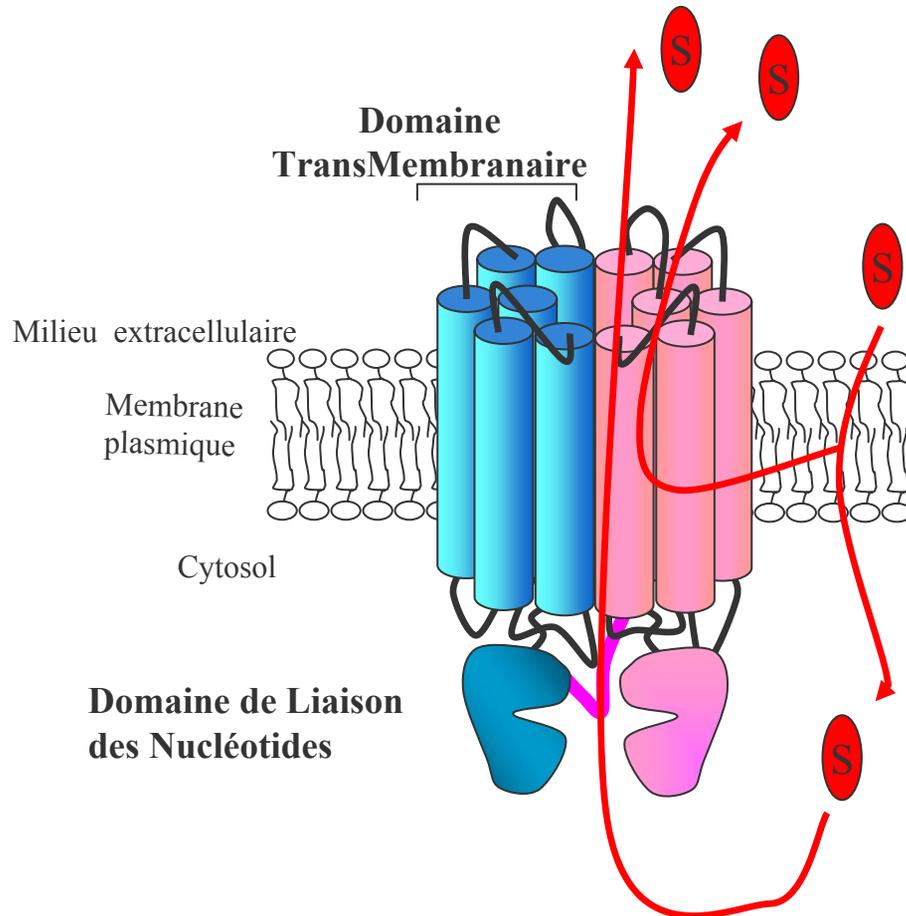


Fig 1: quel est l'élément manquant et cependant essentiel au fonctionnement de cette protéine?

P-gp = "aspirateur plasmique"



- Fig 1:**
- ↪ une molécule de P-gp \Rightarrow 25 ATP / seconde à 37°C
 - ↪ les 2 domaines de liaison à l'ATP hydrolysent l'ATP mais pas simultanément
 - ↪ stimulée par la fixation du substrat (domaines transmembranaires 4,5,6 et 10,11,12)
 - ↪ la présence des deux sites de liaison de l'ATP est indispensable au transport

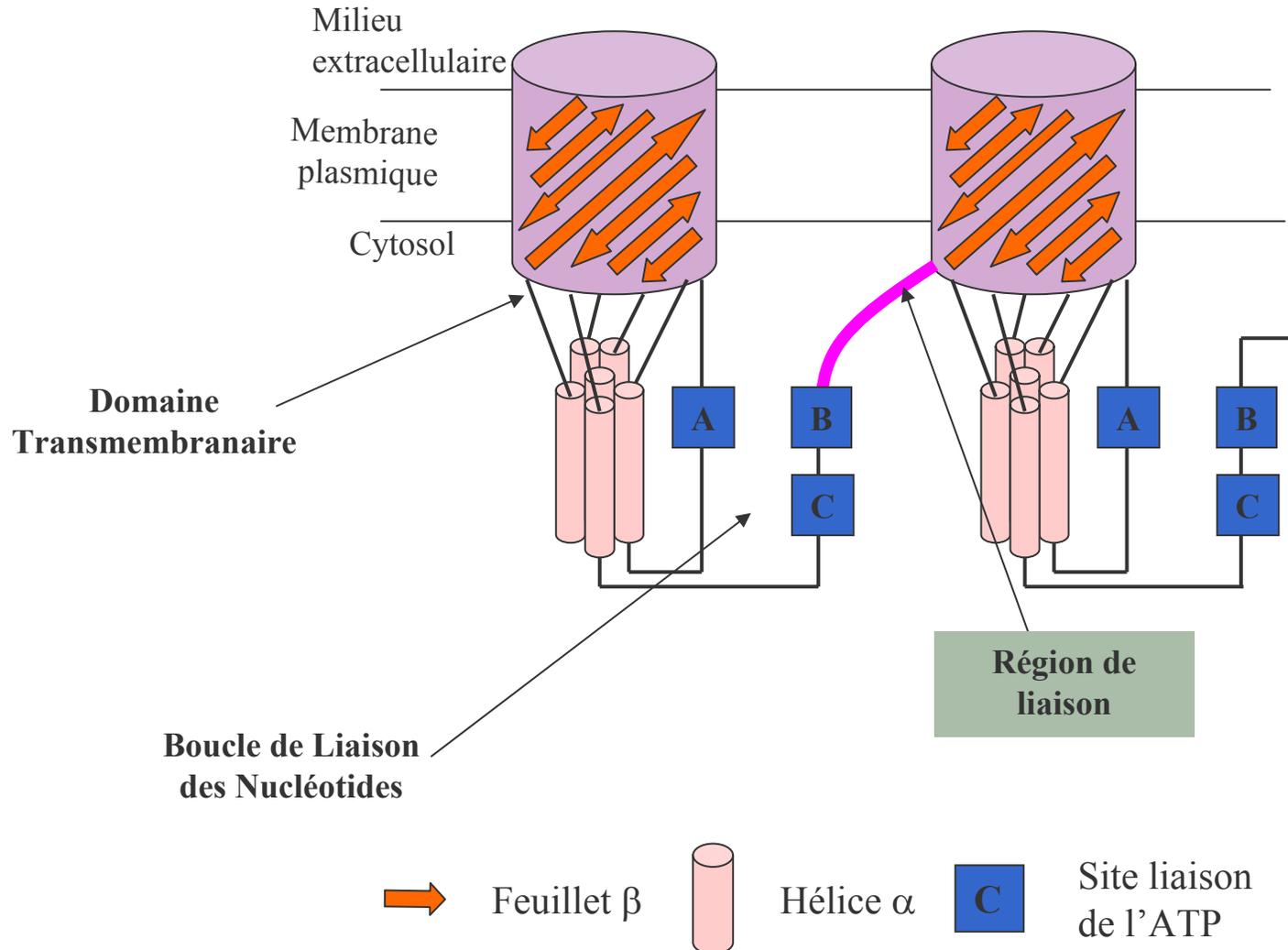


Fig 2: indiquer les principales localisations de la P-gp

- Distribution du gène *mdr1* chez la souris similaire à celle du gène équivalent chez l'homme :

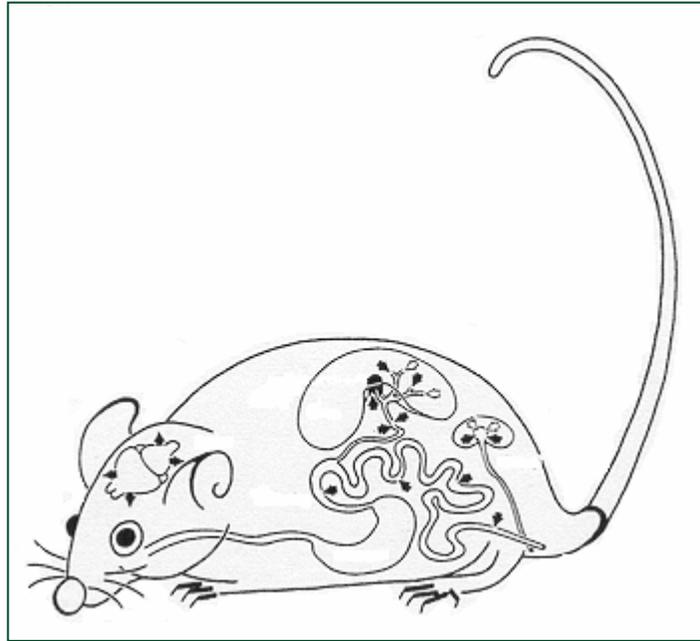


Fig 2

- Distribution du gène *mdr1* chez la souris similaire à celle du gène équivalent chez l'homme :

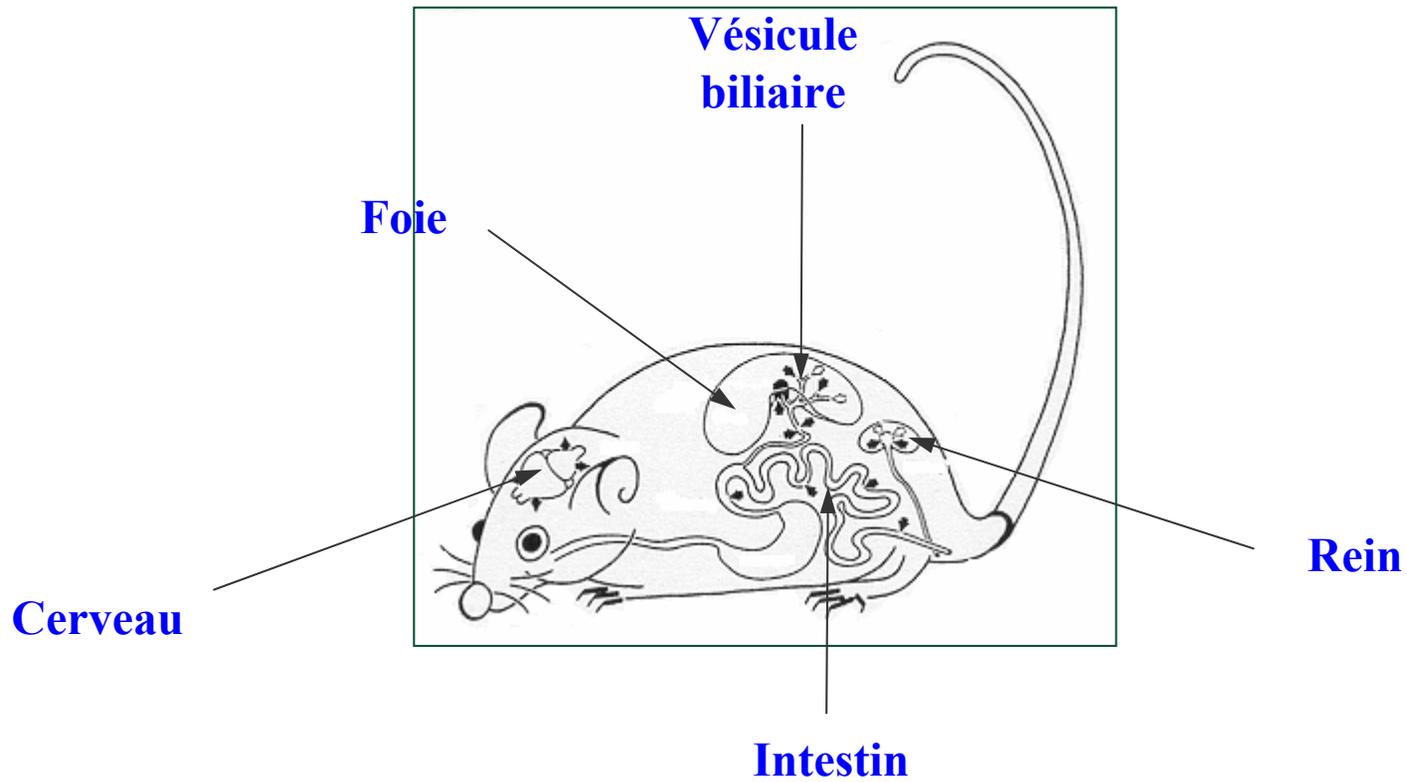
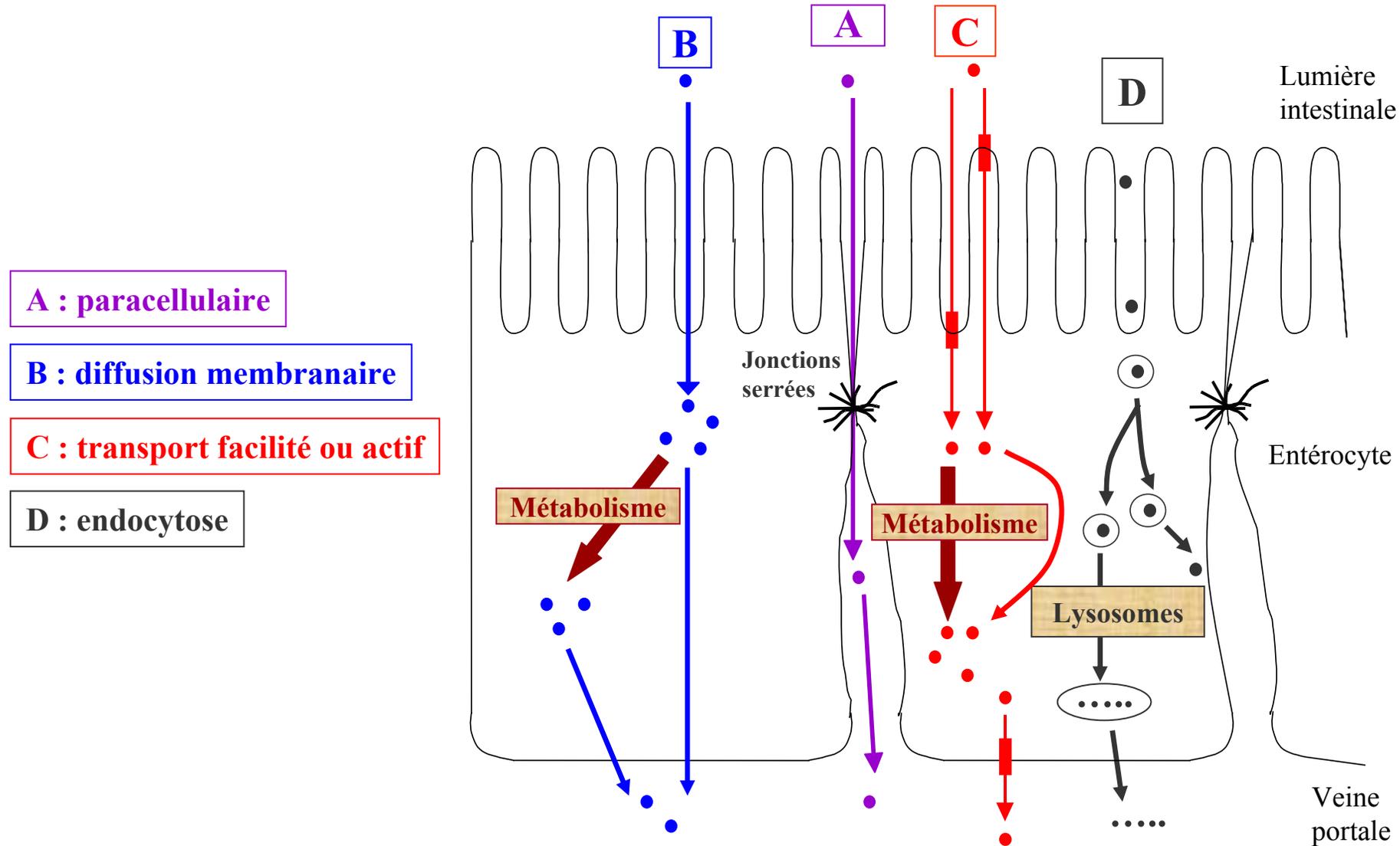


Fig 3: de quel côté de l'entérocyte se trouve la P-gp?

