



Polycopié de Cours :

Métabolisme et transport des xénobiotiques

Master 1 Toxicologie appliquée

Préparé par :

Dr. Medila Ifriqya

Maître de conférence classe A à l'université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued



Programme détaillé (Canevas)

Semestre : I

Intitulé de l'UE : fondamentales

Intitulé de la matière : Métabolisme et Transport des xénobiotiques

Crédits : 6

Coefficients :3

Objectifs de l'enseignement :

Cette matière permet de donner les informations de base sur l'avenir et l'interaction des xénobiotiques, le métabolisme et le changement de la structure qui induit à des molécules plus toxiques que la molécule mère.... Etc.

Connaissances préalables recommandées

Niveau 3^{ème} année licence biochimie ou toxicologie.

Contenu de la matière :

- 1-Les principales enzymes du métabolisme des xénobiotiques
- 2- Les principaux transporteurs des xénobiotiques;
- 3-Variations génétiques et environnementales du métabolisme et transport des xénobiotiques
- 4-Modèles in vitro d'exploration du métabolisme et du transport des xénobiotiques ;
- 5-Modèles in vivo d'exploration du métabolisme et du transport des xénobiotiques ;
- 6-Modèles physiologiques d'extrapolation in vitro- in vivo en transport et métabolisme;
- 7-Implications des variations du métabolisme et du transport ;
- 8-pharmacotoxico-cinétique et pharmacodynamie et développement des médicaments)

Mode d'évaluation :

- Cours : Nombre d'EMD : 2
- Travaux dirigés
- Calcul de la moyenne : [(EMD) + (TD)] /3

Références

- FLONDROIS. JP Microbiologie et pathologie infectieuse
- Organisation fonctionnelle de la cellule YVES MULLER et JEAN CLOS
- *Books.google.com/.../Microbiologie_et_pathologie_infe.*

SOMMAIRE

I- Les principaux enzymes du métabolisme des xénobiotiques.....	1
1. Généralités.....	1
2. Caractéristiques des enzymes du métabolisme des xénobiotiques.....	3
3. Les enzymes de phase I: réactions de fonctionnalisation.....	3
3.1. Les cytochromes P450.....	4
3.2. Flavine-monooxygénases.....	8
3.3. Les alcools et aldéhydes déshydrogénases (ADH et ALDH).....	9
3.4. Les monoamines oxydases (MAO).....	9
3.5. Estérases.....	10
3.6. Epoxydes hydrolases.....	10
4. Les enzymes de phase II : réactions de conjugaison.....	10
4.1. Les UDP-glucuronyltransférases.....	10
4.2. Les sulfotransférases.....	12
4.3. Les N-acétyltransférases.....	13
4.4. Les Glutathion-S-transférases.....	14
II- Les transporteurs des xénobiotiques.....	17
1. Les « ABC-transporters »	17
1.1. P-glycoprotéine.....	18
1.2. Les « <i>Multidrug Resistance-Associated Proteins</i> » (MRP).....	19
1.3. Les « <i>Breast Cancer Resistance Protein</i> » (BCRP).....	20
2. Les « Solute Carriers »	21
2.1. Les « <i>Organic Anion Transporting Polypeptides</i> » (OATP)	22
2.2. Les « <i>Organic Anion Transporters</i> » (OAT).....	23
2.3. Les « <i>Organic Cation Transporters</i> » (OCT).....	23
2.4. Les «organic cation/carnitine transporters» ou «novel organic cation transporters» (OCTN).....	24
2.5. Les «Na ⁺ -Taurocholate Co-transporting Polypeptide» (NTCP).....	24
2.6. Les «Multidrug And Toxin Extrusion» (MATE).....	24
2.7. Les «peptide transporters» (PEPT).....	25
III. Facteurs influençant le métabolisme et transport des xénobiotiques et leurs implications.....	28
Introduction.....	28
1. Notion de Polymorphisme génétique.....	28
2. Polymorphisme génétique des EMTX et leurs implications	28
3. Variations environnementales.....	31
3.1. Induction / inhibition des EMX.....	31
3.2. Induction / inhibition des transporteurs des xénobiotiques.....	34
3.3. Interaction métabolique.....	35
3.4. Divers stress.....	36
4. Facteurs physiopathologiques.....	36
4.1. Age.....	36

