Des fractions contenant les métabolites de l'AMP (AMPG, AMPGI, AMPaG, M3, M3G, M3aG) ont été obtenues par une méthode LC-MS développée au laboratoire. 100 μ L d'extrait urinaire sont injectés dans une colonne phase inverse Innertsil ODS-3 C₁₈ 5 μ m (250x4,6mm d.i.) (GL Sciences, Tokyo, Japon) permettant la séparation de composés très polaires. La phase mobile consiste en une solution A (tampon formiate 2mM pH 3,0) et une solution B (tampon formiate 2mM pH 3,0 et acétonitrile ; 10/90 v/v) décrivant le gradient suivant : 0-2 minutes, 20% B ; 15 minutes, 50% B ; 19 minutes, 90% B ; 19-22 minutes, 90% B ; 25 minutes, 20 % B ; avec un débit est de 1 mL / minute.

La détection est réalisée par un spectromètre de masse API 100 (PE SCIEX, Concord, Ontario, Canada) (10 % du débit) et par un détecteur UV Shimadzu SPD-6AV (Shimadzu, Sarreguemines, France) à 250 nm (90% du débit) associé à un collecteur de fractions Bio-Rad 2128 (Bio-Rad, Paris, France). La collection des fractions est basée sur le chromatogramme des ions moléculaires des métabolites et d'un ou deux ions de confirmation, Le détecteur UV permet de confirmer la pureté des fractions collectées.

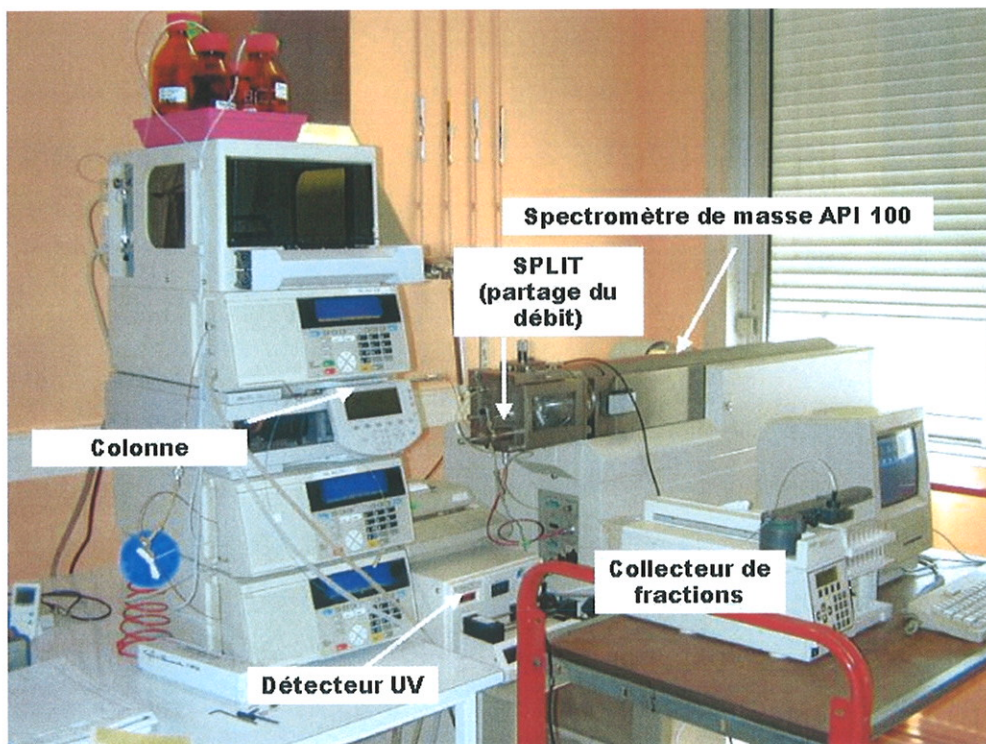


Figure 10 : photo du montage d'HPLC préparative

II.4.2. Identification des métabolites par LC-MS/MS

La recherche et l'identification des métabolites de l'AMP ont été réalisées à l'aide d'une méthode par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). 5 μ L d'extrait sont injectés dans une colonne phase inverse Innertsil ODS-3 C₁₈ 5 μ m (150 \times 2,1 mm d.i.) (GL Sciences, Tokyo, Japon). La phase mobile et le gradient sont identiques à la méthode de chromatographie préparative, mais avec un débit de 200 μ L / minute. Le spectromètre de masse triple-quadrupole utilisé est un API 2000 (PE SCIEX, Concord, Ontario, Canada) utilisant une interface d'ionisation de type électrospray limitant la dégradation des molécules fragiles tels que les métabolites conjugués. Les analyses LC-MS/MS ont été réalisées en mode d'ionisation négative avec une tension d'ionisation de - 4500 V, une tension d'orifice variant de -60 à - 80 V, en résolution unitaire. Le voltage appliqué en cellule de collision variait de -20 à -30 V avec de l'azote comme gaz de collision. Les transitions MRM (multiple reaction monitoring) correspondantes à l'AMP glucuro-conjugué (m/z 495 \rightarrow 319, 495 \rightarrow 175), à l'AMP gluco-conjugué (m/z 481 \rightarrow 319, 481 \rightarrow 161), à l'AMP (m/z 319 \rightarrow 275 et 319 \rightarrow 287), au desméthyl-AMP (m/z 305 \rightarrow 261) et au desméthyl-AMP glucuro-conjugué (m/z 481 \rightarrow 305) ont été suivies. Les ions issus de la fragmentation des ions parents 495, 481, 319 et 305 ont été recherchés (mode « product ion scan »), de même que les ions précurseurs des ions 175, 261, 275, 319 et 305 (mode « parent ion scan »).

II.4.3. Dosage de l'AMP et de ses métabolites par LC-MS

Le dosage des métabolites de l'AMP a été réalisé à l'aide d'une méthode LC-MS utilisant le spectromètre de masse API 100 (PE SCIEX, Concord, Ontario, Canada) et une colonne ODS-3 C₁₈ 5 μ m (150 \times 1,2 mm d.i.) (GL Sciences, Tokyo, Japon) avec un gradient identique aux méthodes précédentes et un débit de 50 μ L / minute. En l'absence de produits purs disponibles, l'AMPaG a été quantifié en équivalents molaires d'AMPG et M-3 en équivalents molaires d'AMP par rapport à une gamme de linéarité allant de 0,01 à 1 mg/L d'AMP et de 1 à 200 mg/L d'AMPG.

II.4.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les métabolites obtenus en quantité suffisante par la technique de chromatographie préparative, ont été soumis à une analyse par RMN (Service commun de RMN, Université de Limoges). L'étude structurale des métabolites de l'AMP par cette technique s'est basée sur un spectre du proton, un spectre du carbone 13, l'étude des interactions proton/proton à faible distance (Cosy), carbone/proton à longue et courte distance.

III. RESULTATS

III.1. Métabolites de l'AMP dans l'urine et le sérum de patients traités

Grâce à la méthode LC-MS/MS mise au point, 3 métabolites potentiels de l'AMP, en plus de l'AMP-7-0-phényl-glucuronate ont été détectés à partir d'urines de patients sous MMF (Fig.11). Un de ces métabolites, retrouvé par suivi des transitions MRM caractéristiques d'un glucuro-conjugué de l'AMP (m/z 495→319 et 495→175) est supposé être l'AMP-acyl-glucuronate. Les deux autres métabolites sont supposés être le phényl-glucoside et l'acyl-glucoside d'AMP car retrouvés en mode MRM par perte d'un fragment de masse 162, correspondant au fragment glycosyle (m/z 481→319 et 481→161). L'appartenance des ions fragments détectés à ces métabolites a été confirmée par des analyses en ions produits et en ions précurseurs. De plus, les transitions caractéristiques de l'AMP (m/z 319→275 et 319→287) (Shipkova et col., 1999) ont été retrouvées pour les quatre métabolites détectés, confirmant qu'il s'agit de métabolites de phase II du produit parent.