Voies de passage à travers la membrane intestinale :



A : paracellulaire

B : diffusion membranaire

C : transport facilité ou actif

D : endocytose

Fig 3

@ Les voies de passage à travers la membrane intestinale :

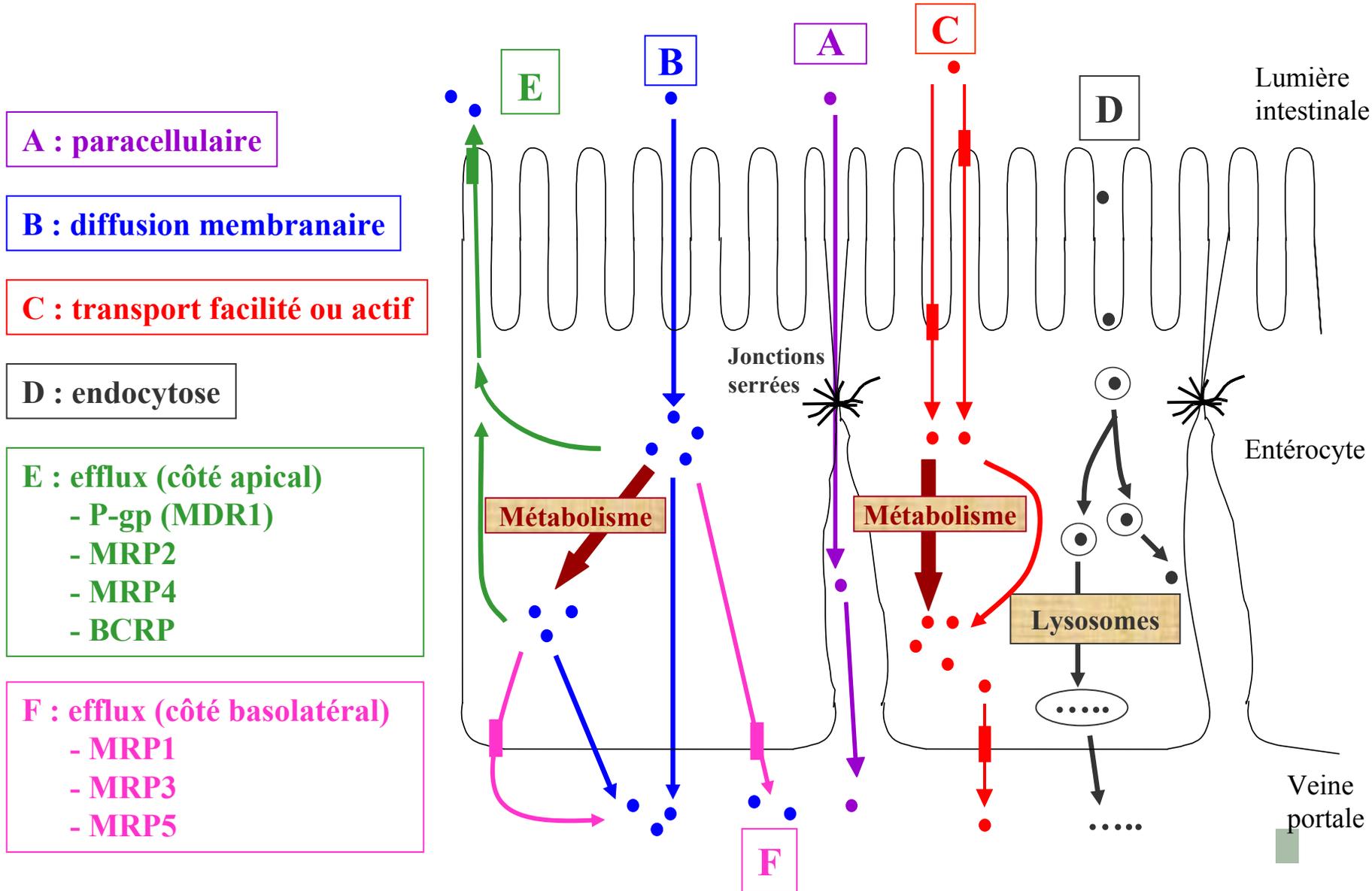


Fig 4: de quel côté de la paroi intestinale se trouve la P-gp et quel est son effet sur la biodisponibilité d'un médicament administré oralement si celui-ci est substrat de la P-gp?

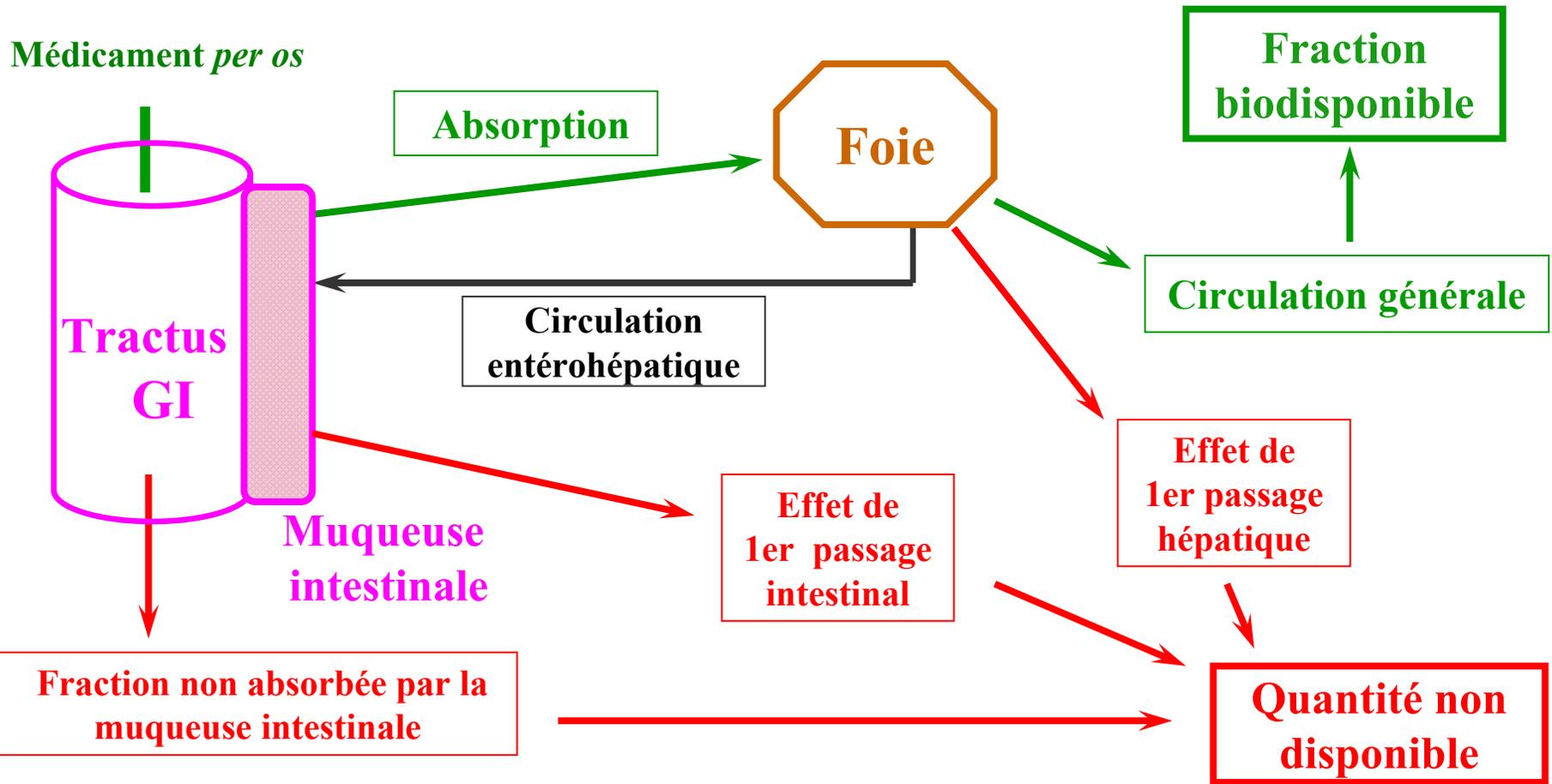


Fig 4

@ Expression tissulaire de la P-gp :

- dans les cellules cancéreuses
- au niveau de tissus sains:
 - ↪ épithéliums excrétoires glandulaires
 - ↪ endothélium vasculaire de la barrière hémato-encéphalique (BHE)
 - ↪ cellules souches hématopoïétiques, macrophages activés, polynucléaires
 - ↪ tube digestif, foie, rein, prostate

@ Expression de la P-gp au niveau du tube digestif :

- face apicale des cellules épithéliales
- augmente selon l'axe crypte-villosité
- maximum à l'extrémité des entérocytes

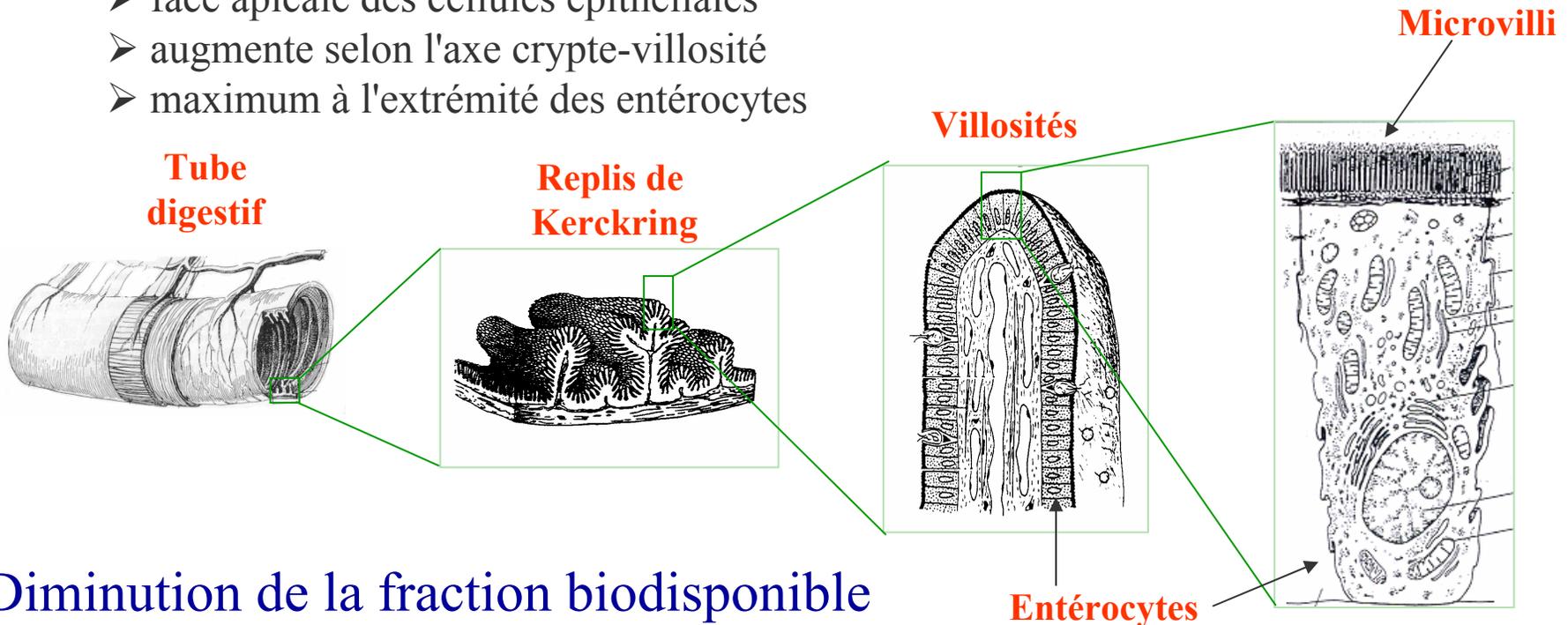


Fig 5

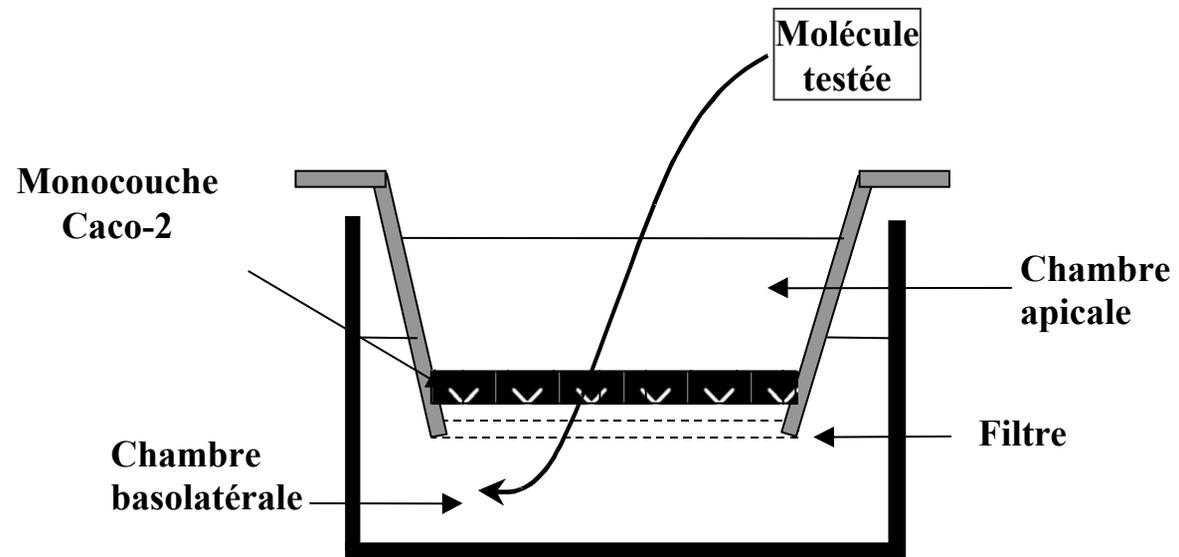


Fig 5: réponse

@ Méthodes d'études *in vitro* :

Cultures cellulaires : **cellules en monocouche Caco-2**

Dérivent de carcinomes de colon humain

- + * Différenciation en entérocytes avec des jonctions (**trop**) serrées, des microvillosités, des enzymes de la bordure en brosse (phases I et II du métabolisme)
- * Etude du flux bidirectionnel des substrats de la P-gp

- * Expression de la P-gp sur la face apicale (pb de surexpression)
- * Pas de sécrétion de mucus (pb pour PepT-1)
- * Pas de péristaltisme intestinal
- * Délai d'obtention du modèle final:2-4 sem.
- * Forte variabilité inter-laboratoires