4.2. Sexe.....	36
4.3. Hormones.....	37
4.4. Grossesse	37
4.5. Etat nutritionnel.....	37
4.6. Maladies	38
IV-Exploration du métabolisme et de transport des xénobiotiques : modèles (in vitro et in vivo) et approche d'étude	39
1. Les modèles <i>in vivo</i>	39
2. Les modèles <i>in vitro</i>	40
2.1. Fractions subcellulaires.....	41
2.1.1. Microsomes.....	42
2.1.2. Fraction S9.....	43
2.1.3. Fraction cytosolique.....	43
2.2. Culture cellulaire.....	44
2.2.1. Hépatocytes.....	44
2.2.2. Lignées cellulaires hépatiques.....	45
2.3. Coupes tissulaires.....	46
2.4. Organe isolé perfusé.....	46
2.5. Enzymes recombinantes.....	47
3. Approches d'étude de métabolisme <i>in vitro</i>	47
3.1. Identification des métabolites et des voies métaboliques.....	47
3.2. Identification des isoformes enzymatiques responsables d'une réaction enzymatique.....	47
3.2.1. Enzymes recombinantes et méthodes d'extrapolation.....	48
3.2.2. Test d'inhibition spécifique.....	50
3.2.3. Test de corrélation.....	51
3.3. Extrapolation <i>in vitro-in vivo</i>	51
3.3.1. Etude de cinétique enzymatique.....	52
3.3.2. Prédiction de la clairance intrinsèque.....	54
3.3.3. Méthode de la demi-vie <i>in vitro</i>	54
3.3.4. Pharmacogénétique des enzymes du métabolisme.....	55
3.3.5. Prédiction de la clairance métabolique <i>in vivo</i>	55
V. Modèles physiologiques d'extrapolation in vitro-in vivo	57
Introduction.....	57
1. Principe des modèles PBPK	58
2. Logiciels.....	60
3. Applications des modèles PBPK	60
VI. Pharmacotoxico-cinétique et pharmacodynamie et développement des médicaments.....	66
1. Pharmacotoxico-cinétique.....	66
1.1. Introduction : définition et buts.....	66
1.2. Les étapes pharmacocinétique.....	67
1.2.1. Etape 1 : Absorption d'un médicament.....	67

1.2.1.1. Modalités d'absorption.....	67
1.2.1.2. Evaluation de l'absorption : la biodisponibilité.....	69
1.2.2. Etape 2 : Distribution	71
1.2.2.1. Volume apparent de distribution.....	71
1.2.2.2. Facteurs modifiant la distribution.....	72
1.2.3. Etape 3 : Métabolisme	74
1.2.3.1. Les voies métaboliques.....	75
1.2.3.2 Les conséquences du métabolisme.....	76
1.2.4. Etape 4 : Elimination des médicaments	76
1.2.4.1 Elimination hépatique.....	76
1.2.4.2 Elimination rénale.....	77
1.2.4.3. Autres voies d'excrétion.....	77
1.2.5. Quantification du métabolisme et de l'élimination	77
1.2.5.1. Notion de clairance.....	77
1.2.5.2. Notion de coefficient d'extraction.....	78
1.2.5.3. Clairance hépatique.....	79
1.2.5.4. Clairance rénale.....	80
1.2.6. Demi-vie d'un médicament.....	81
1.2. Toxicocinétique.....	82
2. Pharmacodynamie.....	82
2.1. Introduction : définition et buts.....	82
2.2. Mécanismes d'action.....	83
2.2.1. Action par fixation spécifique.....	83
2.2.1.1. Fixation sur une protéine.....	84
2.2.1.2. Fixation sur le génome	85
2.2.1.3. Autres sites de fixation.....	85
2.2.2. Sans fixation dans l'organisme.....	85
2.2.3. Action sur des organismes étrangers.....	85
2.3. Théorie des récepteurs.....	85
2.3.1. Définition.....	85
2.3.2. Stimulus et effet.....	86
2.3.3. Liaison et site actif.....	86
2.3.4. Classification des récepteurs.....	88
2.3.4.1. Récepteurs à activité de canal ionique.....	88
2.3.4.2. Récepteurs couplés aux protéines G.....	89
2.3.4.3. Récepteur-enzymes.....	89
2.3.4.3. Récepteurs nucléaires.....	90
2.4. Relations doses-concentrations / récepteurs / effets.....	91
2.4.1. Etude des relations ligand - récepteur (Méthodes de liaison : Binding).....	91
2.4.2. Etude de la relation dose (ou concentration) - effet des agonistes.....	93
2.4.3. Etudes des antagonistes.....	95
3. Développement d'un médicament.....	96
3.1. Synthèse de nouvelles structures chimiques.....	96

3.2. Investigation préclinique	96
3.2.1. Pharmacologie expérimentale	96
3.2.2 Toxicologie	97
3.2.3 Pharmacocinétique et métabolisme du médicament	97
3.3. Les essais cliniques.....	97
3.3.1. Phase 1 : tolérance ou innocuité.....	97
3.3.2. Phase 2 : efficacité du produit sur de petites populations et recherche de dose.....	98
3.3.3. Phase 3 : études « pivots ».....	98
3.4. Décision de mise sur le marché.....	98
3.5. Pharmacovigilance.....	98
Références.....	100

I. Les principaux enzymes du métabolisme des xénobiotiques

Les xénobiotiques sont des molécules de faible masse moléculaire étrangères à l'organisme. Il s'agit par exemple des médicaments, des polluants de l'eau ou de l'atmosphère, des additifs alimentaires mais également de certains composés naturels des aliments. Les êtres vivants sont donc obligatoirement exposés à ces composés et doivent être capables de faire face à certaines de leurs propriétés potentiellement délétères, telles que l'hydrophobie, qui ne permet pas leur élimination de l'organisme ou leur réactivité chimique avec certains constituants cellulaires.