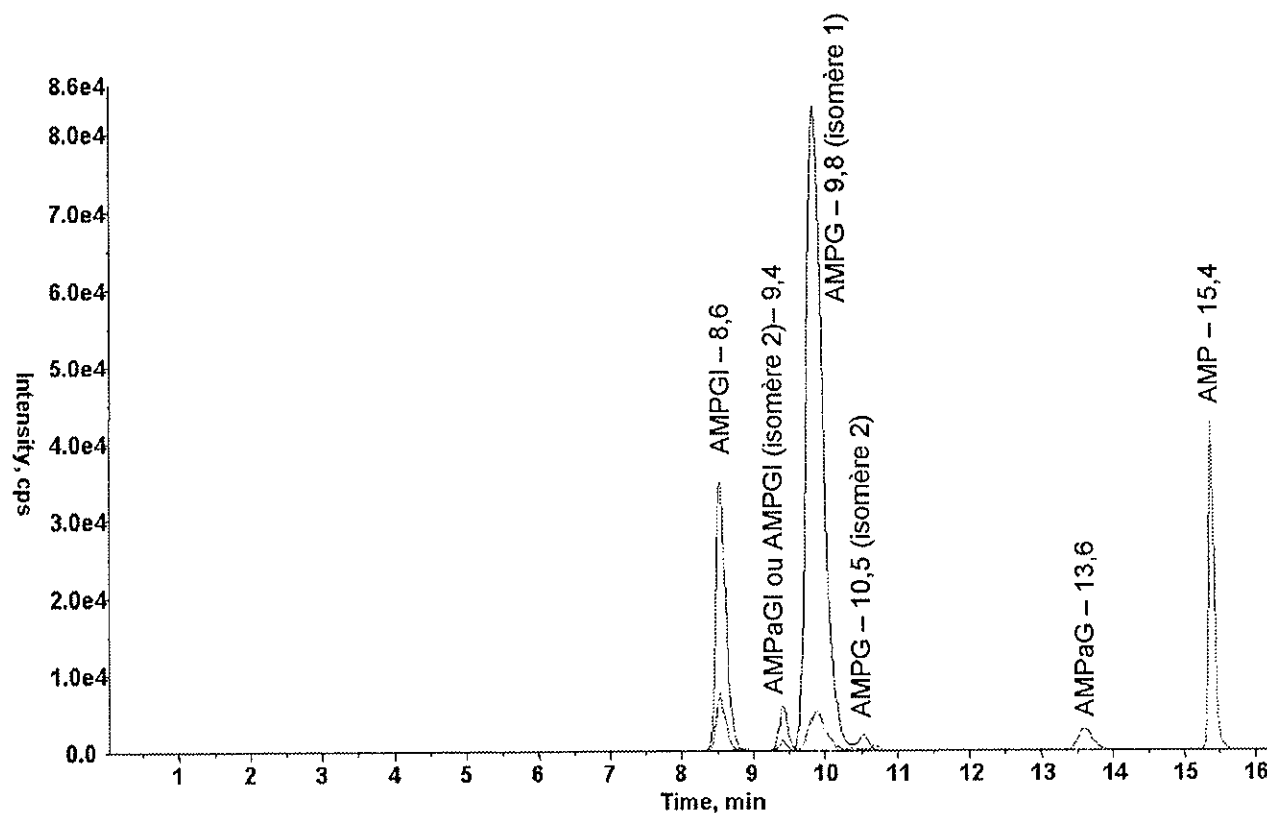


Figure 11 : chromatogramme des transitions MRM de l'AMP et des métabolites glucuro-conjugués et gluco-conjugués.

L'étude en RMN de l'AMPG purifié par chromatographie préparative a permis de confirmer formellement l'emplacement du résidu glucuronate en position 7. Pour les autres composés, la RMN n'a pas permis d'apporter de renseignement supplémentaire en raison d'interférences probablement liées à la présence de composés poly-aromatiques dans les extraits urinaires et d'une quantité trop faible de métabolites dans les fractions.

L'existence de deux diastéréoisomères d'AMPG, jamais rapportée jusqu'ici, a été évoquée pour expliquer les deux pics chromatographiques observés à 9,8 et 10,5 minutes, qui correspondraient aux formes *trans*, majoritaire et *cis*. La formation du (*cis*)-AMP-7-O-glucuronate pourrait avoir lieu *in vivo* sous l'influence d'une isomérase ou de conditions physico-chimiques particulières. Le second glucoside de l'AMP à 9,4 minutes pourrait lui-aussi correspondre à l'isomère *cis* de l'AMPGI.

Dans plusieurs des échantillons d'urine analysés, d'autres composés identifiés en LC-MS/MS comme étant des glucuronates d'AMP mais à des temps de rétention différents de l'AMPG et l'AMPaG ont été détectés. La figure 12 représente un exemple de chromatogramme obtenu : en plus des deux isomères d'AMPG et de l'AMPaG, trois composés (X1, X2, X3) sont retrouvés par suivi de la transition m/z 495→319, le spectre de fragmentation du composé X1 (le plus abondant), comprend un ion de masse 319 u et un de masse 175 u, ce qui permet d'assurer qu'il s'agit d'un glucuronate d'AMP. Une solution pure d'AMPG dans l'urine, conservée pendant 2 mois dans des conditions de pH acide ou basique, n'a pas abouti à la formation de tels composés. Ceci permet d'éliminer l'hypothèse que ces composés se forment à partir de l'AMPG pendant la conservation des échantillons. L'instabilité connue des acyl-glucuronates (Ritter, 2000) pourrait être à l'origine de l'existence de ces composés. Les acyl-glucuronates donnent lieu en particulier à des réactions de migration intra-moléculaire du groupe acyle, il y a réarrangement du groupe acyle de sa position initiale en C1 de l'acide glucuronique aux positions C2, C3 puis C4 (Fig.4) suite à une attaque nucléophile du carbone par la fonction hydroxyle voisine. Cette réaction peut donner naissance successivement à trois isomères de position, de probabilité de formation et donc de concentration décroissante.

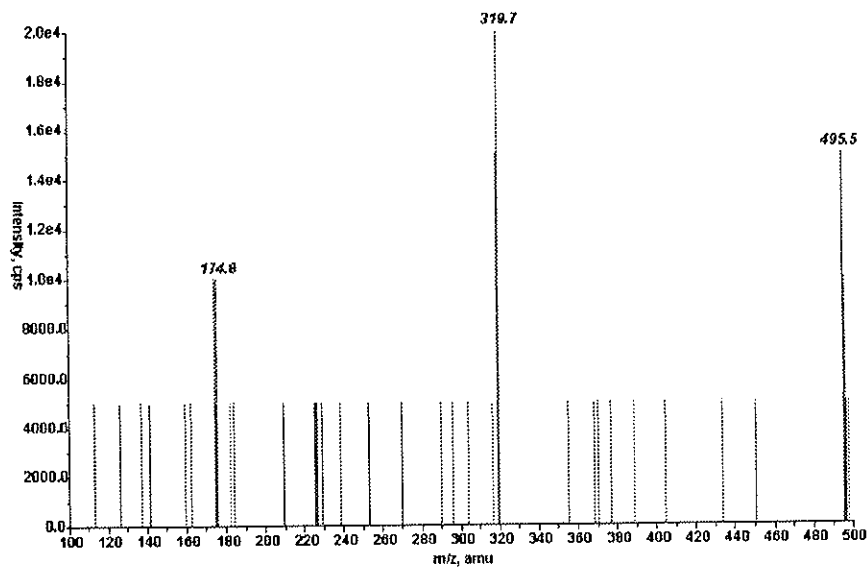
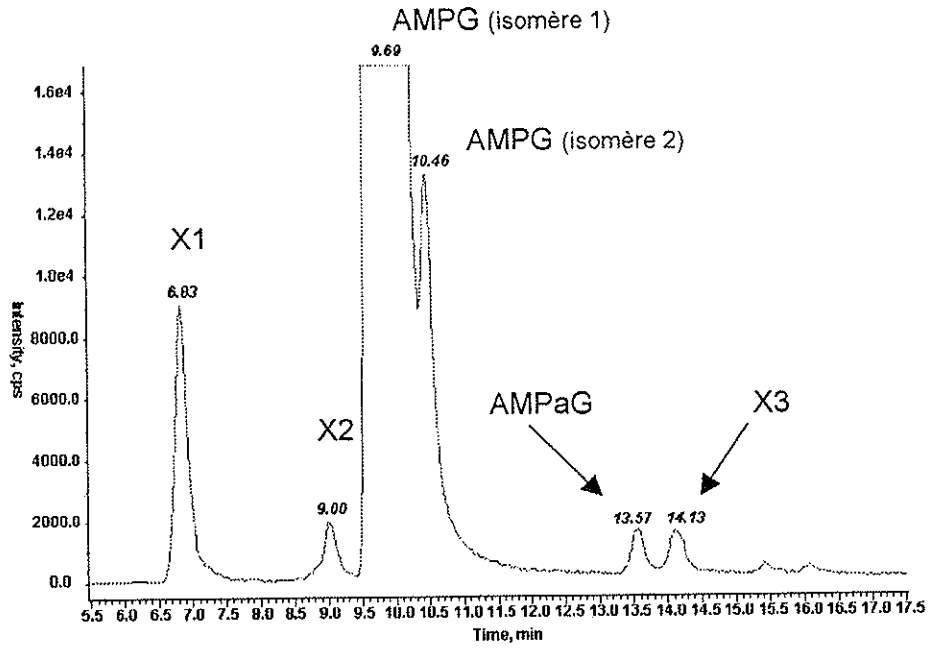