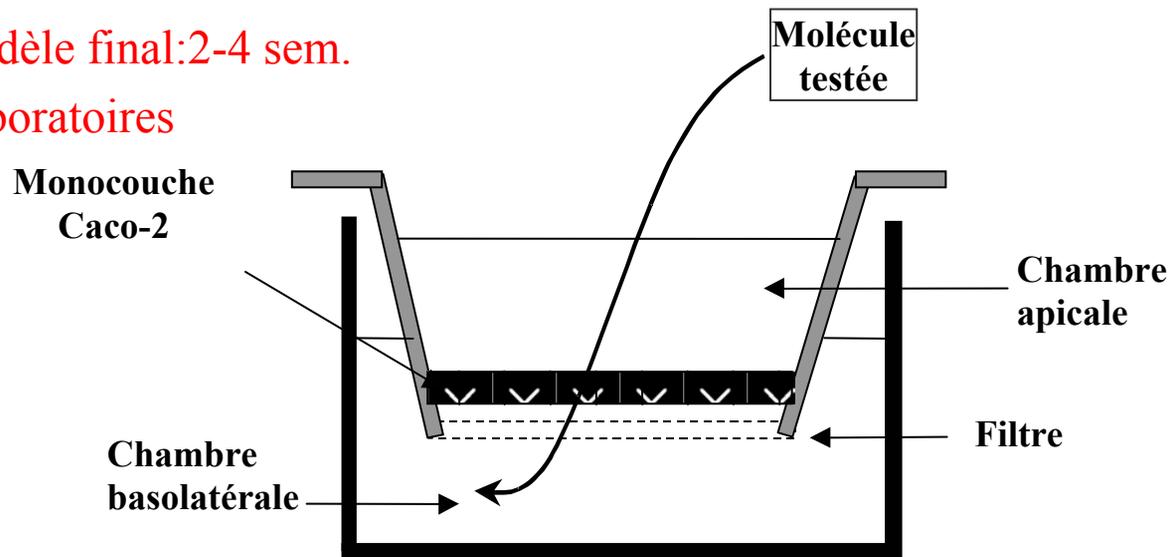


Fig 6

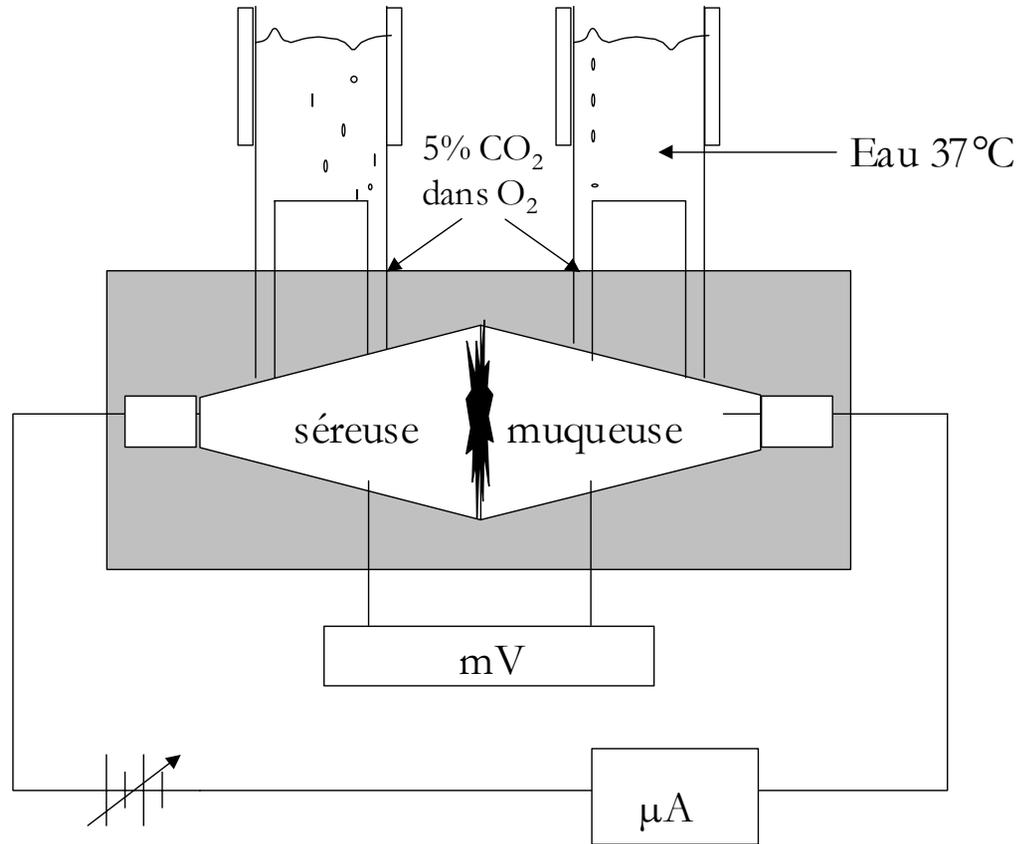
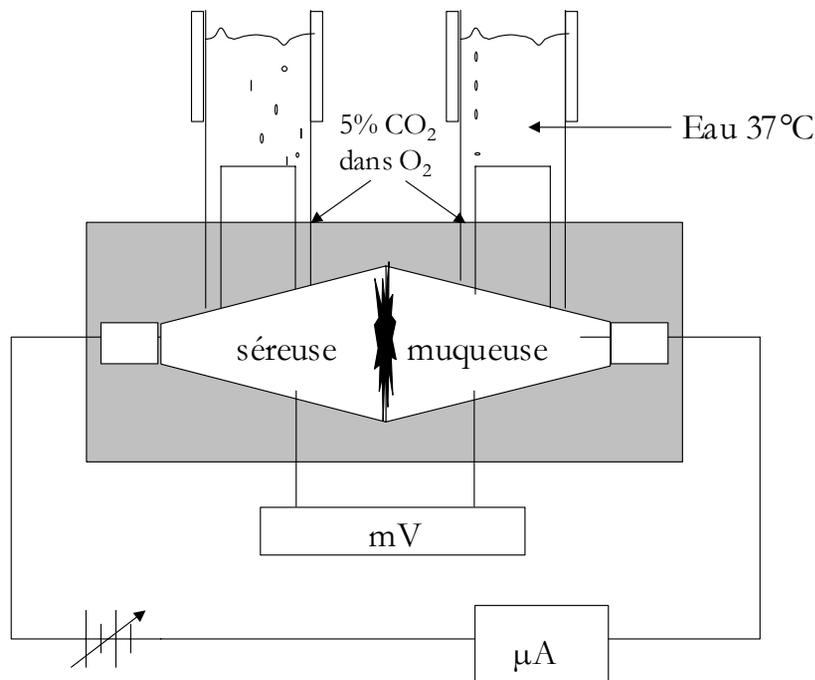


Fig 6: réponse

@ Méthodes d'études *in vitro/ex-vivo* : **chambre de Ussing**



* Surface du segment intestinal:

-0.5 cm² rat

-1.13 cm² cobaye

-3.14 cm² lapin

* Mucus



* Milieux de cultures simplistes (tampons)

* Œdème sévère de l'épithélium +
disparition des villosités épithéliales après
20 min d'incubation

* Disparition de 50-75% de l'épithélium
après 30 min d'incubation

* Rupture de la bordure épithéliale après
1h d'incubation

Fig 7

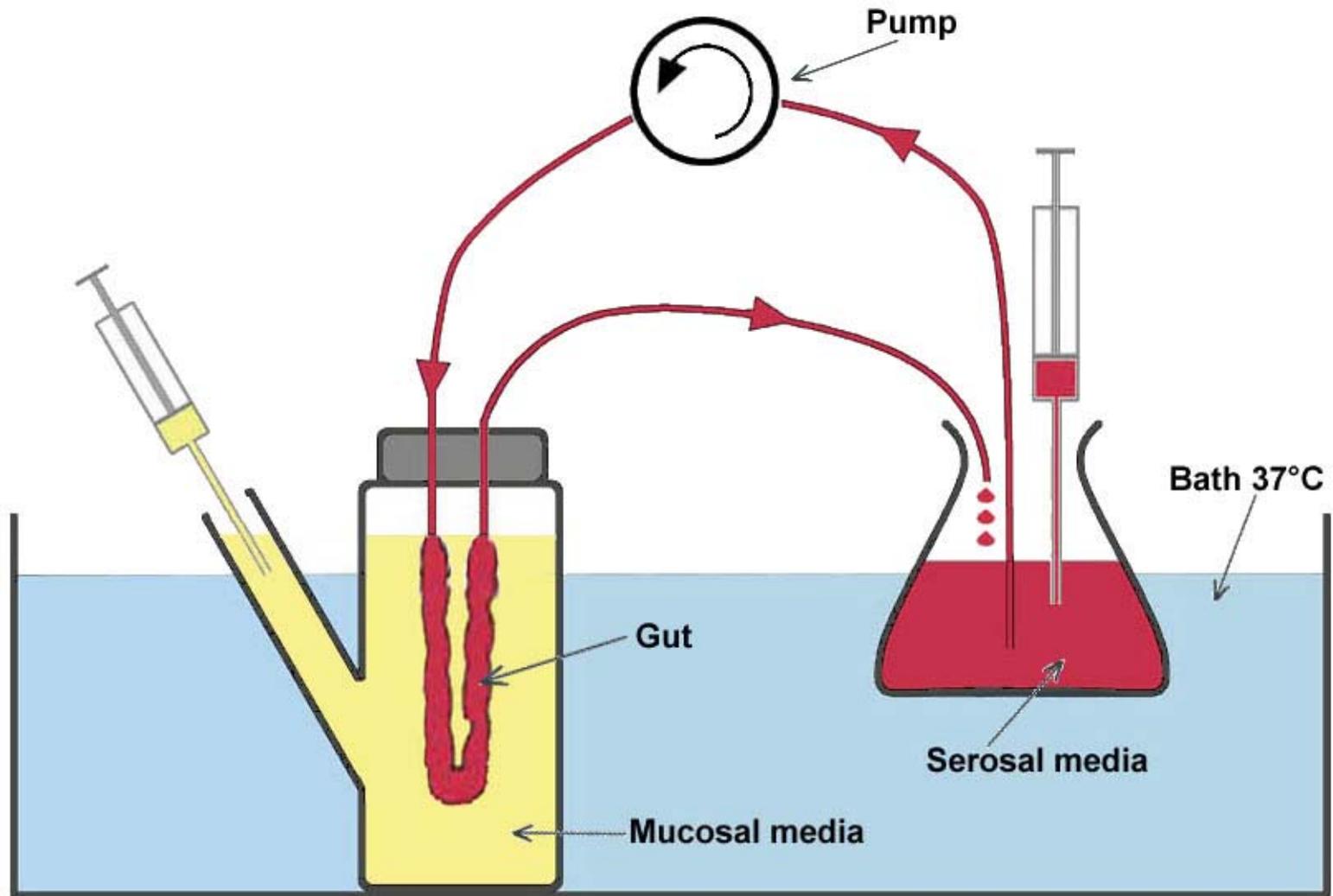


Fig 7: réponse

@ Méthodes d'études *in vitro/ex-vivo* : **Méthode du segment intestinal éversé perfusé**

- * Segment intestinal unique
- * Mucus
- * Péristaltisme intestinal+++
- * Milieu de culture riche (glucose + ac. aminés) et oxygéné
- * Modèle validé chez le rat et le porc (anatomie intestinale proche de celle homme)
- * Simulation irrigation sanguine mésentérique



- * Moindre concentration des molécules
 - ▶ pb analytique?
- * 1 animal = 1 segment = 1 donnée
 - ▶ reproduire la manip.

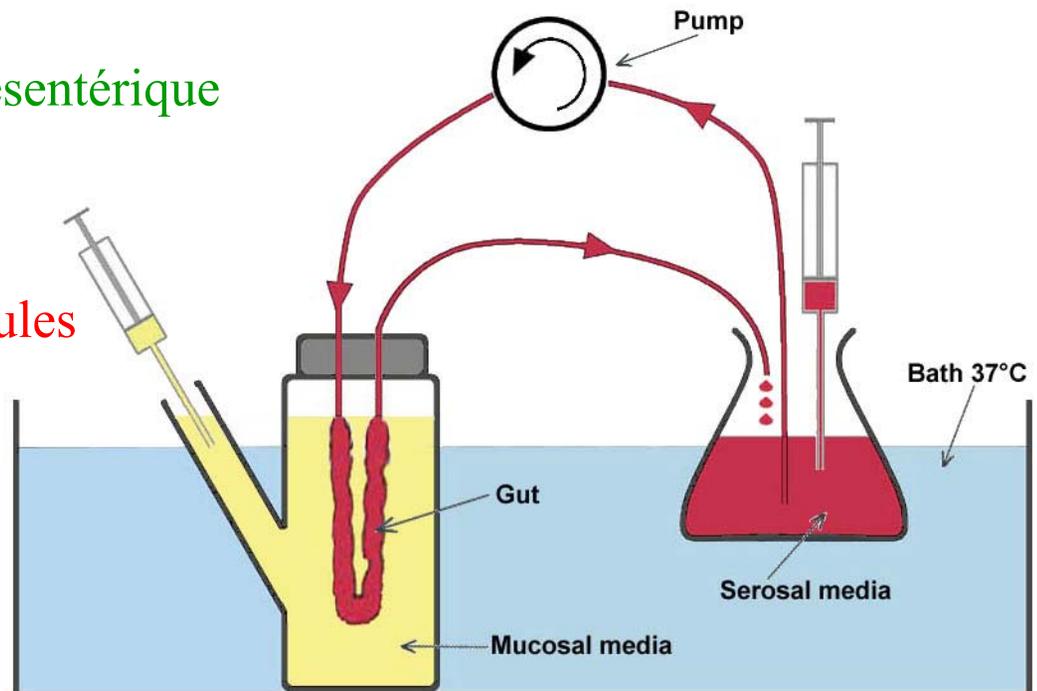


Fig 8

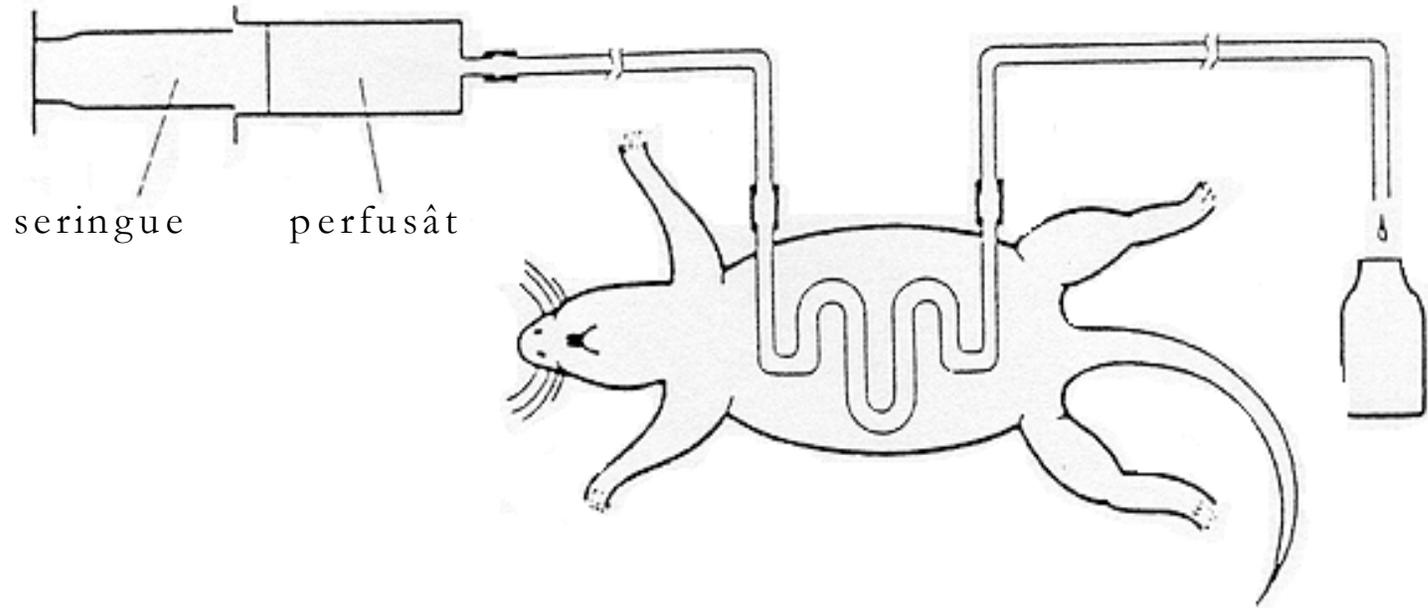
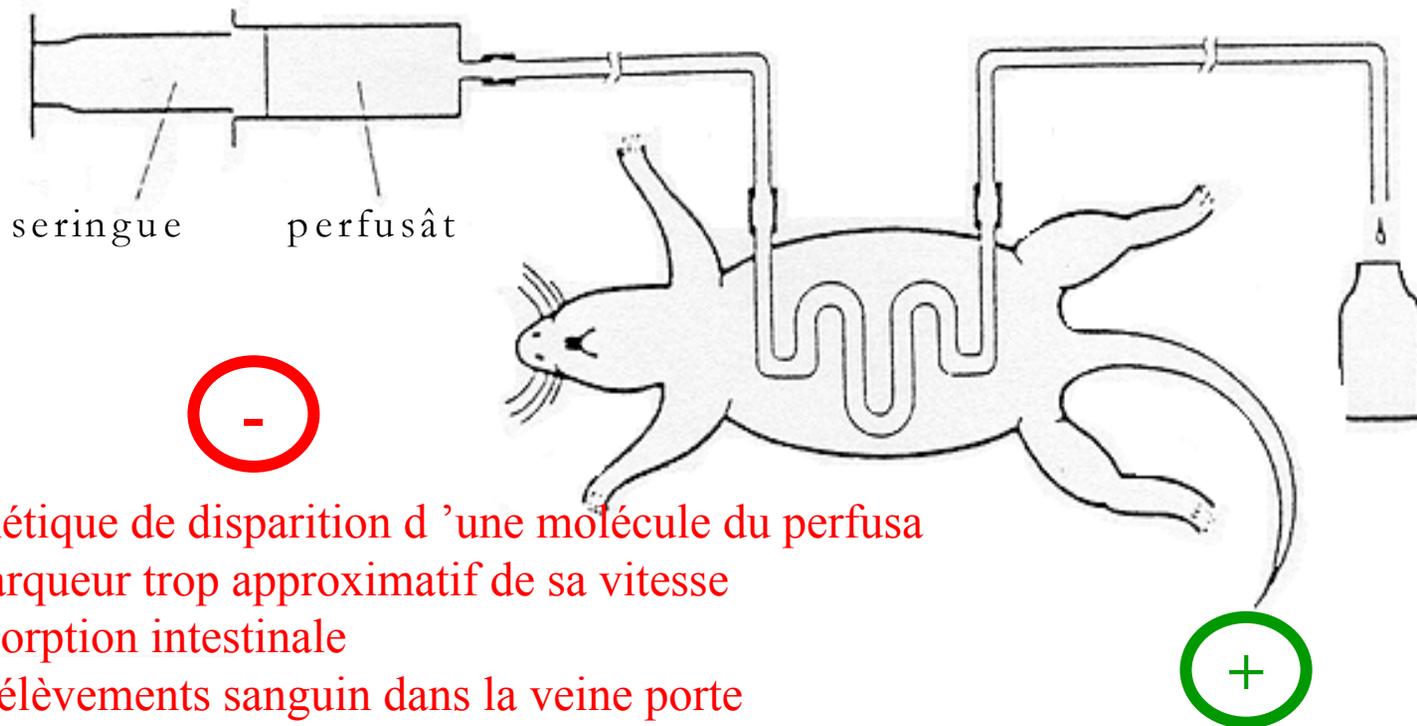


Fig 8: réponse

@ Méthodes d'études *in situ* : Système de perfusion *in situ* chez le rat



* Cinétique de disparition d'une molécule du perfusât
= marqueur trop approximatif de sa vitesse
d'absorption intestinale

▶ prélèvements sanguin dans la veine porte

* Débit de perfusion \gg valeurs physiologiques

▶ distension du segment intestinal

* 1 animal = 1 donnée

▶ reproduire la manip.