1. Généralités

Compte tenu de la grande diversité et de la nature imprévisible de la structure chimique de ces xénobiotiques, les êtres vivants doivent disposer d'un arsenal diversifié d'enzymes (et d'isoenzymes) pouvant effectuer un large spectre de réactions chimiques sur des substrats ayant des structures très diverses. Ces enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) ont été classés selon le schéma de la figure 1. Les xénobiotiques pénètrent facilement dans la cellule s'ils sont hydrophobes, mais ils peuvent également en être expulsés via des pompes telles la PgP (Pglycoprotéine).

Les xénobiotiques sont alors pris en charge par **des enzymes de phase I**, dits de fonctionnalisation, dont les plus importants sont les cytochromes P450 (CYP) qui catalysent une réaction de monooxygénation. **Les enzymes de phase II** conjuguent les xénobiotiques, fonctionnalisés ou non, avec un groupement (glutathion, acide glucuronique, méthyl, acétyl...), dont le rôle est soit de neutraliser un groupement réactif (thiol, amine, aldéhyde), soit de rendre le xénobiotique hydrophile afin de faciliter son élimination par l'organisme. Enfin, si le métabolite obtenu est très hydrophile, il devra être transporté à travers la membrane cellulaire par **des protéines de phase III** (les transporteurs membranaires)

Le métabolite ainsi produit pourra soit être éliminé dans la bile ou les urines, soit, après transport dans le sang ou dans la bile, être métabolisé de nouveau dans d'autres tissus possédant un autre spectre d'EMX (phase IV). Toutes les étapes ne sont pas obligatoires (figure 2) et le métabolisme de chaque composé est particulier selon leur caractéristique (lipophile, polaire, hydrophile).

Bien que des enzymes du métabolisme des xénobiotiques se retrouvent dans tous les tissus, l'essentiel de ce processus se déroule dans les hépatocytes.

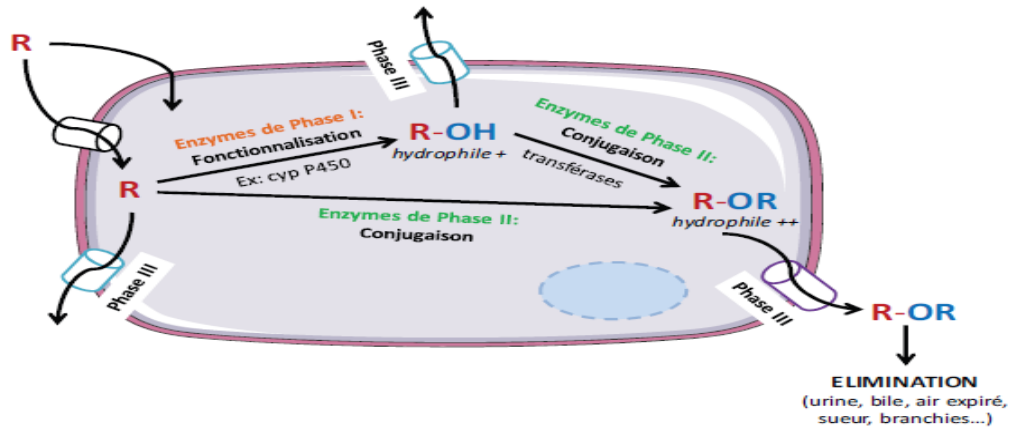


Figure 1. Phases de biotransformations des xénobiotiques)