Figure 12 : exemple de chromatogramme (transition MRM m/z 495→319) et de spectre de fragmentations (ions produits) du composé X1, obtenu à partir de l'urine d'un patient sous MMF.

La recherche du métabolite M-3 a été basée sur des hypothèses de structures attendues et de voies de fragmentation correspondantes. Le suivi des transitions correspondant à un éventuel métabolite déméthylé de l'AMP (m/z 305→261) et à ses produits de glucuro-conjugaison (m/z 481→305) a révélé trois nouveaux pics supposés correspondre au métabolite M-3 et à deux glucuronates du M-3. Après incubation en présence de β -glucuronidase, seul le métabolite M-3 restait détectable avec une intensité très augmentée, confirmant la présence d'un résidu glucuronate sur les deux produits de masse 481 u (Fig.13).

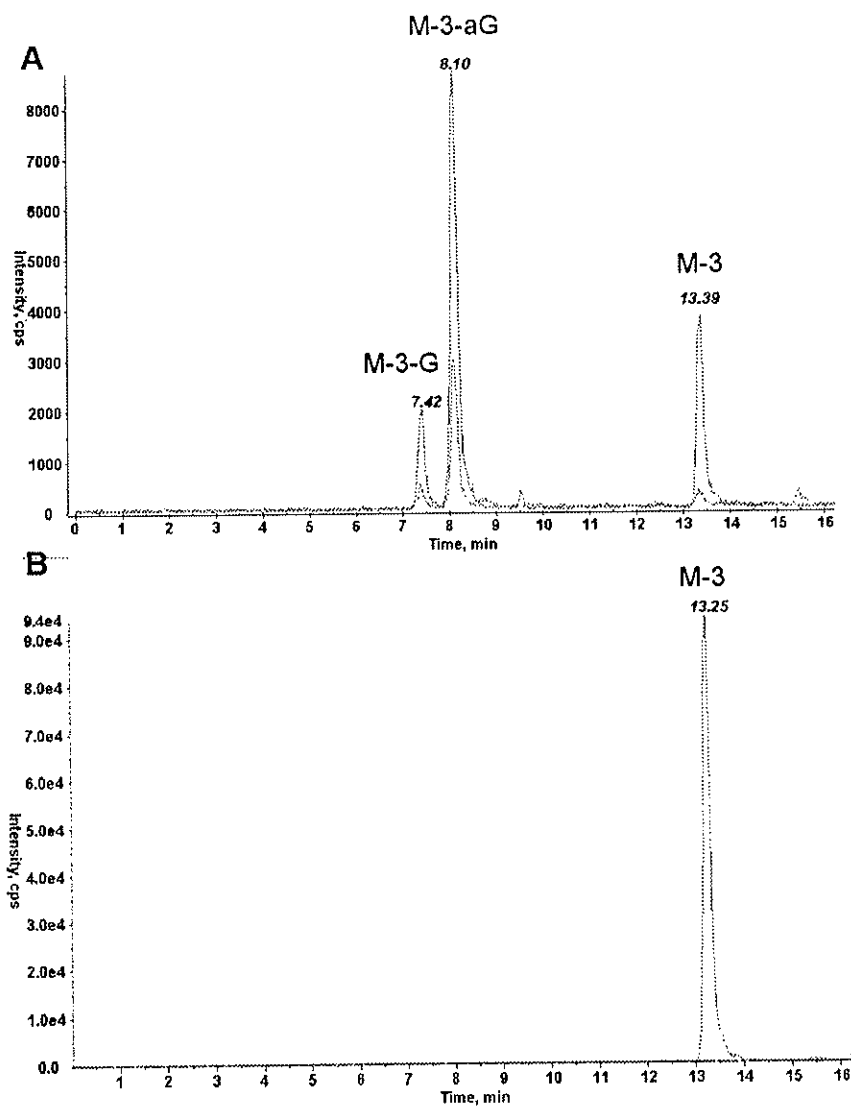


Figure 13 : chromatogramme des transitions MRM des supposés M-3 (m/z 305→261), M-3-phényl-glucuronate (M-3-G) et M-3-acyl-glucuronate (M-3-aG) (m/z 481→305) avant (A) et après (B) traitement de 2 heures à 56° en présence de 9,8 UI/mL de β -glucuronidase dans une urine de patient traité par MMF

L'étude des ions issus de la fragmentation de M-3 permet de supposer qu'il s'agit du 6-O-desméthyl-AMP (Fig.14). Les deux glucuronates sont donc supposés être le 6-O-desméthyl-AMP-phényl-glucuronate et le 6-O-desméthyl-AMP -acyl-glucuronate.

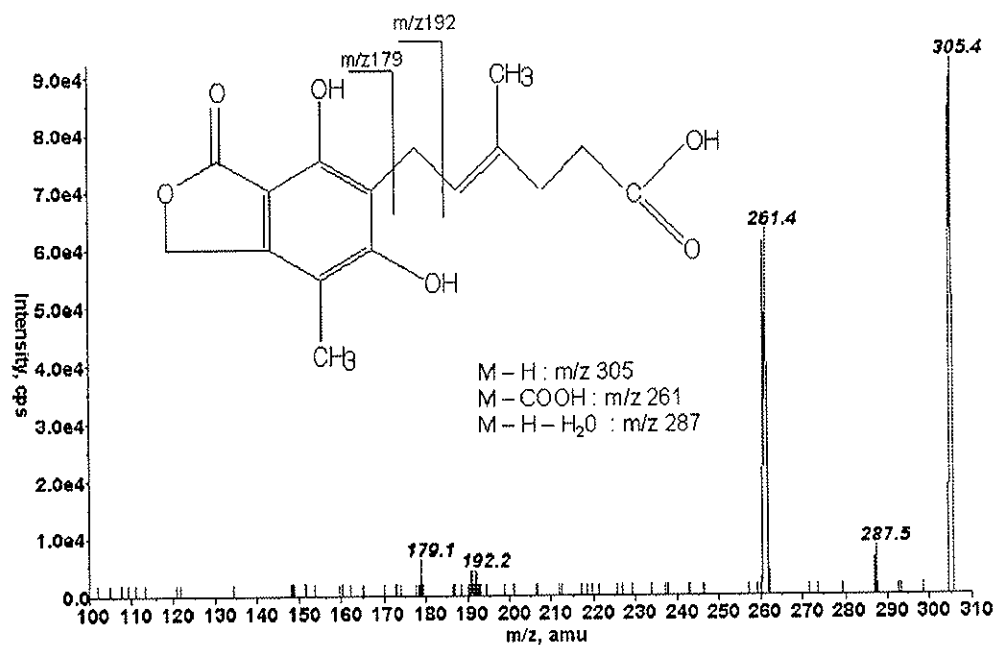


Figure 14 : ions, voies de fragmentation et structure supposés du métabolite M-3

La recherche des métabolites de l'AMP, réalisée dans 7 échantillons urinaires et dans 2 échantillons de sérums, a permis de les détecter dans une partie seulement des échantillons (tableau 6).