* Anesthésie + laparotomie

▶ diminution du débit sanguin intestinal + absorption

* Maintien des conditions physiologiques

• irrigation mésentérique

• innervation

• capacités métaboliques

* Modèle applicable à toutes espèces

Fig 9

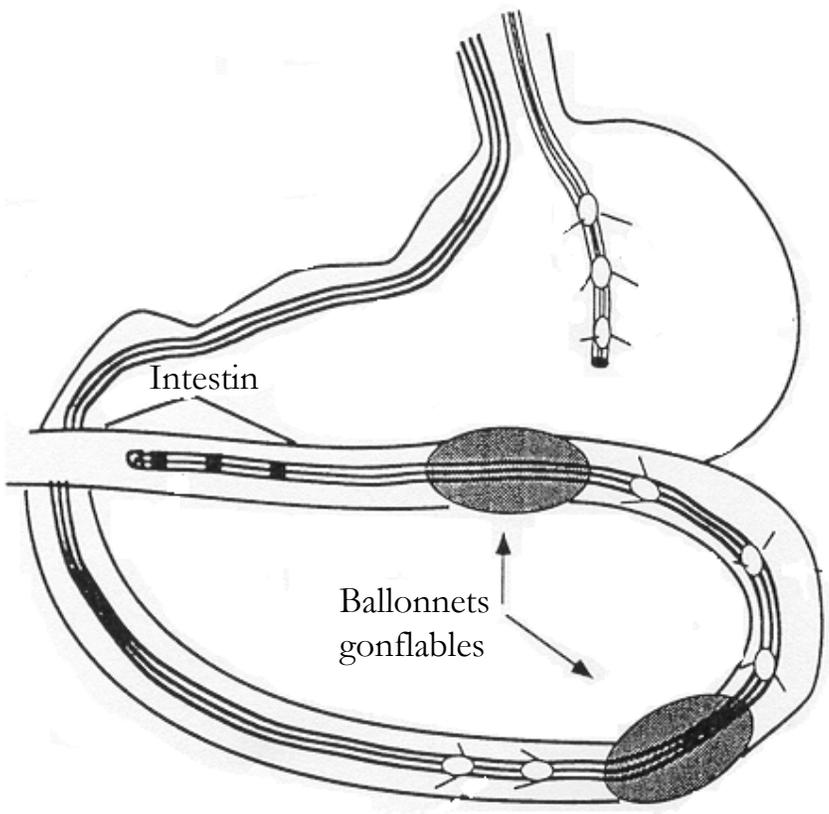
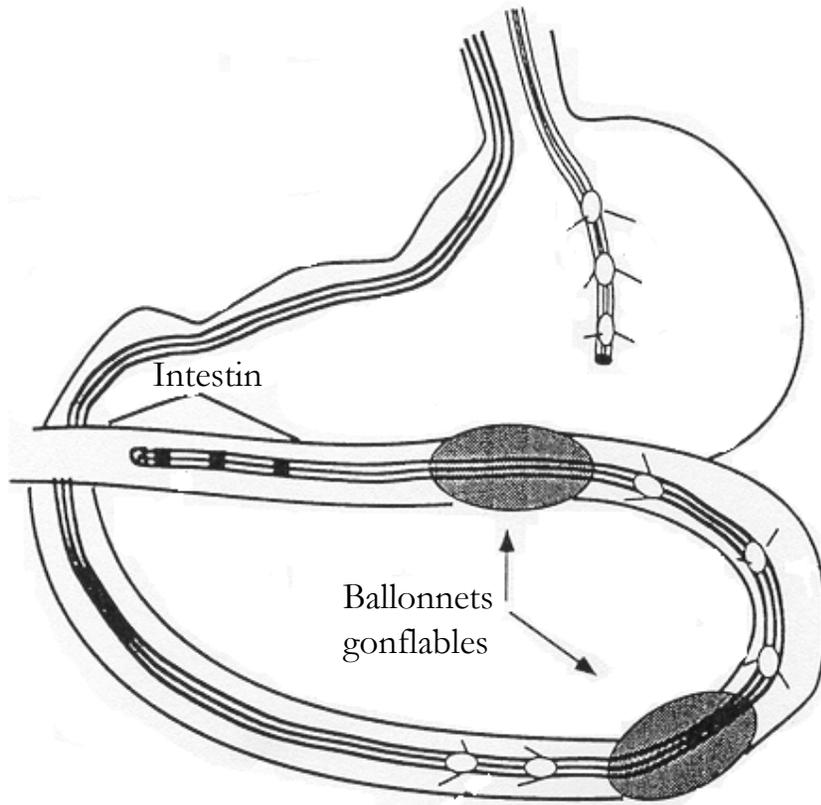


Fig 9: réponse

@ Méthodes d'études *in situ* : **Perfusion segmentaire *in situ* chez l'homme**

Système de tube multicanaux avec doubles ballonnets

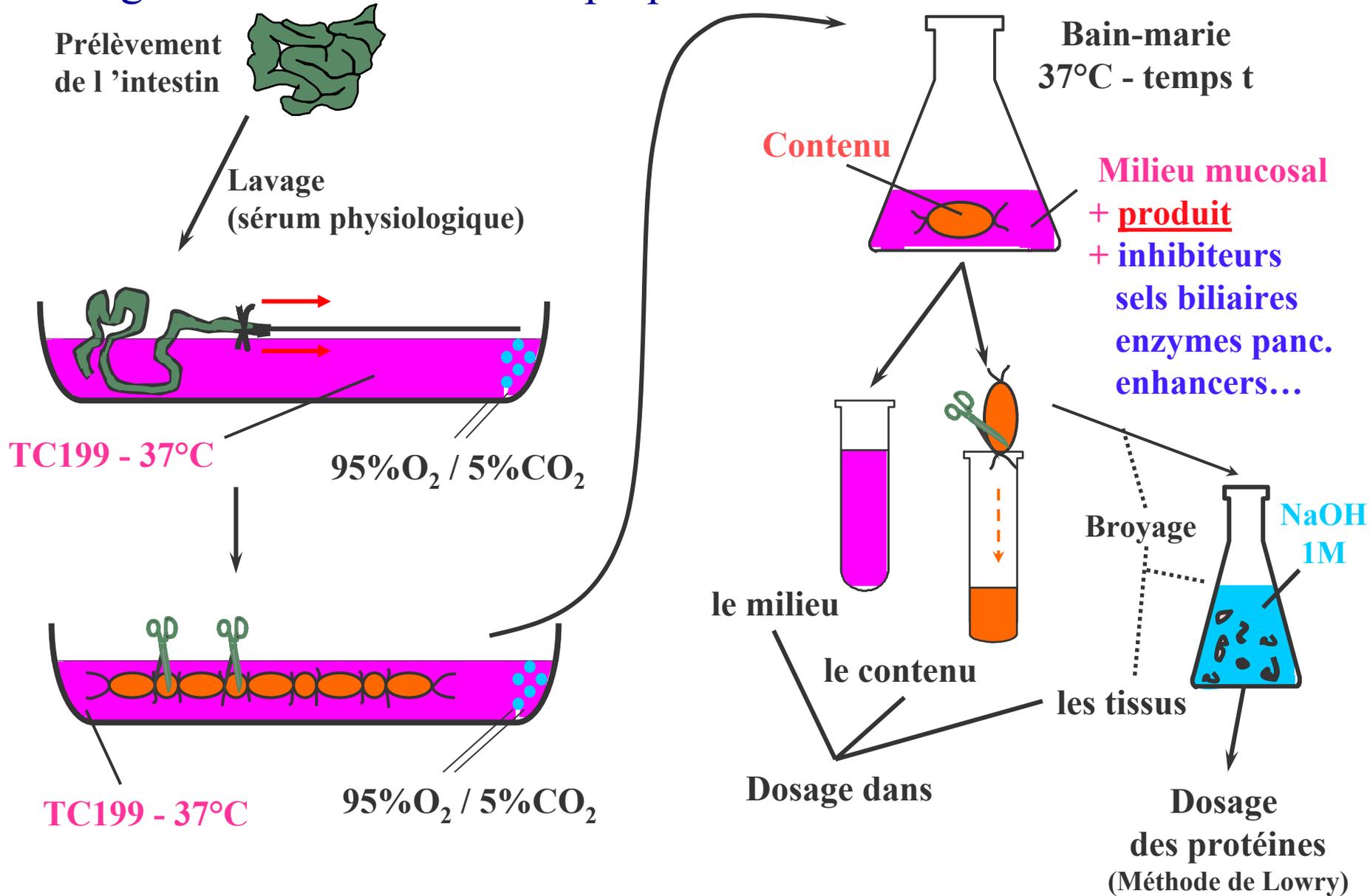


* Bonne corrélation entre le coefficient de perméabilité et la biodisponibilité *per os*



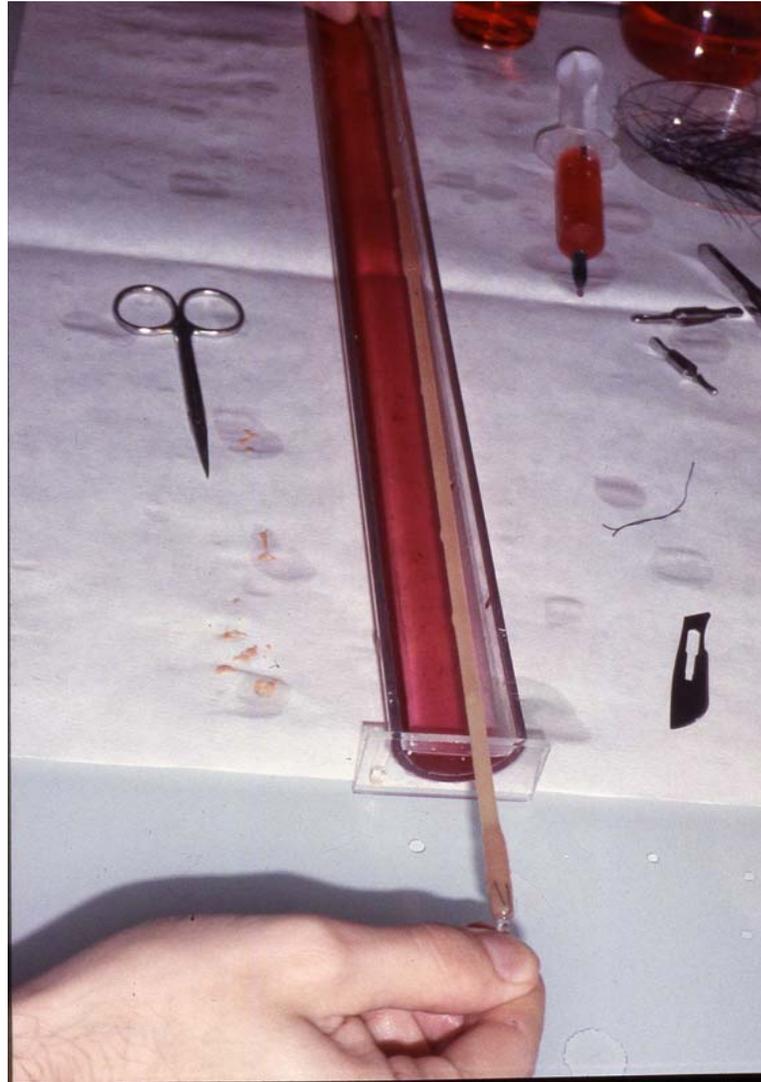
* Manip. trop lourde (anesthésie du patient)

Fig 10: attribuer le nom du modèle, présenter ses principaux avantages et inconvénient et expliquer brièvement son fonctionnement



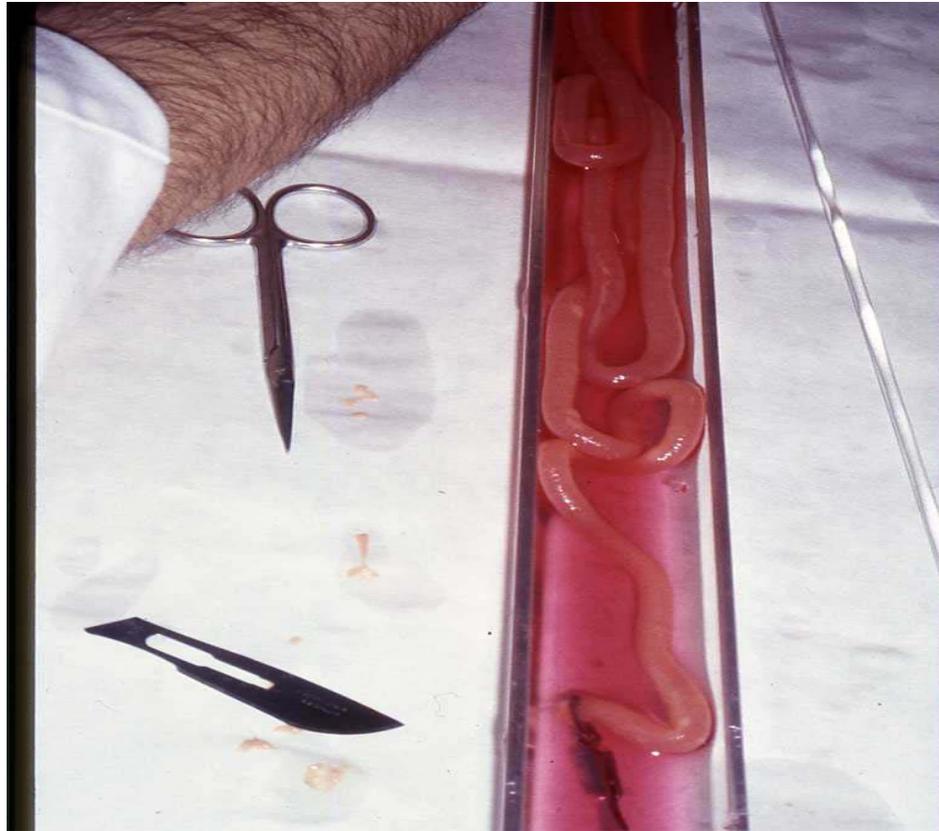
Modèle du sac intestinal éversé de rat: Technique

Eversion



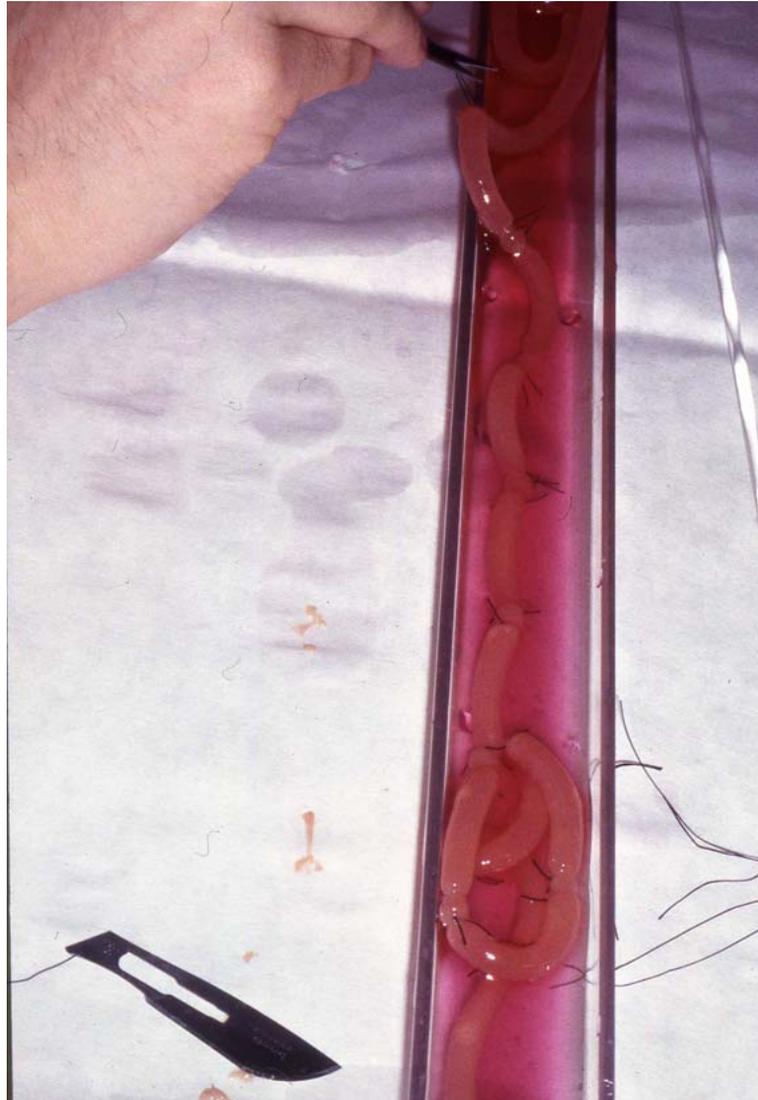
Modèle du sac intestinal éversé de rat: Technique