Tableau 6 : nombre d'observation des différents métabolites de l'AMP dans les échantillons biologiques étudiés

	Nombre d'observation						Produits d'acyle migration
	AMPaG	AMPGI	AMPaGI ou (cis)-AMPGI	M-3	M-3-G	M-3-aG	
Sérum (n=2)	2	2	2	1	1	1	0
Urine (n=7)	6	7	5	3	3	3	3

III.2. Métabolisme de l'AMP *in vitro*

III.2.1. Glucuroconjugaison et glucoconjugaison de l'AMP *in vitro*

III.2.1.1. Métabolites produits sur microsomes humains

Les conditions optimales pour la glucuroconjugaison de l'AMP ont été déterminées à l'aide d'incubations en présence de microsomes humains hépatiques et rénaux (Fig.15). La durée d'incubation la plus favorable est de 30 minutes pour les deux types de microsomes. Le taux de formation de l'AMPG augmente de façon linéaire avec la concentration protéique de la suspension microsomale. La concentration de travail choisie est de 1 mg/mL.

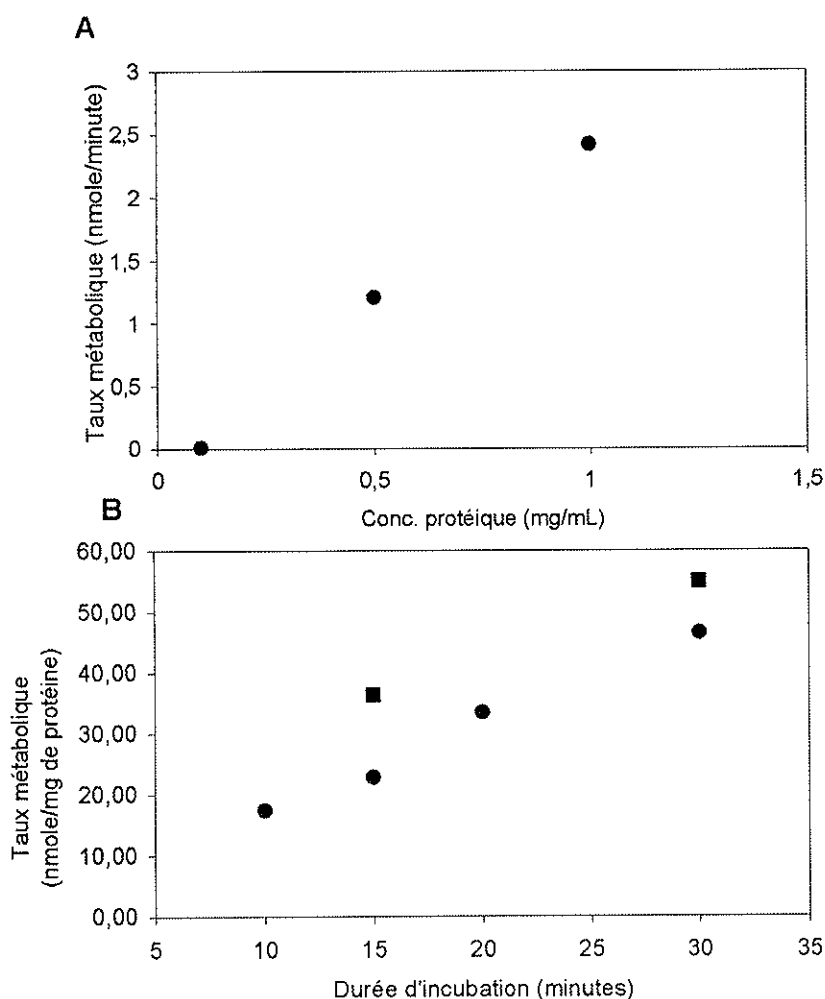


Figure 15 : glucuroconjugaison de l'AMP en présence de microsomes humains hépatiques (carré) et rénaux (cercle) : effet de la concentration en protéine de la suspension microsomale (A) et du temps d'incubation (B).

Les incubations d'AMP en présence de microsomes de reins ou de foies humains et d'acide UDP-glucuronique (UDP-AG) aboutissent à la production d'AMPG et d'un autre glucuronate d'AMP permettant de confirmer *in vitro* l'existence de l'AMP-acyl-glucuronate. En présence d'UDP-glucose, les microsomes rénaux et hépatiques humains produisent de l'AMPaG. L'AMPaG n'a pas été retrouvé lors de ces expérimentations.

III.2.1.2. Influence de l'induction chimique sur la production de l'AMPG et l'AMPaG par des microsomes de rats

L'AMP a été incubé en présence de microsomes préparés à partir de rats témoins ou induits par le 3-méthylcholanthrène ou le phénobarbital. Les microsomes de rats en présence d'UDP-AG produisent l'AMPG et l'AMPaG.

Les microsomes de rats induits par le 3-méthylcholanthrène produisent près de 1,8 fois plus d'AMPG que les microsomes de rats témoins ; la quantité d'AMPaG formé n'est pas augmentée. L'induction par le phénobarbital semble sans influence sur la production de l'AMPG, mais augmente de 1,5 fois la quantité d'AMPaG formée (Tableau 7, Fig.16).

Tableau 7 : production d'AMPG et d'AMPaG par incubation sur microsomes de rats témoins et induits par du 3-méthylcholanthrène (3-MC) ou du phénobarbital (PB). Les résultats correspondent aux moyennes et écart-types de deux incubations différentes.

Taux de formation (nmole/min/mg de protéine)	<i>Rats témoins</i>	<i>Rats 3-MC</i>	<i>Rats PB</i>
AMPG	2,46 +/- 0,08	4,37 +/- 0,24	2,02 +/- 0,02
AMPaG	0,18 +/- 0,03	0,11 +/- 0,03	0,27 +/- 0,05