Remplissage



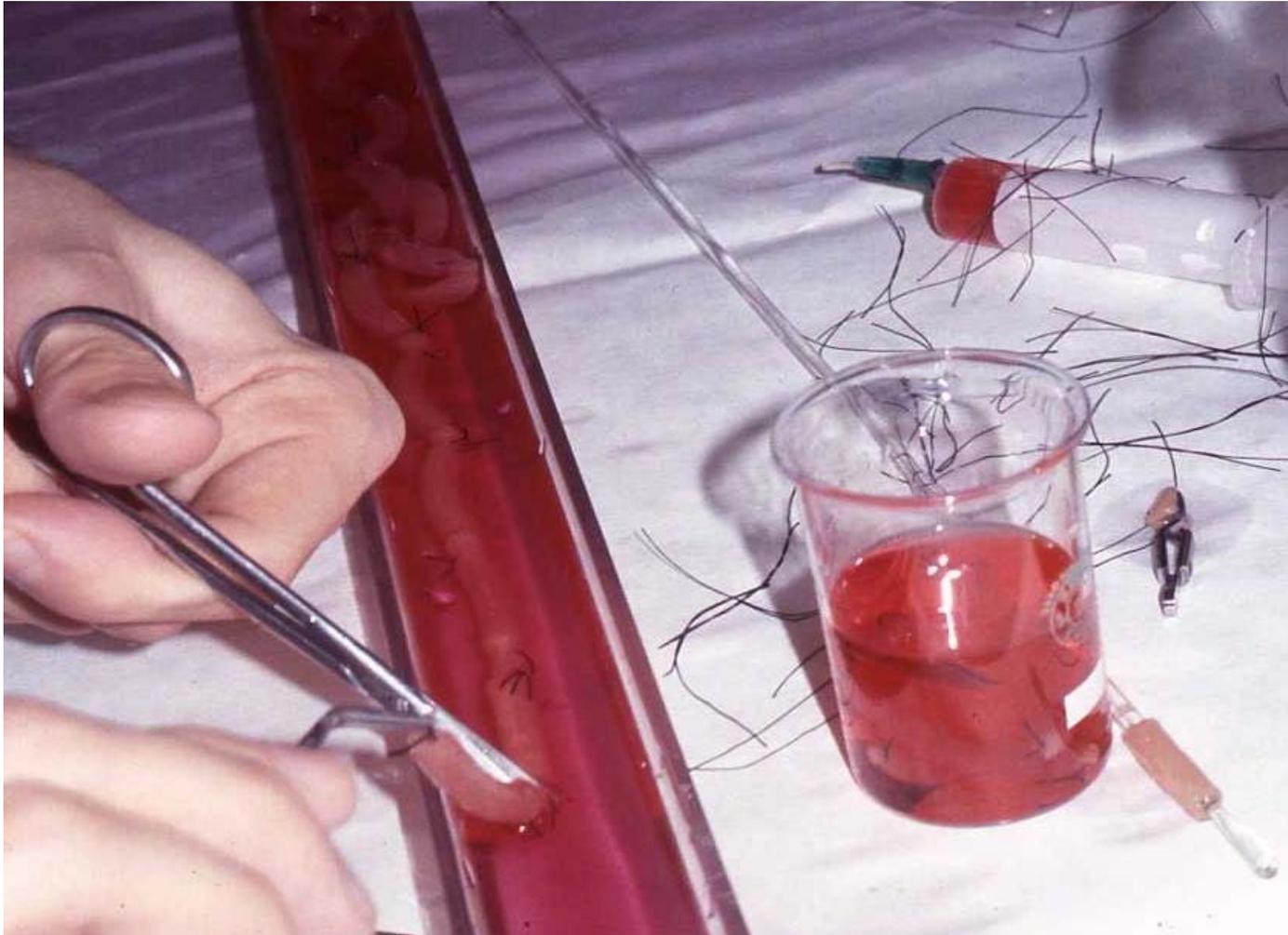
Modèle du sac intestinal éversé de rat: Technique

Préparation
des sacs (1)



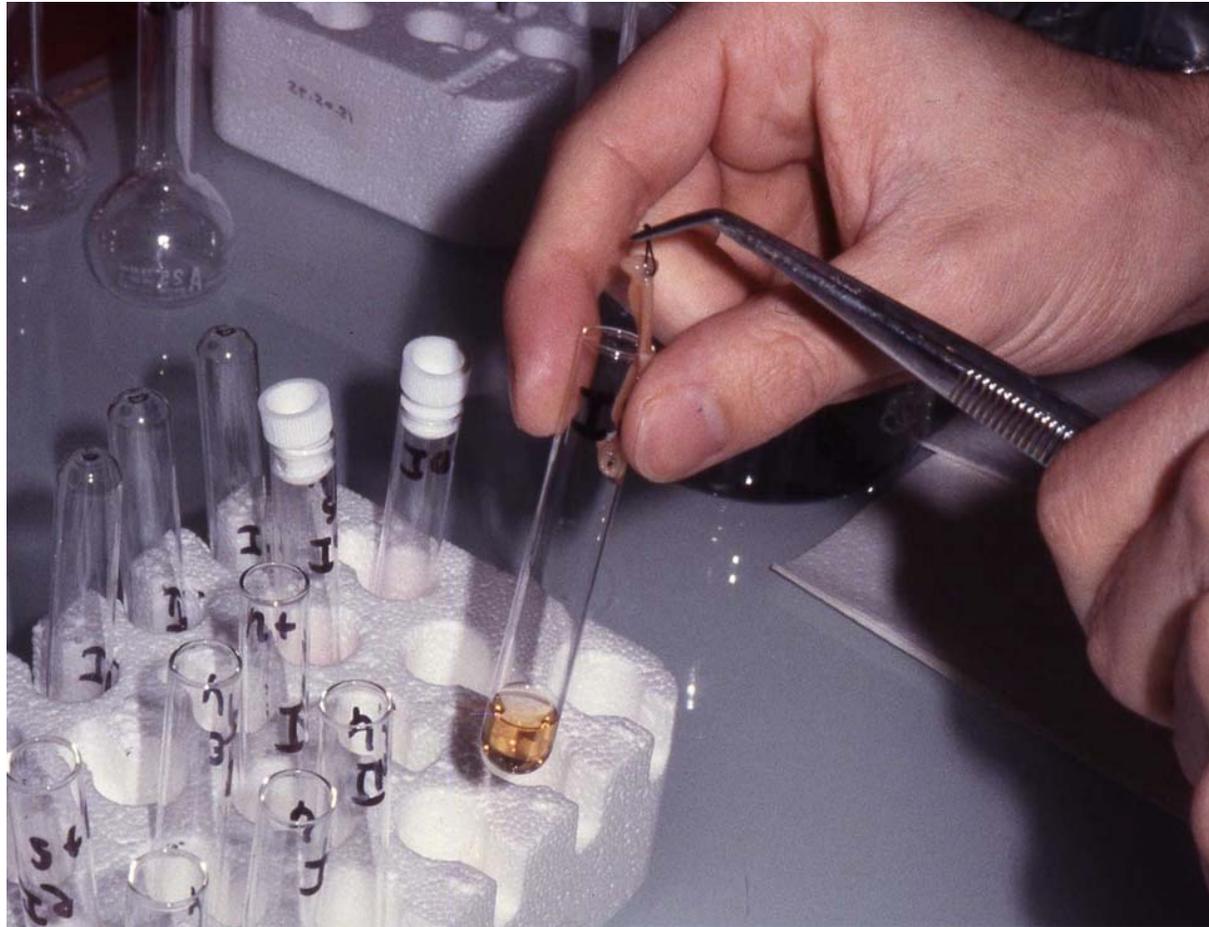
Modèle du sac intestinal éversé de rat: Technique

Préparation des sacs (2)



Modèle du sac intestinal éversé de rat: Technique

Récupération du contenu



Applications du modèle du sac

Cinétiques d'absorption \Rightarrow Identification des voies de passage

- ✓ **Environ 24-25 sacs disponibles par intestin de rat**
 - **Multiples conditions possibles (molécules, pH...)** avec un seul rat
 - **7 temps en triplicate (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 min)**

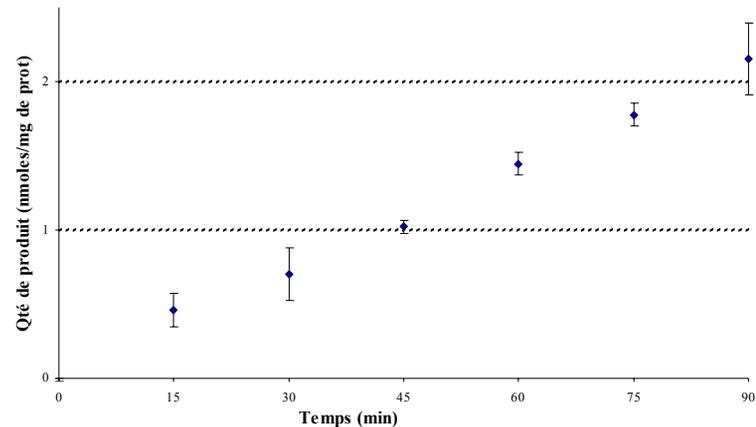
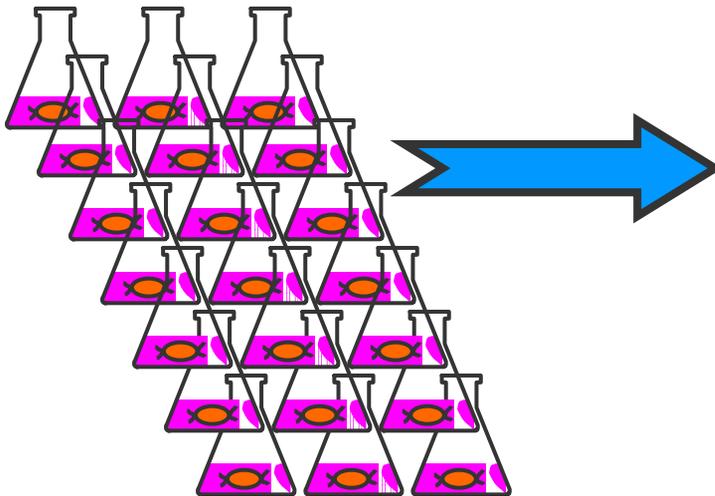


Fig 11: à quelle voie de passage correspondent ses courbes?

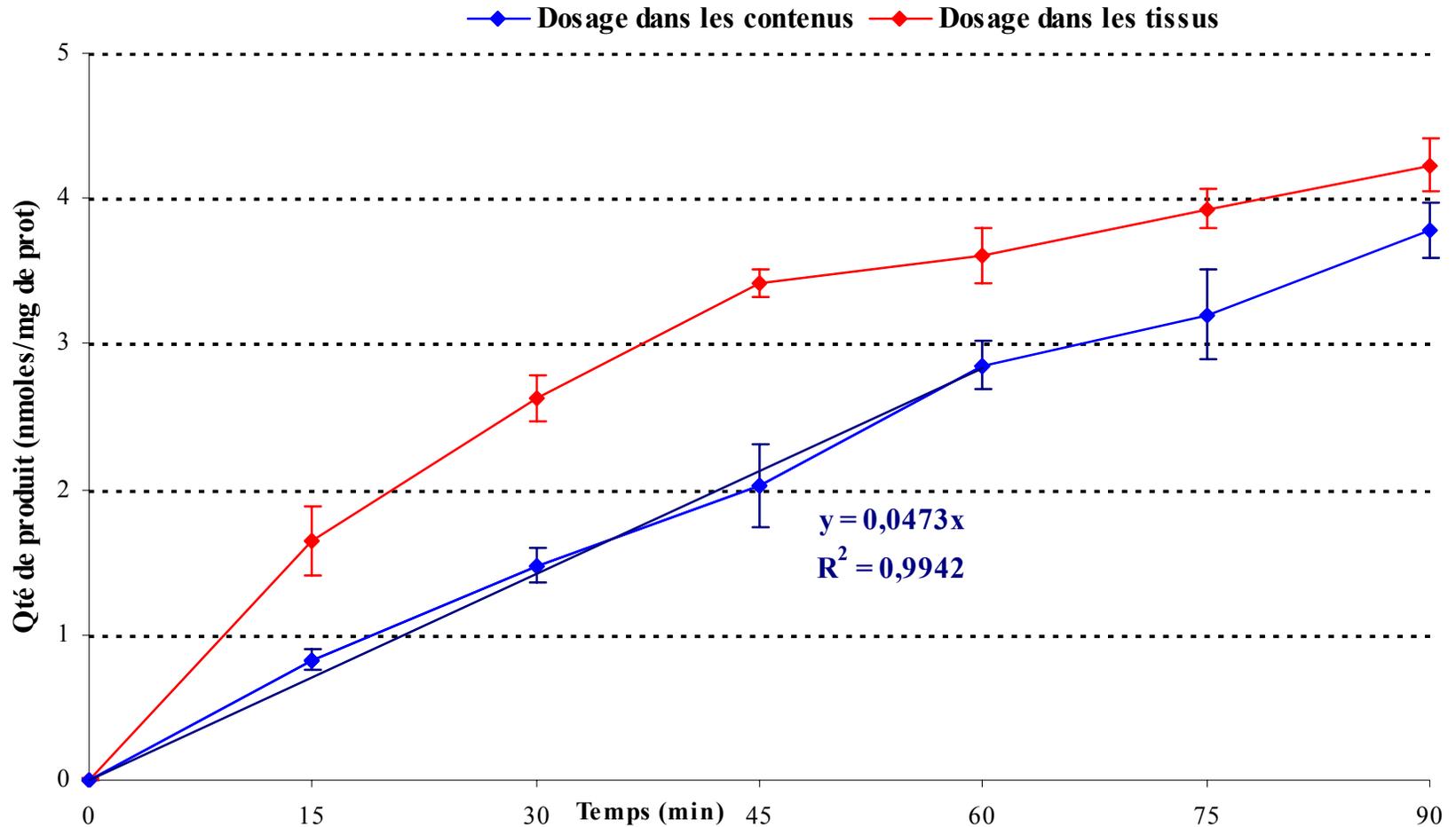


Fig 11

Diffusion passive trans-cellulaire

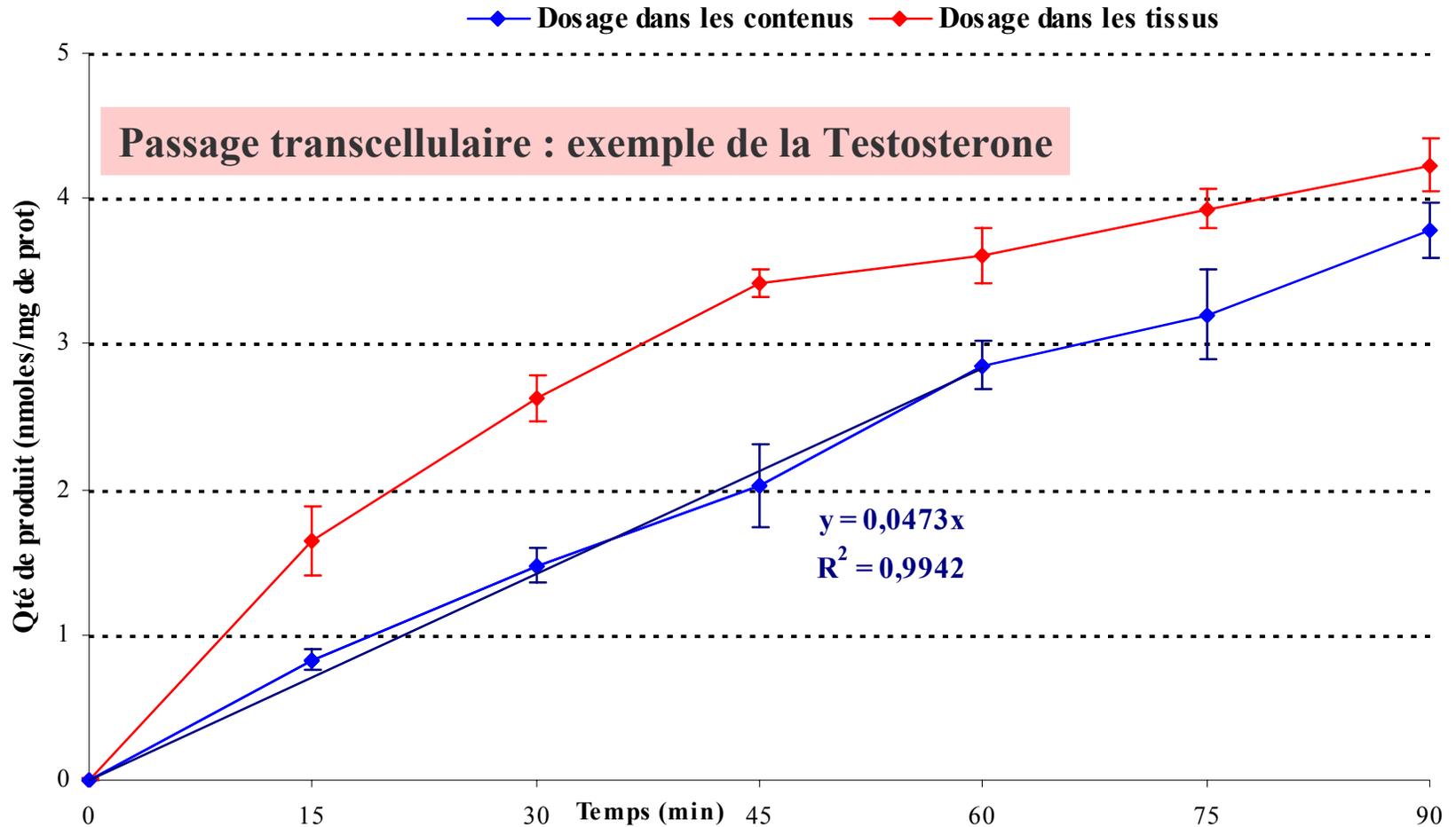
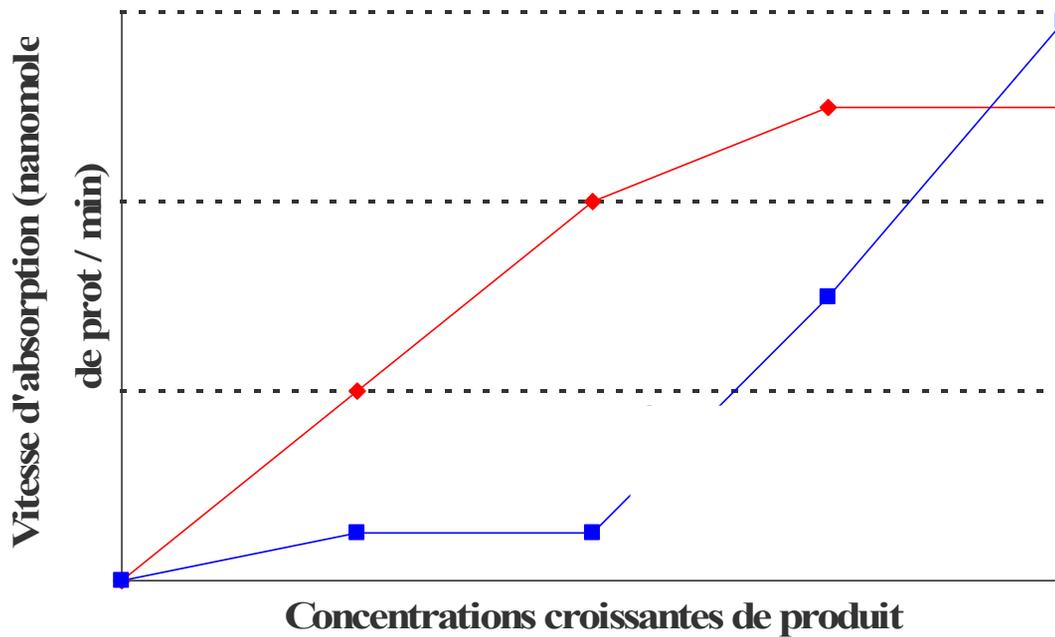


Fig 12: à quelles voies de passage correspondent ses courbes?