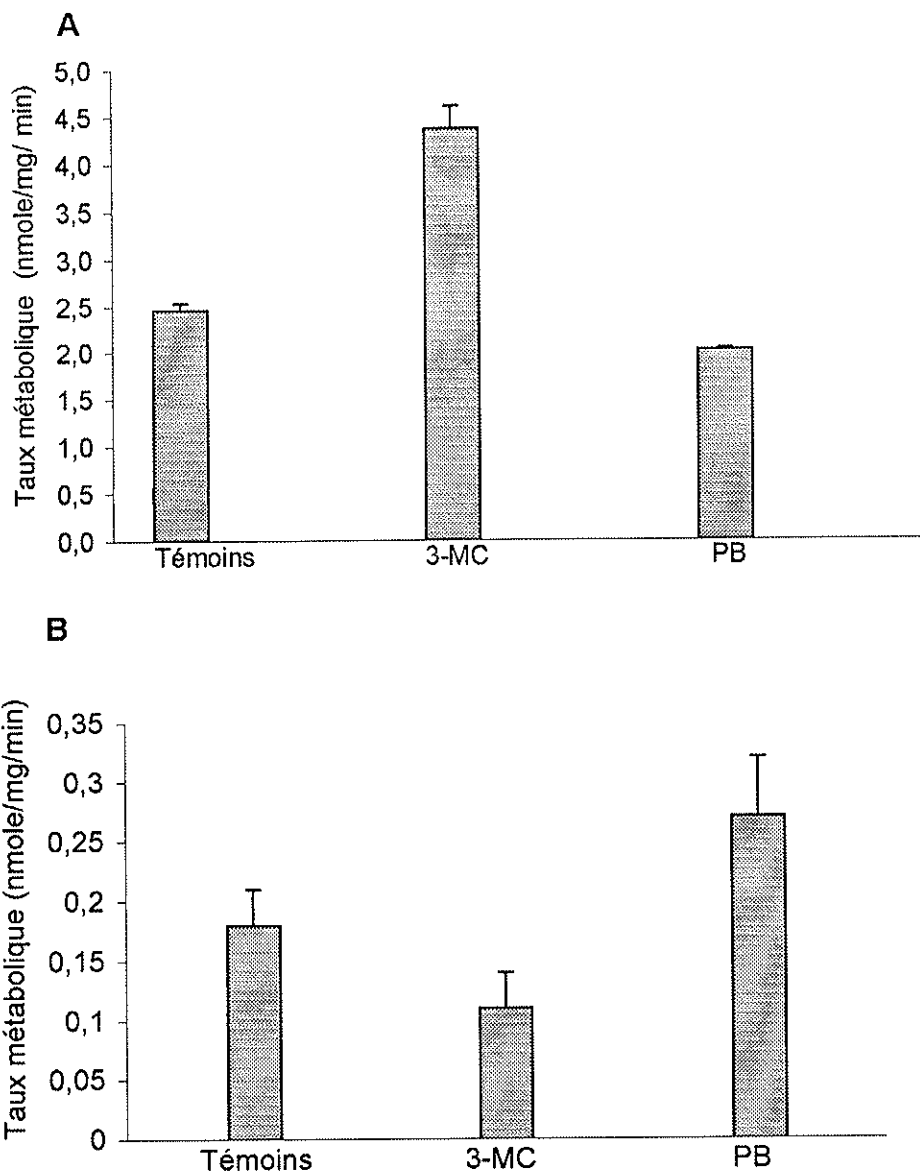


Figure 16 : production d'AMPG (A) ou d'AMPaG (B) par des microsomes de rats témoins et induits par du 3-méthylcholanthrène (3-MC) ou du phénobarbital (PB) en présence de 1mM d'AMP (incubations de 30 minutes à 37°C)

Ces résultats préliminaires permettent de supposer que les UGT 1A7 et/ou 1A6 (sensibles à l'induction par le 3-MC) pourraient être impliquées dans la production de l'AMPG alors que les UGT 1A1 et/ou 2B1 (induites par le phénobarbital) interviendraient dans la formation de l'AMPaG.

III.2.2. Métabolisme de phase I de l'AMP in vitro

Les microsomes de foie et de rein humains ont la capacité de produire M-3 en présence de NADPH, confirmant qu'il s'agit bien d'un métabolite de phase I produit par les enzymes du CYP 450. Les conditions les plus favorables pour la production du métabolite ont été déterminées (Fig.17). La quantité de M-3 augmente de façon linéaire avec la durée d'incubation et la concentration protéique.

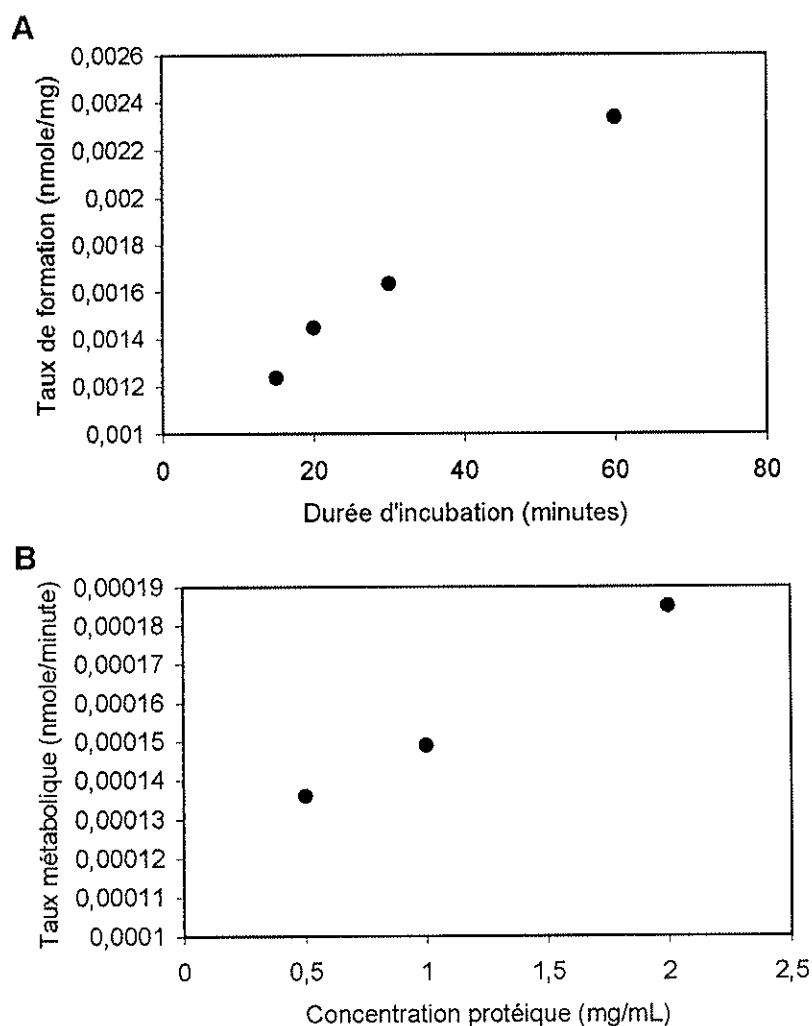


Figure 17 : Effet de la durée d'incubation (A) et de la concentration protéique (B) sur la production du métabolite M-3 par des microsomes humains hépatiques

Les incubations ont été réalisées en 30 minutes et avec une concentration de la suspension microsomales de 2 mg/mL.

La vitesse de formation du métabolite en fonction de la concentration d'AMP ne suit pas une cinétique Michaelienne mais peut être représentée par l'équation de Hill (Fig.18), correspondant à l'équation de Michaelis-Menten pour n sites enzymatiques.

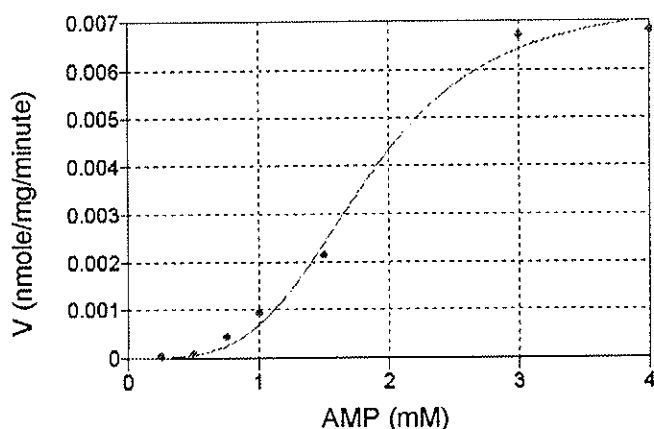


Figure 18 : Vitesse de formation du 6-O-desméthyl-AMP en fonction de la concentration d'AMP et courbe ajustée aux données expérimentales selon l'équation de Hill. (logiciel WINREG, Dr Jean Debord)

Plusieurs isoformes seraient donc impliquées *in vitro* dans la production de ce métabolite. L'affinité globale déterminée à partir de l'équation de Hill est faible ($K_m = 1,83 \pm 0,15$) avec une vitesse maximale de $0,0074 \pm 0,0005$ nmole/mg/minute et un nombre de site égale à $3,8 \pm 0,7$.

III.2.2.1. Identification des CYP 450 humains impliqués dans la formation du 6-O-desméthyl-AMP *in vitro*.

L'AMP a été incubé en présence de cellules embryonnaires de rein humain transfectées avec les principales isoformes de CYP 450 impliquées dans le métabolisme des xenobiotiques chez l'homme (1A1, 1A2, 2A6, 2D6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2E1, 2E1-2, 3A4, 3A5, et 3A7). Le 6-O-desméthyl-AMP n'a été retrouvé que dans le surnageant de culture des cellules transfectées 3A4. C'est donc le CYP 3A4 qui est vraisemblablement impliqué dans la production du 6-O-desméthyl-AMP chez l'homme.

IV. DISCUSSION

L'AMP, métabolite actif du MMF, est de plus en plus utilisé dans la prévention et le traitement des rejets de greffes d'organes en association avec d'autres immunosuppresseurs tels que la ciclosporine ou le tacrolimus. Son métabolisme est supposé impliqué dans un certain nombre d'interactions médicamenteuses, mais la connaissance de la nature des métabolites et des voies de biotransformation de l'AMP, bien qu'ayant fait l'objet de plusieurs études, reste imparfaite.

Ce travail permet de confirmer la présence et la nature des métabolites précédemment connus de l'AMP (Fig.19) : l'AMP-7-O-phényl-glucuronate, l'AMP-acyl-glucuronate et l'AMP-phényl-glucoside ont pu être identifiés *in vitro* après production sur microsomes humains, ainsi que dans l'urine et le sérum de patients traités, par la technique de LC-MS/MS. Cette étude suggère également l'existence d'une diastéréoisomérisation concernant l'AMPG. Le deuxième pic chromatographique de glucoside de l'AMP détecté *in vivo*, mais pas *in vitro*, pourrait correspondre soit à l'acyl-glucoside soit à l'isomère *cis* de l'AMPGl. En effet, la différence entre les temps de rétention des deux isomères d'AMPG est proche de celle des deux glucosides.

L'étude des voies de fragmentation des deux glucuronates ou des deux glucosides de l'AMP ne permettant pas de les différencier, l'utilisation complémentaire de la RMN semble indispensable pour confirmer formellement leurs structures, comme elle nous a permis de confirmer l'implantation en position 7 du résidu glucuronate sur l'AMPG. La limite à l'utilisation de cette technique réside dans les quantités élevées et la pureté des produits nécessaires à l'analyse, difficiles à obtenir pour des métabolites minoritaires purifiés à partir de milieux biologiques. L'optimisation de la technique de purification ou le recours à une production *in vitro* des métabolites est souhaitable pour obtenir cette confirmation par RMN.

L'existence d'un métabolite de phase I produit par les enzymes du CYP 450 a pu être vérifiée *in vitro* et à partir d'échantillons d'urine et de sérum de patients traités. Le métabolite M-3 a été identifié par LC-MS/MS comme le 6-O-desméthyl-AMP. Ce métabolite est secondairement métabolisé en deux glucuronates proposés comme étant le 6-O-desméthyl-AMP-acyl-glucuronate et le 6-O-desméthyl-AMP-phényl-glucuronate.

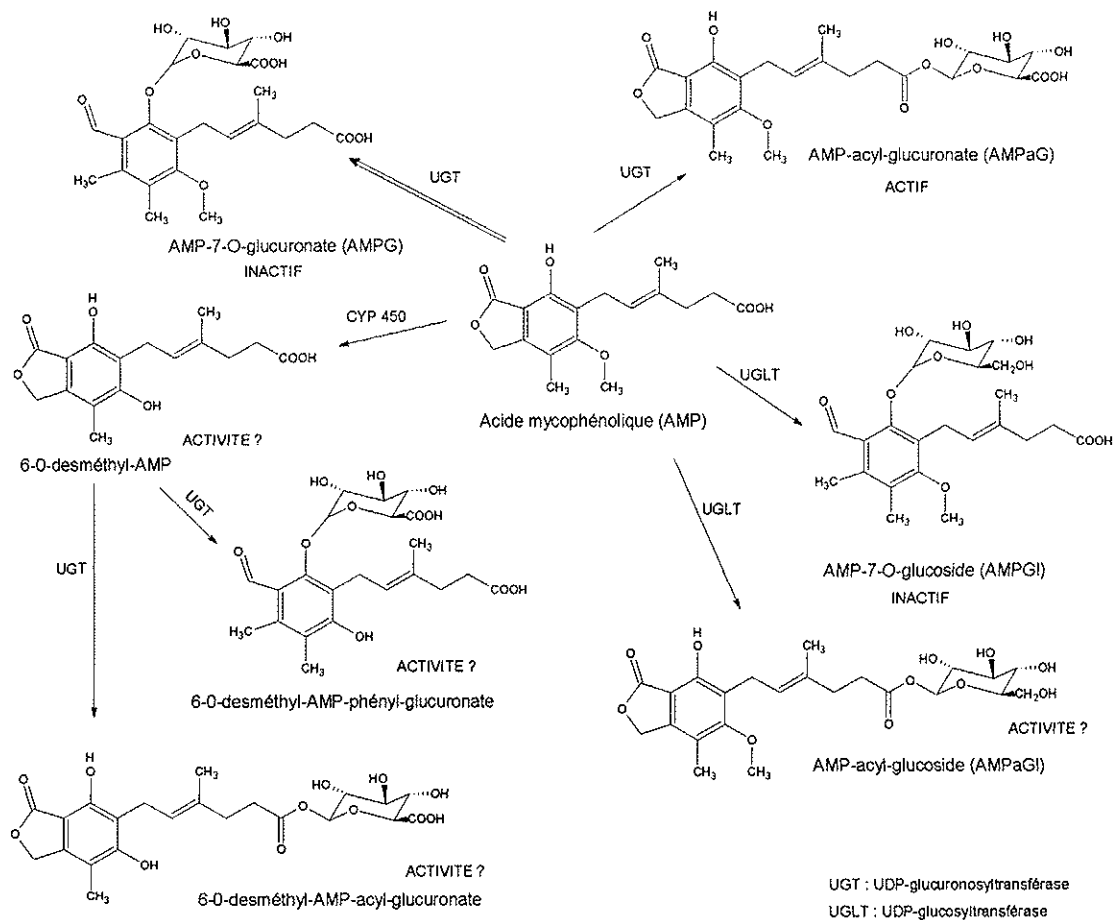


Figure 19 : métabolites de phase I et de phase II de l'AMP identifiés à l'issue de ce travail

L'existence de ces métabolites doit être prise en compte, une très récente étude de Shipkova et col. (2002) concluant à un rôle non négligeable de l'AMPaG dans le traitement immunosuppresseur par le MMF. La toxicité des acyl-glucuronates (Ritter, 2000) est également à considérer : en effet, un certain nombre d'effets secondaires au traitement par MMF, notamment digestifs, pourrait être attribué à ces métabolites. Concernant l'étude des isoformes d'UGT impliquées dans le métabolisme de l'AMP, l'utilisation de microsomes de rats ne permet d'obtenir que des résultats difficilement extrapolables *in vivo*, ce qui la rend discutable. Cependant, en l'absence d'inhibiteurs spécifiques connus d'isoformes d'UGT comme c'est le cas pour les CYP 450, ce modèle d'induction paraît tout de même intéressant. Cette technique nous a permis d'élaborer de nouvelles hypothèses qui devront être confirmées. Il apparaît indispensable de renouveler les incubations sur un panel plus large de microsomes de rats induits et éventuellement de réaliser des incubations avec des substrats de référence permettant d'avoir un contrôle de l'induction.

Les résultats de détermination des paramètres cinétiques des microsomes hépatiques humains pour la formation du 6-O-desméthyl-AMP, métabolite connu mais non identifié de l'AMP, laissent supposer que plusieurs isoformes du CYP 450 seraient impliquées dans sa formation *in vitro*, avec une faible affinité. L'incubation de l'AMP à 1mM en présence de lignées cellulaires transfectées avec les isoformes de CYP 450 laisse supposer que le CYP 3A4 est l'isoforme majoritairement impliquée. Il est possible que le métabolite ne soit pas produit en quantité suffisante par les autres iso-enzymes pour être détecté ou que les incubations réalisées sur microsomes, impliquant de plus fortes concentrations d'AMP, fassent intervenir des isoformes qui ne seraient pas impliquées *in vivo*. A noter que ce métabolite n'a été retrouvé que dans un échantillon de sérum de patients sur 2 et dans trois échantillons d'urines sur 7. Un lien éventuel entre cette présence inconstante et le phénotype d'oxydation du CYP 3A4 reste à étudier.