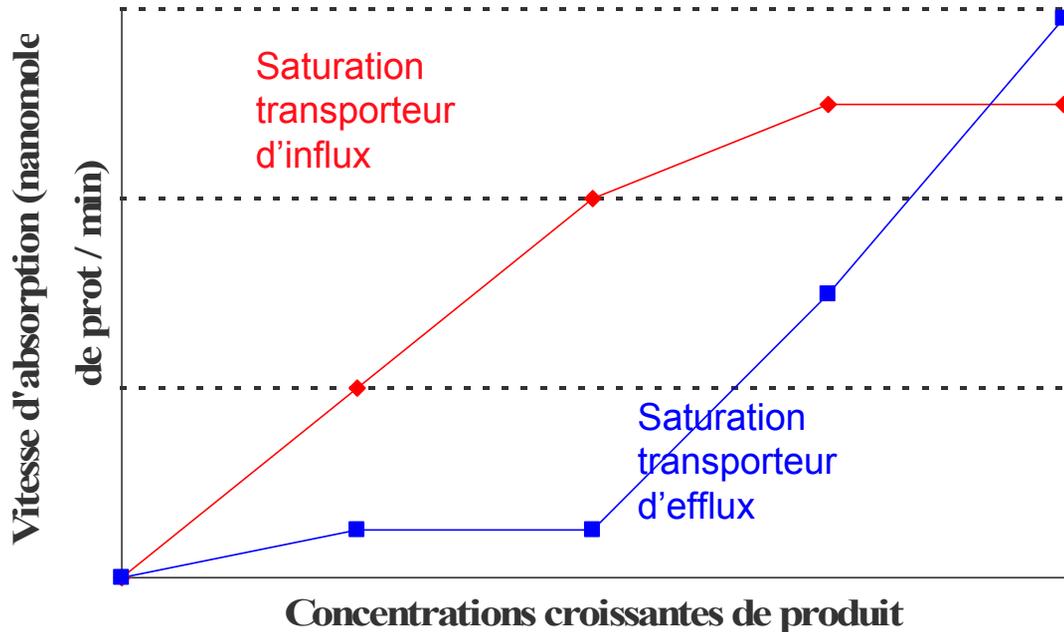
**Résultats théoriques
d'étude de transporteurs
vitesse = f(concentration)**

Fig 12

Transporteurs

➤ d'influx : PepT1, acides aminés, MCT, AE2, OATPs...

➤ d'efflux : Pgp, MRP, BCRP, ...



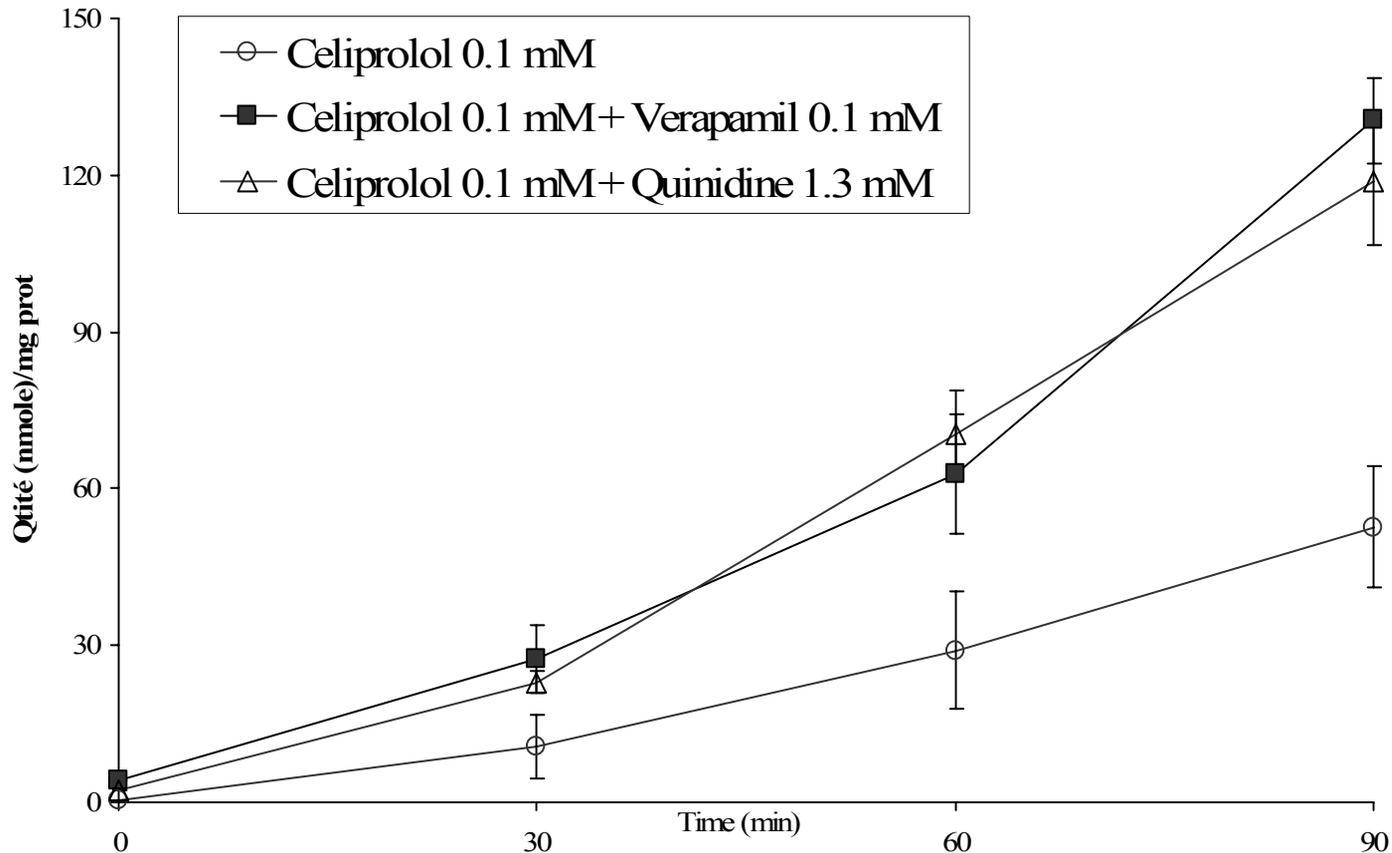
**Résultats théoriques
d'étude de transporteurs
vitesse = f(concentration)**

Applications

Etude des transporteurs d'efflux (P-gp)

- céliprolol seul

- céliprolol en compétition avec un substrat de la P-gp (quinidine et vérapamil)



Applications

Etude des différentes voies de passage

le long de l'intestin grêle

Les sacs sont conservés dans l'ordre de leur prélèvement, du duodénum à l'iléon, et incubés pendant la même durée (60min)

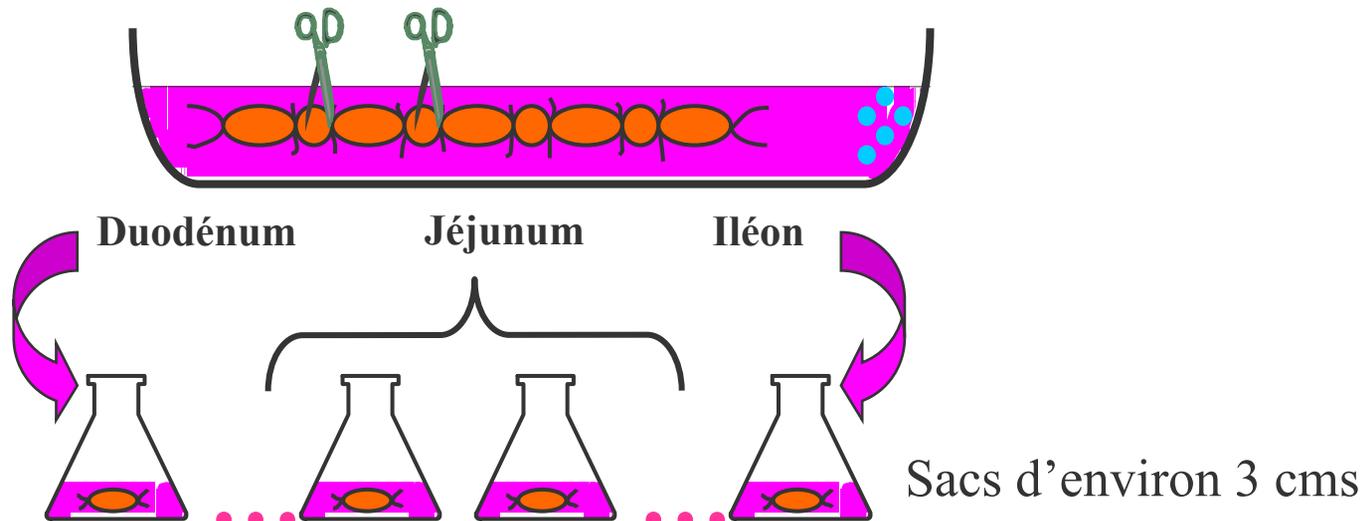
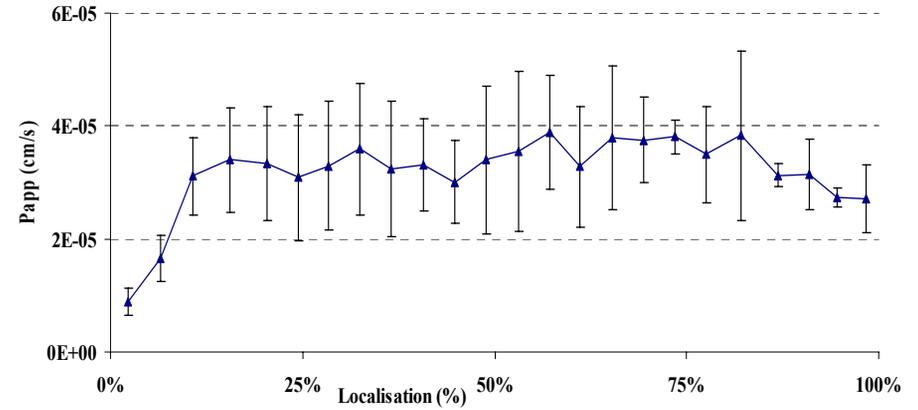
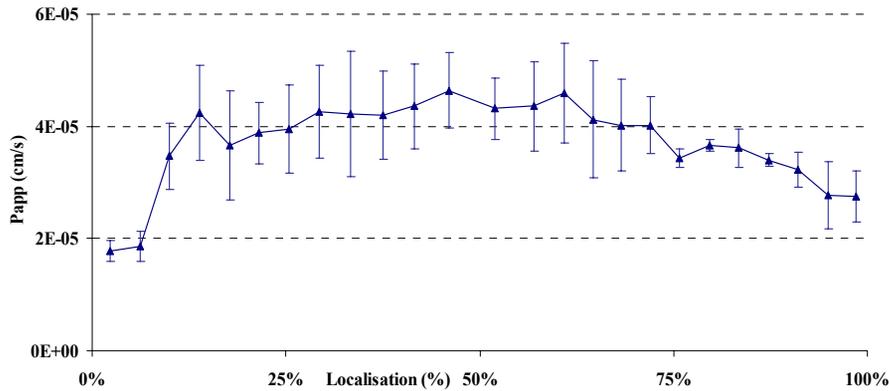


Fig 13: quelle est votre conclusion?

Voie Paracellulaire

Lucifer Yellow
(anion)



Mannitol
(neutre)

Ranitidine
(cation)

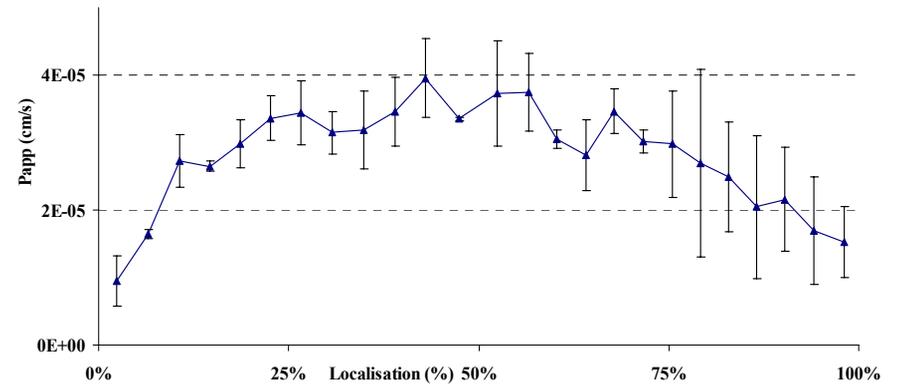
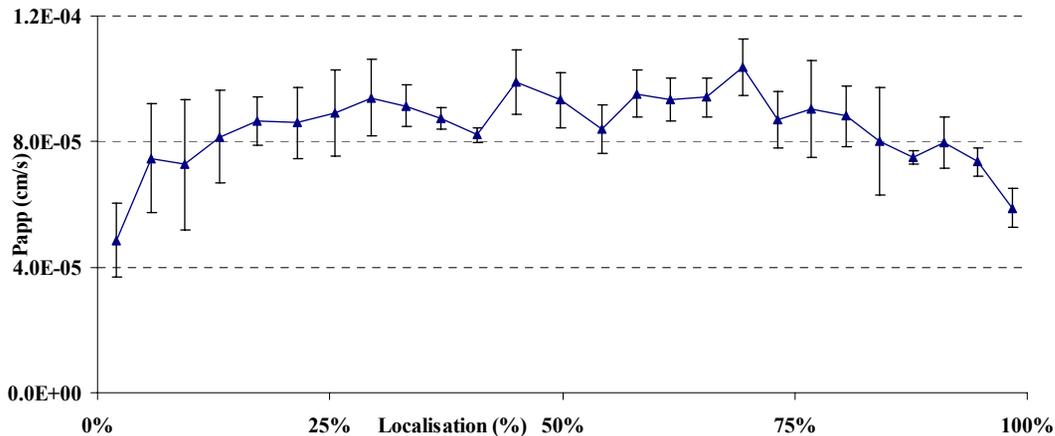
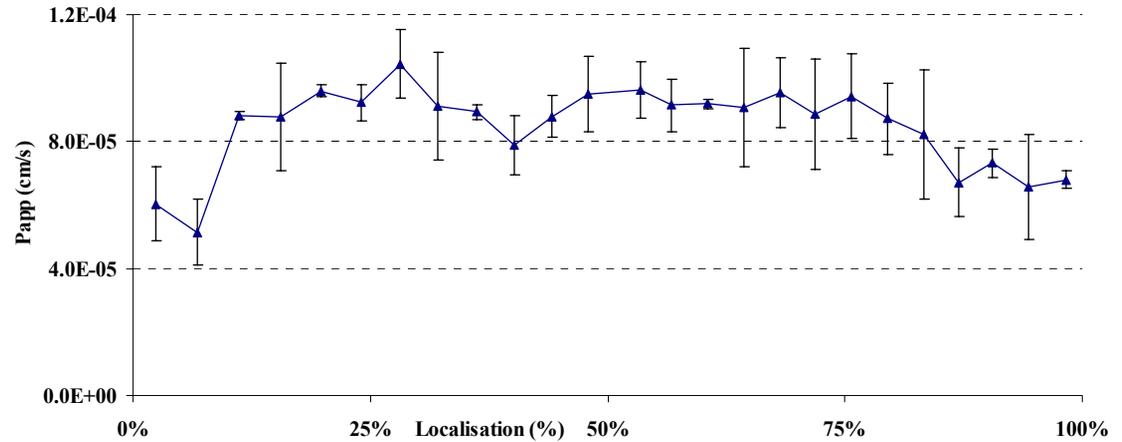


Fig 14: quelle est votre conclusion?