L'existence de ce métabolisme de phase I de l'AMP faisant appel au CYP 450 3A4, même minoritaire, est à prendre en compte. Des études *in vitro* sont souhaitables pour étudier le rôle de cette voie métabolique dans les interactions avec la ciclosporine et le tacrolimus, tous deux métabolisés par les CYP 450 3A.

V. PERSPECTIVES

Ces résultats seront complétés par une confirmation structurale des métabolites par RMN, après production *in vitro* en quantité et purification par HPLC préparative.

D'autres travaux sont nécessaires pour confirmer et approfondir les résultats obtenus à partir de microsomes de rats induits, afin d'identifier les isoformes d'UGT impliquées dans la synthèse d'AMPG et d'AMPaG.

Il apparaît important d'étudier *in vitro* l'influence de la ciclosporine, du tacrolimus et du sirolimus sur la production du 6-O-desméthyl-AMP et réciproquement.

L'étude de la réaction croisée de ces métabolites avec les anticorps anti-AMP utilisés dans la méthode immuno-chimique de dosage de l'AMP (EMIT, Dade-Behring) est souhaitable.

Enfin il serait important d'étudier l'action des métabolites sur l'IMPDH en présence (interaction) et en absence (activité intrinsèque) d'AMP. Ces deux dernières expérimentations nécessiteront au préalable la purification en grande quantité de chacun des métabolites.

Références bibliographiques

Beaune P.H., Lorient A.M. *Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques*. Med. Sci., **16** : 1051-1056, 2001.

Bowalgaha K., Miners J.O. *The glucuronidation of mycophenolic acid by human liver, kidney and jejunum microsomes*. Br. J. Clin. Pharmacol., **52** : 605-609, 2001.

Bradford M.M. *A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., **72** : 248-254, 1976.

Braun F., Christians U., Laabs S., Elias K., Shipkova M., Schütz E., Ringe B. *An ex vivo model to study the intestinal biotransformation of immunosuppressives*. Transplant. Proc., **32** : 2536, 2000.

Bullingham R., Nicholls A.J., Kamm B.R. *Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofétil*. Clin. Pharmacokinet., **34** : 429-455, 1998.

Cilia A., Costa N., Durand A., Pisano P. *Intérêt du suivi thérapeutique du mycophénolate mofétil*. La lettre du pharmacologue, **16** : 5-11, 2002

Catania V.A., Dannenberg A.J., Luquita M.G., Sanchez Pozzi E.J., Tucker J.K., Yang E.K., Mottino A.D. *Gender-related differences in the amount and functional state of rat liver UDP-glucuronosyltransferase*. Biochem.pharmacol., **50** : 509- 514, 1995.

Crespi C. L. et Miller V.P. *The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes state of the art and prospects for the future*
Pharmacology and Therapeutics., **84** : 121-131, 1999.

Debrauwer L. *Use of LC-MS-MS for xenobiotic metabolism studies in animals*. Analisis, **28** : 914-920, 2000.

Dragacci S., Thomassin J., Magdalou J., Souhaili E.L., Amri H., Boissel P., Siest G. *Properties of human hepatic UDP-glucuronosyltransferase. Relationship to other inducible enzymes in patients with cholestasis.* Eur. J. Clin. Pharmacol., **32** : 485-491, 1987.

Hardman, J.G., Limbird, L.E, *Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments.* Goodman & Gilman. p 1290-91. 9^{ème} éd, 1998

Hübner G.I., Eismann R., Sziegoleit W. *Drug interaction between mycophenolate mofetil and tacrolimus detectable within therapeutic mycophenolic acid monitoring in renal transplant patients.* Ther. Drug. Monit., **21** : 536-539, 1999.

Mackenzie P.I. *Identification of uridine diphosphate glucuronosyltransferases involved in the metabolism and clearance of mycophenolic acid.* Ther. Drug. Monit., **22** : 10-13, 2000.

Mojarrabi B., Mackenzie P.I. *The human UDP glucuronosyltransferase UGT1A10 glucuronidates mycophenolic acid.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **238** : 775-778, 1997.

Morisette P., Albert C., Busque S., St-Louis G., Vinet B. *In vivo higher glucuronidation of mycophenolic Acid in male than in female recipients of a cadaveric kidney allograft and under immunosuppressive therapy with mycophenolate mofetil.* Ther. Drug. Monit., **23** : 520-525, 2001.

Nowak I., Shaw L.M. *Effect of mycophenolic acid glucuronide on inosine monophosphate dehydrogenase activity.* Ther. Drug. Monit., **19** : 358-360, 1997.

Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D.W. *P450 superfamily: up-date on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomen-clature.* Pharmacogenetics **6**, 1-42, 1996.

Radomska-Pandya A., Czernik P.J., Little J.M., Battaglia E., Mackenzie P.I. *Structural and functional studies of UDP glucuronosyltransferases.* Drug. Metab. Rev., **31** : 817-899, 1999.

Ritter J.K. *Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions*. Chem. Biol. Interact., **129** : 171-193, 2000.

Schütz E., Shipkova M., Armstrong V.W., Niedman P.D., Weber L., Tönshoff B., Pethig K., Wahlers T., Braun F., Ringe B., Oellerich M. *Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: comparison of HPLC and immunoassay reveals new MPA metabolites*. Transplant. Proc., **30** : 1185-1187, 1998.

Schütz E., Shipkova M., Armstrong V.W., Wieland E., Oellerich M. *Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil*. Clin. Chem., **45** : 419-422, 1999.

Schütz E., Shipkova M., Wieland E., Niedmann P.D., Armstrong V.W., Oellerich M. *Evaluation of an immunoassay for mycophenolic acid*. Ther. Drug Monit., **22** : 141-142, 2000.

Shipkova M., Armstrong V.W., Weber L., Niedmann P.D., Wieland E., Haley J., Tonshoff B., Oellerich M. *Pharmacokinetics and protein adduct formation of the pharmacologically active acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients*. Ther. Drug. Monit. **24**: 390-399, 2002.

Shipkova M., Armstrong V.W., Wieland E., Niedmann P.D., Schütz E., Brenner-Weib G., Voihsel M., Braun F., Oellerich M. *Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil*. Br. J. Pharmacol., **126** : 1075-1082, 1999.

Shipkova M., Stassburg C.P., Braun F., Steit F., Gröne H.-J., Armstrong V.W., Tukey R.H., Oellerich M., Wieland E. *Glucuronide and glucoside conjugation of mycophenolic acid by human liver, kidney and intestinal microsomes*. Br. J. Pharmacol., **132** : 1027-1034, 2001 (a).

Shipkova M., Wieland E., Schütz E., Wiese C., Niedmann P.D., Oellerich M., Armstrong V.W. *The acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid inhibits the proliferation of human mononuclear leukocytes*. Transplant. Proc., **33** : 1080-1081, 2001 (b).

Smak Gregoor P.J., van Gelder T., Hesse C.J., van Der Mast B.J., van Besouw N.M., Wiemar W. *Mycophenolic acid plasma concentrations in kidney allograft recipients with or without cyclosporin : a cross-sectional study*. Nephrol. Dial. Transplant., **14** : 706-708, 1999.

Spatzenegger, M. et Jaeger, W. *Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism*. Drug Metab Rev **27**, 397-417, 1995.

Strasser. S.I., Smid S.A., Mashford M.L., Desmond P.V. *Sex hormones differentially regulate isoforms of UDP-glucuronosyltransferase*. Pharm. Res., **14** : 1115-1121, 1997.

Van Gelder T., Klupp J., Barten M.J., Christians U., Morris R.E. *Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid*. Ther. Drug Monit., **23** : 119-128, 2001.

Vietri M., Pietrabissa A., Mosca F., Pacifici G.M. *Mycophenolic acid glucuronidation and its inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drugs in human liver and kidney*. Eur. J. Clin. Pharmacol., **56** : 659-664, 2000.

de Wildt S.N., Kearns G.L., Leeder J.S., van der Anker J.N. *Glucuronidation in humans : pharmacogenetic and developmental aspects*. Clin. Pharmacokinet., **36** : 439-452, 1999.

Zucker K., Rosen A., Tsaroucha A., de Faria L, Roth D., Ciancio G., Esquenazi V. Burke G., Tzakis A., Miller J. *Unexpected augmentation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant patients receiving tacrolimus and mycophenolate mofetil in combination therapy and analogous in vitro findings*. Transpl. Immunol., **5** : 225-232, 1997.

Zucker K., Tsaroucha A., Olson L., Esquenasi V., Tzakis A., Miller J. *Evidence that tacrolimus augments the bioavailability of mycophenolate mofetil through the inhibition of mycophenolic acid glucuronidation*. Ther. Drug Monit., **21** : 35-43, 1999.

Table des matières

Introduction.....	7
PREMIERE PARTIE : Métabolisme des xenobiotiques : modèles d'étude <i>in vitro</i> et outils analytiques.....	8
I. PHASES DE BIOTRANSFORMATION	9
II. LES URIDINES DIPHOSPHO-GLUCURONOSYL TRANSFERASES	11
II.1. Localisation tissulaire des UDP-glucuronosyltransférases	12
II.2. Structure des gènes et polymorphismes génétiques	12
II.3. Variations de l'activité des UDP-glucuronosyltransférases et inductibilité ...	13
II.4. Spécificité de substrats des UDP-glucuronosyltransférases.....	14
II.5. Réactions de bio-activation par glucuro-conjugaison.....	16
III. LES ENZYMES DU CYP 450.....	18
III.1. Les isoformes de CYP 450.....	19
III.2. Polymorphisme des CYP 450.....	20
III.3. CYP 450 et P-glycoprotéine	20
III.4. Interactions médicamenteuses et CYP 450.....	21
IV. ETUDES DES REACTIONS DE BIOTRANSFORMATION IN VITRO.....	23
IV.1. Utilisations des fractions sub-cellulaires.....	23
IV.2. Lignées cellulaires transfectées et enzymes recombinantes	25
IV.3. Autres modèles	26
V. ETUDE DU METABOLISME DES XENOBIOTIQUES : OUTILS ANALYTIQUES	27
DEUXIEME PARTIE : Etude <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> du métabolisme de l'acide mycophénolique chez l'homme	29
I. INTRODUCTION	30
I.1. Le mycophénolate mofétil (MMF) et l'acide mycophénolique (AMP)	30
I.1.1. <i>Mode d'action</i> 30	
I.1.2. <i>Pharmacocinétique et métabolisme</i> 31	
I.1.3. <i>Interactions médicamenteuses</i> 33	
I.2. Objectifs de l'étude.....	35
II. MATERIEL ET METHODE.....	36
II.1. Réactifs	36
II.2. Modèles biologiques <i>in vitro</i>	36
II.2.1. <i>Microsomes de rats et microsomes humains (Dragacci et col., 1987)</i> 36	

<i>II.2.2. Incubation de l'acide mycophénolique en présence de microsomes</i>	37
<i>II.2.3. Cellules transfectées avec les différentes isoformes de CYP 450</i>	37
II.3. Préparation des échantillons biologiques de patients sous MMF	38
II.4. Identification et dosage des métabolites de l'AMP	39
<i>II.4.1. Chromatographie préparative préalable à l'identification</i>	39
<i>II.4.2. Identification des métabolites par LC-MS/MS</i>	40
<i>II.4.3. Dosage de l'AMP et de ses métabolites par LC-MS</i>	40
<i>II.4.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN)</i>	41
III. RESULTATS	42
III.1. Métabolites de l'AMP dans l'urine et le sérum de patients traités	42
III.2. Métabolisme de l'AMP <i>in vitro</i>	47
<i>III.2.1. Glucuroconjugaison et glucoconjugaison de l'AMP <i>in vitro</i></i>	47
III.2.1.1. Métabolites produits sur microsomes humains	47
III.2.1.2. Influence de l'induction chimique sur la production de l'AMPG et l'AMPaG par des microsomes de rats	48
<i>III.2.2. Métabolisme de phase I de l'AMP <i>in vitro</i></i>	50
III.2.2.1. Identification des CYP 450 humains impliqués dans la formation du 6-O-desméthyl-AMP <i>in vitro</i> .	51
IV. DISCUSSION	52
V. PERSPECTIVES	55
Références bibliographiques	56

Tables des illustrations

Figure 1 : phases de biotransformations des xénobiotiques (d'après Beaune et col., 2000).....	9
Figure 2 : schéma de la réaction de glucuroconjugaison (R : groupe alkyle ; Ar : groupe Aryle ; UDP-AG : acide uridine-5'-diphospho- α D-glucuronique)	11
Figure 3 : structure du gène des UGT 1 : obtention des isoformes par épissage alternatif (D'après de Wildt et col., 1999).....	13
Figure 4 : schéma de la réaction de migration intramoléculaire du groupe acyle des acyl-glucuronates.....	16
Figure 5 : proportion des médicaments métabolisés par les principales enzymes du CYP 450, un même médicament pouvant être inclus dans plus d'une catégorie. (Hardman et Limbird, 1998)	20
Figure 6 : schéma illustrant la préparation des microsomes	24
Figure 7 : balayage des ions fils produits par fragmentation par la technique de masse en tandem.....	28
Figure 8 : structure du mycophénolate mofétil : 2-morpholinoéthyl (E)-6-(1,3)-dihydro-4-hydroxy-6-méthoxy-7-méthyl-3-oxo-5-isobenzofuranyl)-4-méthyl-4-hexénoate.....	30
Figure 9 : voies métaboliques et structures chimiques de l'acide mycophénolique et de ses conjugués (D'après Shipkova et col., 1999)	32
Figure 10 : photo du montage d'HPLC préparative.....	39
Figure 11 : chromatogramme des transitions MRM de l'AMP et des métabolites glucuro-conjugués et gluco-conjugués.....	42
Figure 12 : exemple de chromatogramme (transition MRM m/z 495 \rightarrow 319) et de spectre de fragmentations (ions produits) du composé X1, obtenus à partir de l'urine d'un patient sous MMF.....	44
Figure 13 : chromatogramme des transitions MRM des supposés M-3 (m/z 305 \rightarrow 261), M-3-phényl-glucuronate (M-3-G) et M-3-acyl-glucuronate (M-3-aG) (m/z 481 \rightarrow 305) avant (A) et après (B) traitement de 2 heures à 56° en présence de 9,8 UI/mL de β -glucuronidase dans une urine de patient traité par MMF.....	45
Figure 14 : ions, voies de fragmentation et structure supposés du métabolite M-3.....	46
Figure 15 : glucuroconjugaison de l'AMP en présence de microsomes humains hépatiques (carré) et rénaux (cercle) : effet de la concentration en protéine de la suspension microsomale (A) et du temps d'incubation (B).....	47
Figure 16 : production d'AMPG (A) ou d'AMPaG (B) par des microsomes de rats témoins et induits par du 3-méthylcholanthrène (3-MC) ou du phénobarbital (PB) en présence de 1mM d'AMP (incubations de 30 minutes à 37°C)	49
Figure 17 : Effet de la durée d'incubation (A) et de la concentration protéique (B) sur la production du métabolite M-3 par des microsomes humains hépatiques	50
Figure 18 : Vitesse de formation du 6-O-desméthyl-AMP en fonction de la concentration d'AMP et courbe ajustée aux données expérimentales selon l'équation de Hill. (logiciel WINREG, Dr Jean Debord).....	51
Figure 19 : métabolites de phase I et de phase II de l'AMP identifiés à l'issue de ce travail	53

Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- ❖ d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- ❖ d'exercer, dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- ❖ de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 325

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