Voie Transcellulaire passive

Testosterone
(logP = 3.32)



Antipyrine
(logP = 0.4)

Fig 16: quelle est votre conclusion?

Efflux (Pgp) - Digoxine

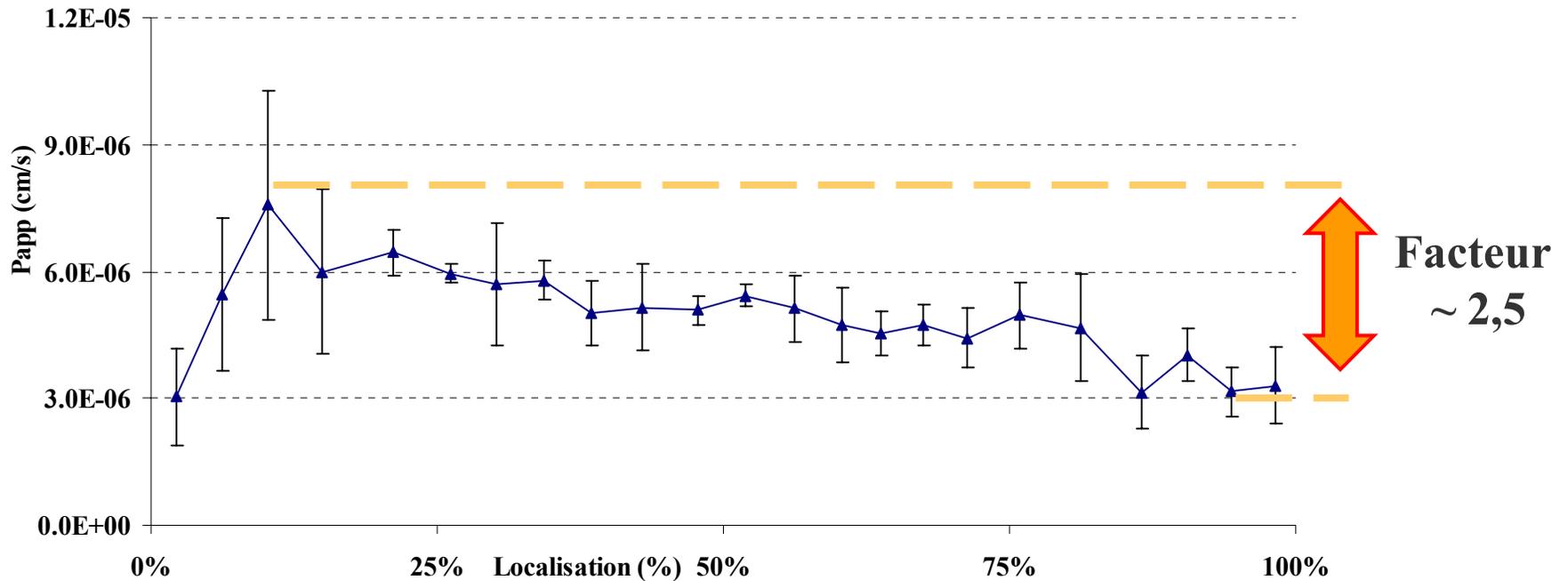


Fig 16: quelles sont les possibilités pour inhiber la P-gp?

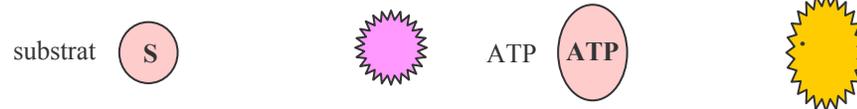
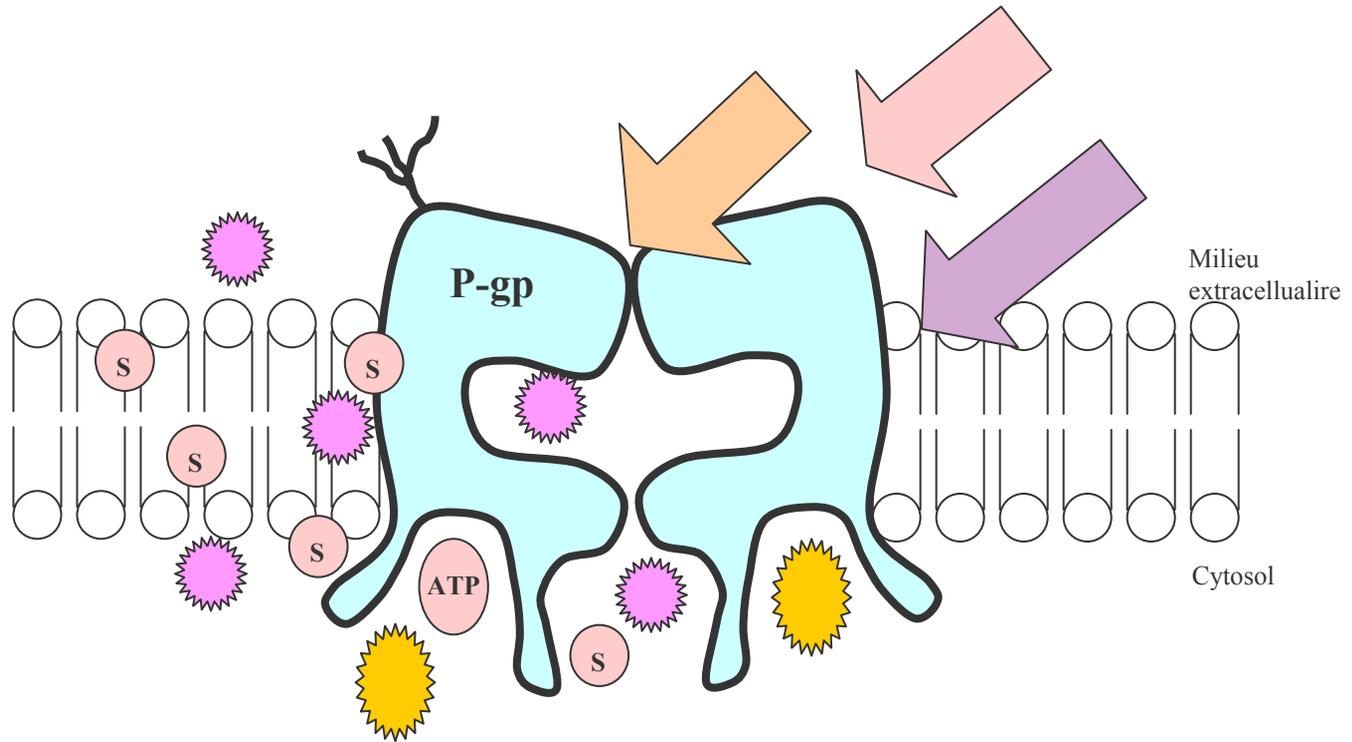
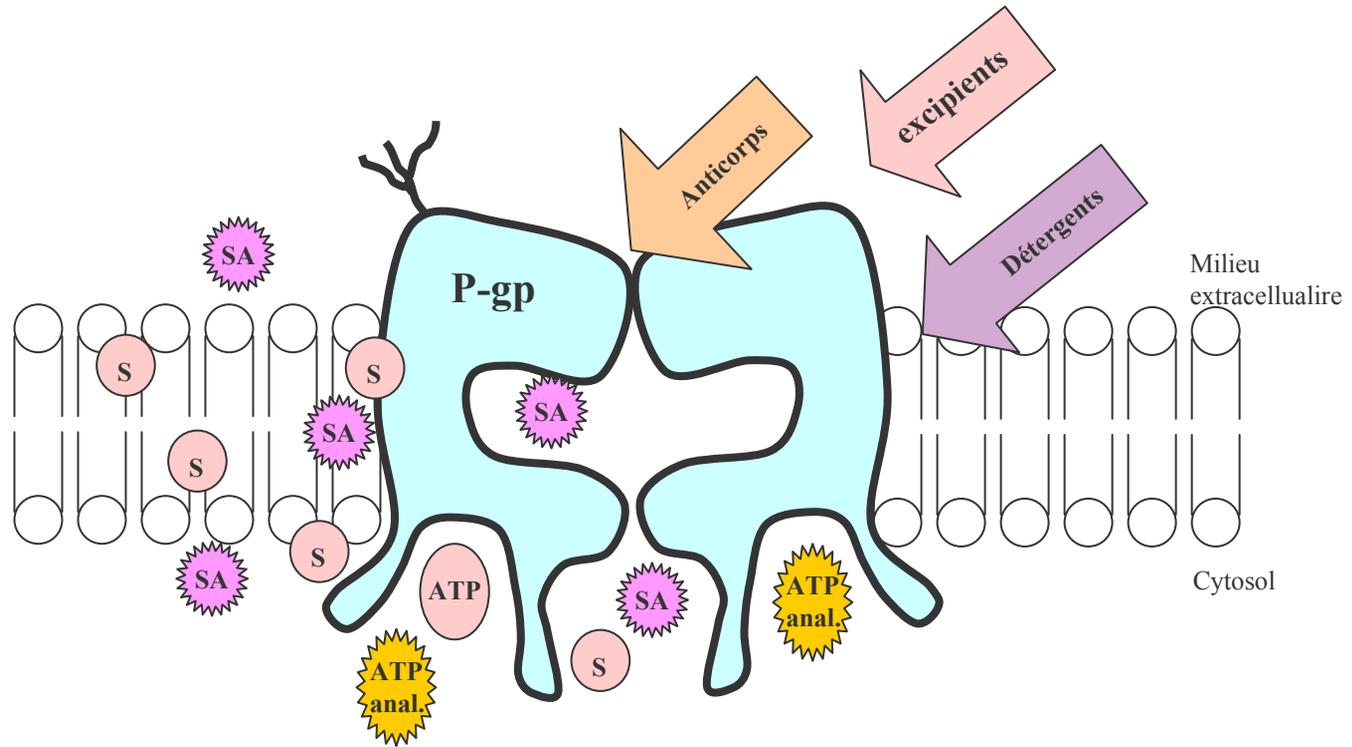


Fig 16

Stratégies possibles pour inhiber la P-gp :

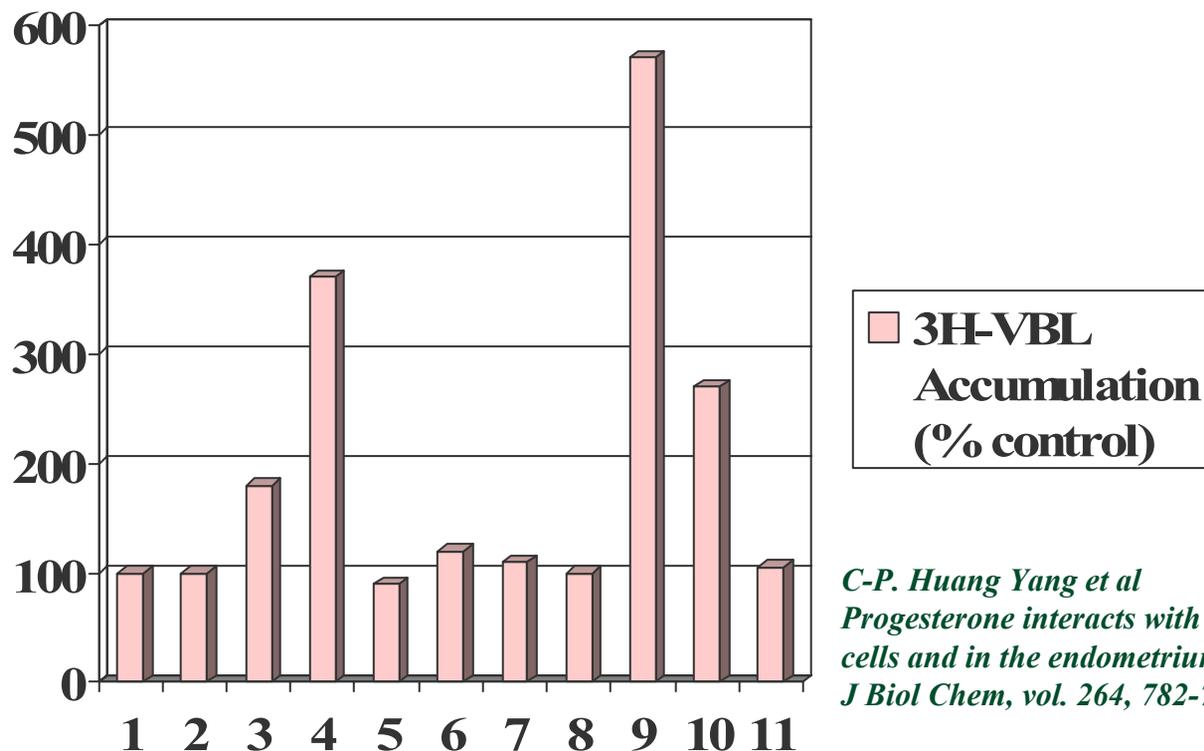


Utilisation de modulateurs pharmacologiques

Modulateurs	Concentrations optimales in vitro	Concentrations plasmatiques atteintes en clinique
<i>1ère génération</i>		
Vérapamil*	6-10 μM	1-2 μM
Quinidine	4-6 μM	3-10 μM
Cyclosporine A	5 μM	2-7 μM
Tamoxifène	10 μM	6 μM
<i>2ème génération</i>		
Dexvérapamil	6-10 μM	3 μM
Dexniguldipine	0,5-1 μM	0,3 μM
Valspodar ou PSC833	0,5-1 μM	2-4 μM
<i>3ème génération</i>		
GG918	<0,1 μM	?

***: la progestérone serait une alternative au vérapamil**
-mêmes concentrations optimales
-absence de toxicité

Utilisation de modulateurs pharmacologiques: cas de la progestérone

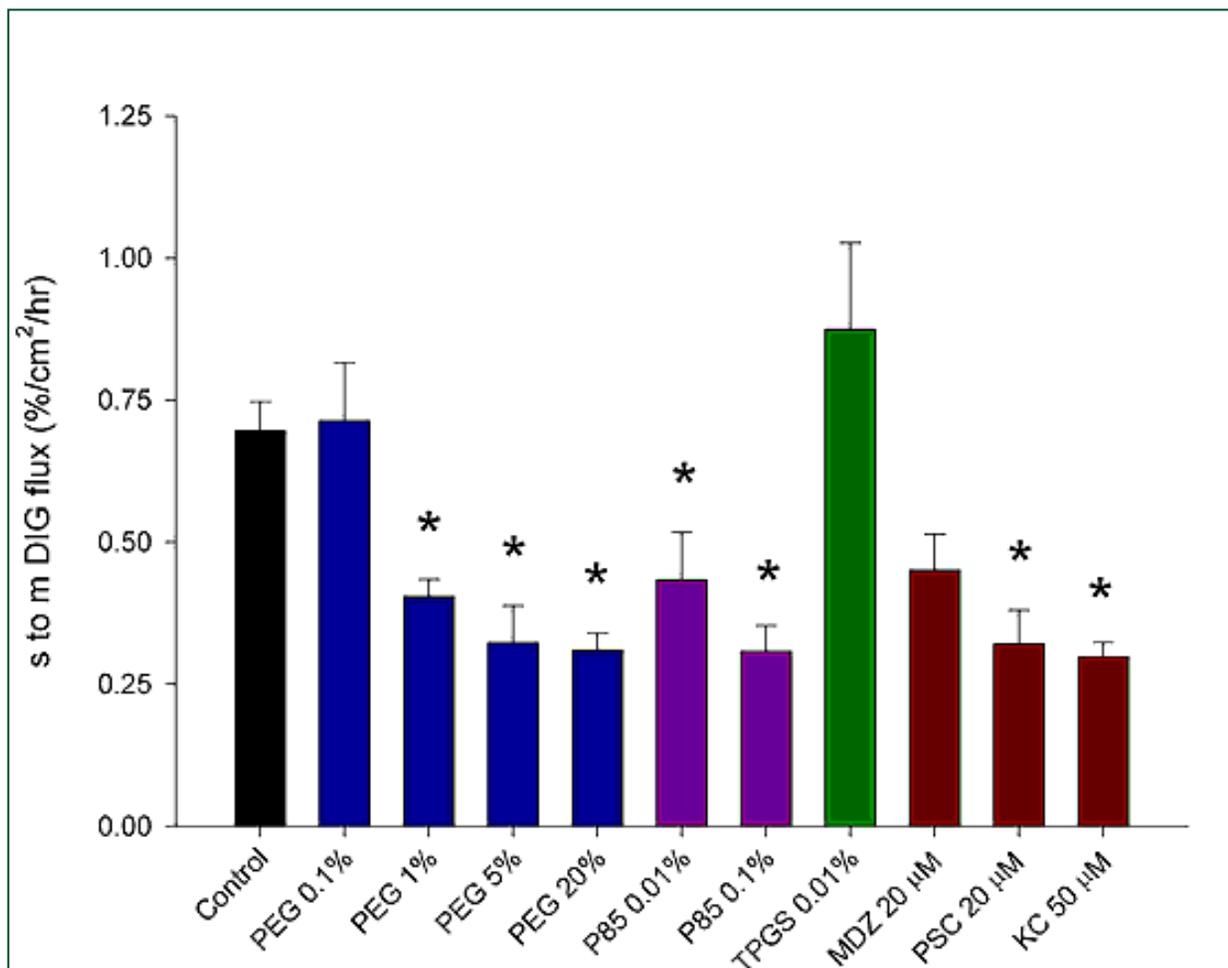


C-P. Huang Yang et al
Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus.
J Biol Chem, vol. 264, 782-788, 1989

Effect of steroids on [^3H]-Vinblastine accumulation in J7 V1-1 cells:

- 1** control; **2** aldosterone (50 μl); **3** corticosterone (50 μl); **4** deoxycorticosterone (50 μl); **5** dexamethasone (50 μl);
6 α -estradiol (50 μl); **7** β -estradiol (50 μl); **8** hydrocortisone (50 μl); **9** progesterone (50 μl); **10** testosterone (50 μl);
11 sodium deoxycholate

@ Exemple de modulation de la P-gp : les excipients



B-M. Johnson et al

An in vitro examination of the impact of polyethylene glycol 400, Pluronic P85, and vitamin E d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate on P-glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine.. AAPS Pharm Sci, vol. 4(4), E40, 2002

Fig 18: Quel est le problème lorsque l'on souhaite étudier le métabolisme intestinal (CYP3A4)? Quelles solutions proposez-vous?

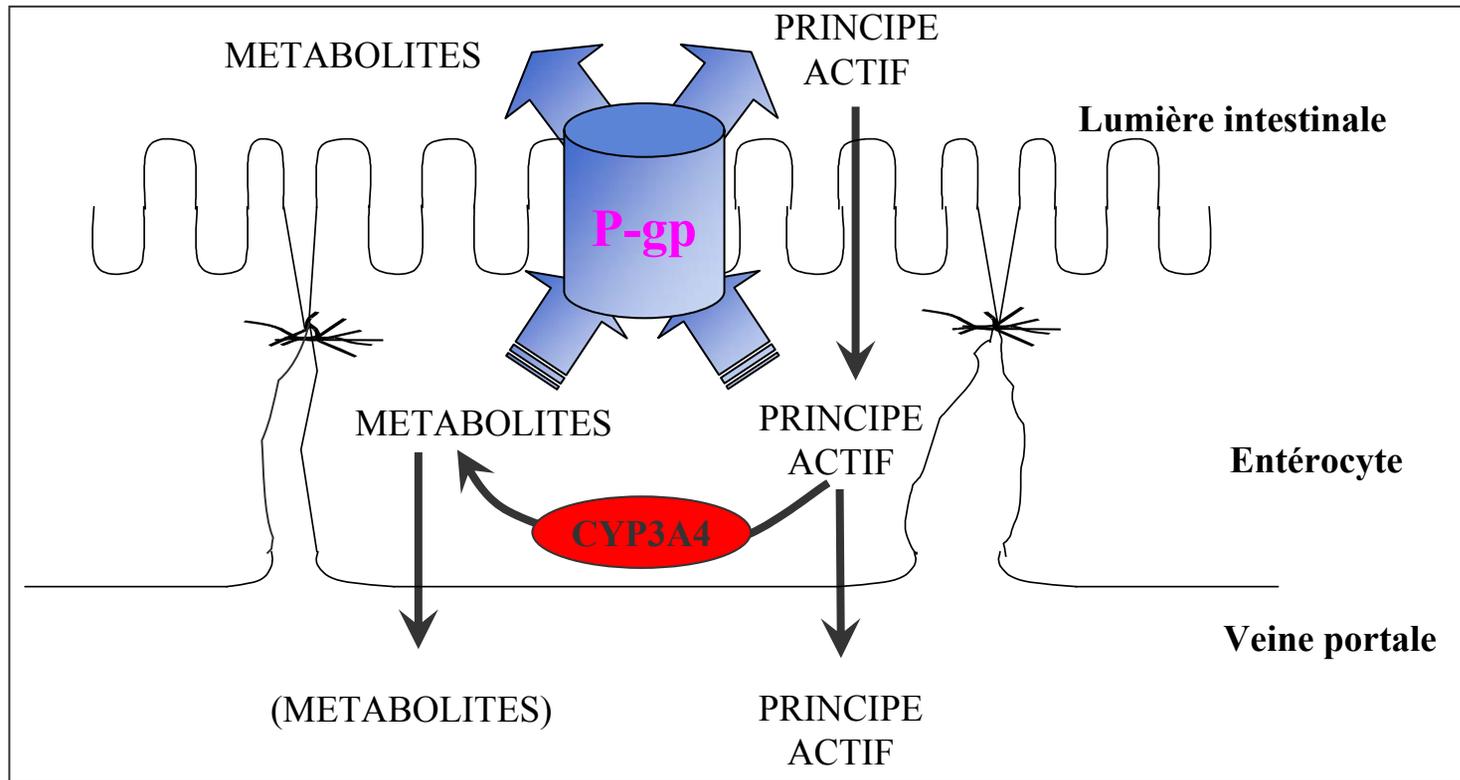


Fig 18: nombreux substrats communs entre CYP3A4 et P-gp

1- utilisateur d'un inhibiteur spécifique de la P-gp

2- souris knock-out pour la P-gp

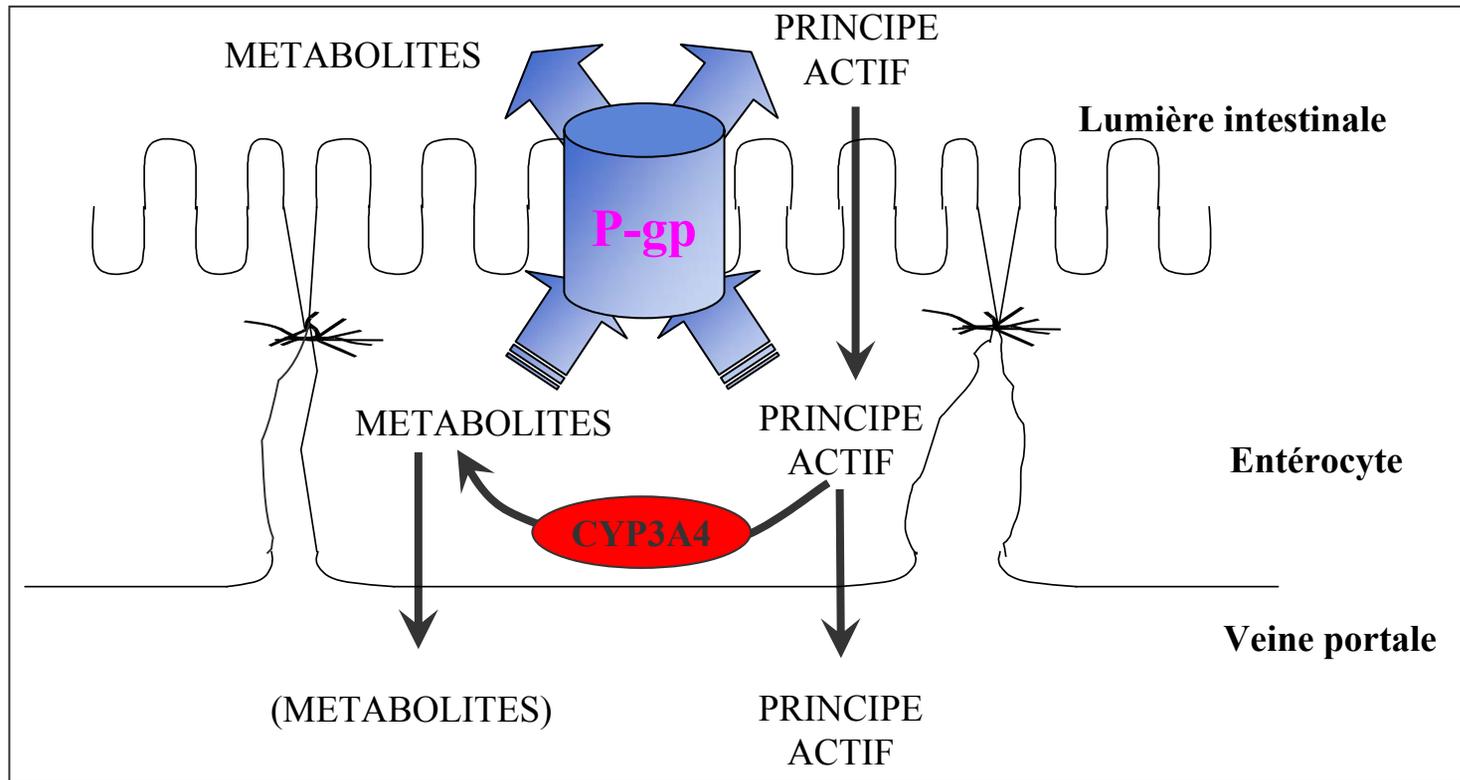


Fig 19: interpréter ces courbes

Etude de l'absorption de la digoxine, connue pour être un substrat de P-gp, chez la souris normale et 'Knockout'

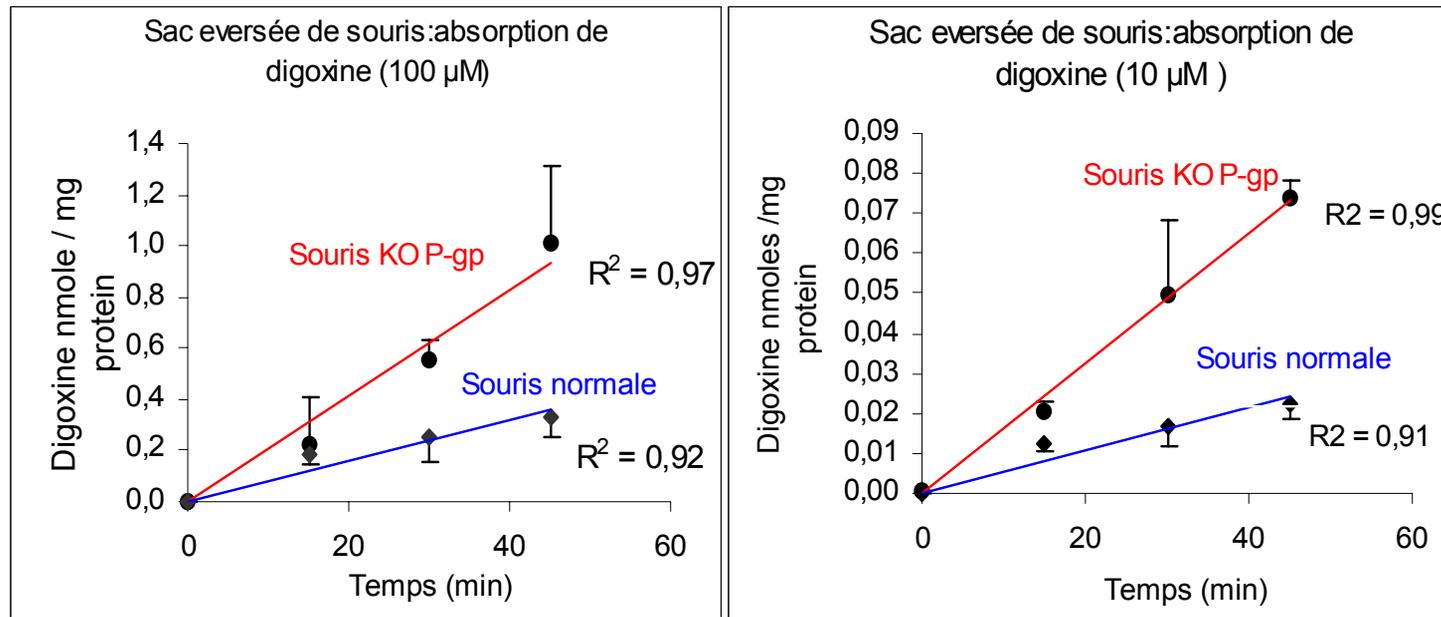
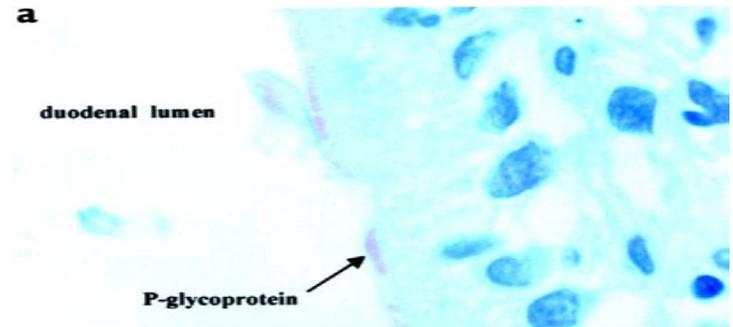


Fig 20: quel est l'effet de la rifampicine sur l'expression de la P-gp? Quel est l'autre effet habituellement induit par la rifampicine? Quel sera l'effet pharmacologique (d'après vous) en cas de polymédication?

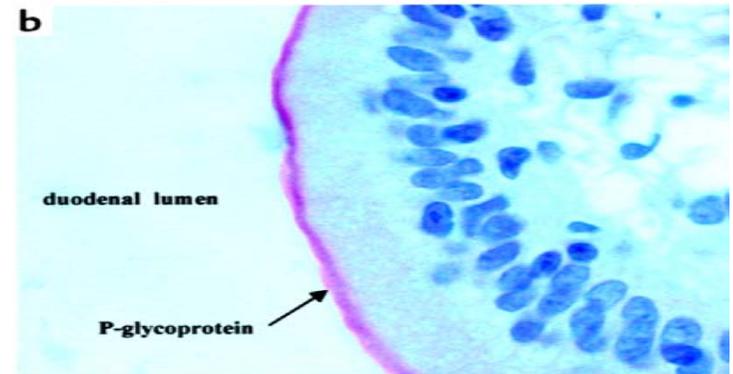
- interaction DIGOXINE / RIFAMPICINE : études sur volontaires sains.

- Biopsies duodénales immunomarquées pour la P-gp

Avant
administration
de rifampicine



Après
administration
de rifampicine



Greiner et al. *J. Clin. Invest.* (1999); 104 : 147-153

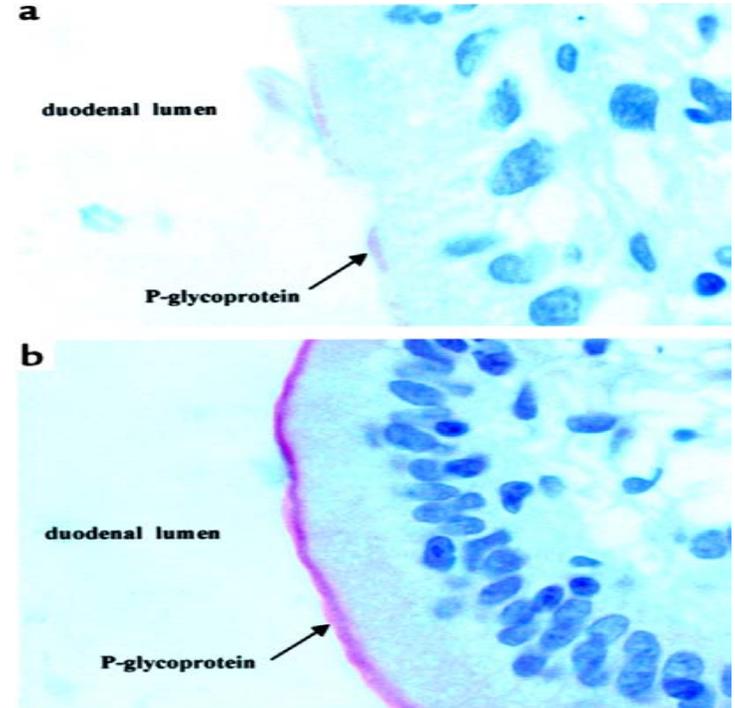
Fig 20

- interaction DIGOXINE / RIFAMPICINE : études sur volontaires sains.

- Biopsies duodénales immunomarquées pour la P-gp

Avant
administration
de rifampicine

Après
administration
de rifampicine



Exemple de modulation de la P-gp : co-administration de rifampicine

Greiner et al. *J. Clin. Invest.* (1999); 104 : 147-153

La P-gp est inductible comme le CYP3A4!