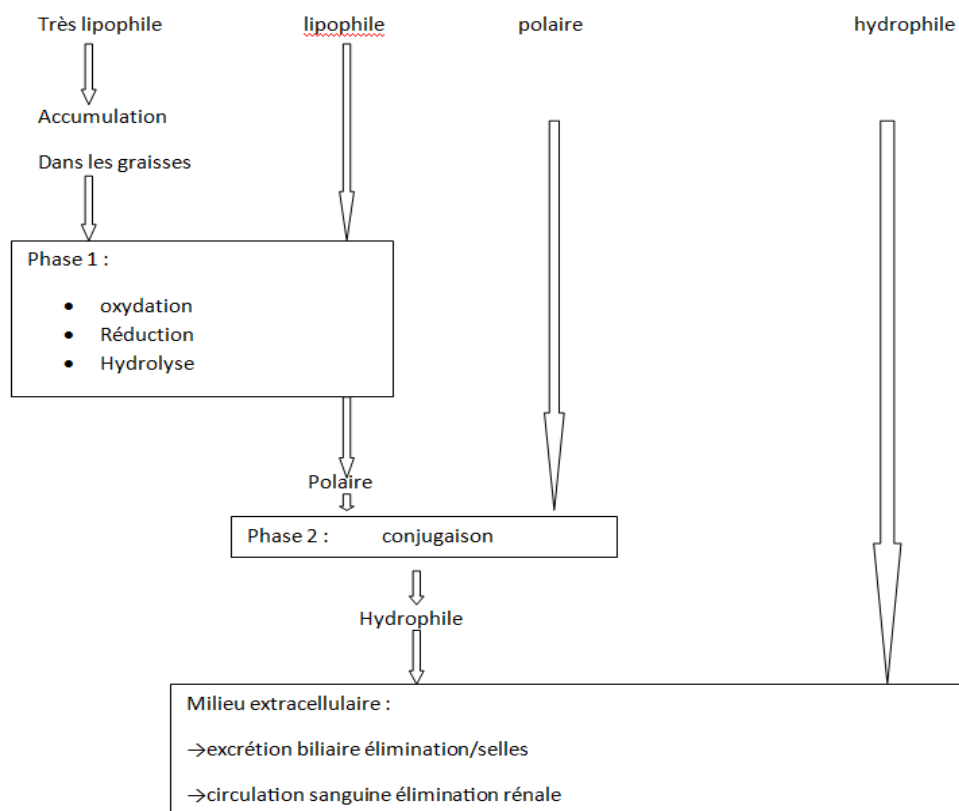


Figure 2. Schéma général de métabolisme des xénobiotiques

2. Caractéristiques des enzymes du métabolisme des xénobiotiques

Il est important de relever quelques propriétés particulières des EMX résumées dans le tableau 1. La spécificité relative et chevauchante (un CYP peut métaboliser plusieurs substrats, un substrat peut être métabolisé par plusieurs CYP) ainsi que la redondance (plusieurs enzymes, ou isoenzymes, peuvent prendre en charge le même substrat) sont particulièrement importantes, car elles peuvent rendre compte, par exemple, de la fréquence élevée des polymorphismes génétiques à l'origine d'un déficit enzymatique.

Tableau 1. Caractéristiques des enzymes du métabolisme des xénobiotiques.

• Nombreux isoenzymes
• Isoenzymes redondants
• Spécificité de substrat relative et chevauchante
• Activité spécifique généralement faible
• Variabilité d'expression importante
– induction/répression
– inhibition
– polymorphismes génétiques
– variations physiopathologiques

3. Les enzymes de phase I: réactions de fonctionnalisation

Les réactions de fonctionnalisation conduisent à la formation de groupes chimiques fonctionnels et/ou au clivage de la molécule de départ. Les principales familles d'EMX de phase I et leurs fonctions sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2. Familles et fonctions des EMX de phase I

Familles d'EMX de phase I	Fonctions
Cytochromes P450 (CYP)	- Hydroxylation aliphatique ou aromatique - Epoxydation - <i>N</i> -, <i>O</i> -, <i>S</i> -déalkylation - <i>N</i> -hydroxylation - Sulfoxydation - Désulfuration - Déshalogénéation oxydative
Flavines monooxygénases (FMO)	<i>N</i> - et <i>S</i> -oxydation
Péroxydases (Px)	Réduction des hydroperoxydes en alcool
Carboxylestérase, amidase	Hydrolyse des esters
Alcool déshydrogénase (ADH)	Oxydation des alcools en aldéhydes
Epoxyde hydrolase (EH)	Hydrolyse des époxydes en dihydrodiols
Monoamine oxydase (MAO)	Désamination oxydative

3.1. Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYPs) sont des enzymes hémiques (hémoprotéines), microsomaux (ancrées à la membrane du réticulum endoplasmique) ou mitochondriales. D'où le terme « Cyto = Vésicule microsomiale, P = pigmenté, 450 = longueur d'onde ». Ils appartiennent à une superfamille d'enzymes que l'on retrouve aussi bien dans le règne végétal qu'animal. Les CYPs sont impliquées dans un grand nombre de réactions chimiques de biosynthèse ou de biodégradation de molécules endogènes (hormones stéroïdes, acides biliaires, acides gras ou encore prostaglandines). Ils jouent également un rôle prépondérant dans des réactions de biotransformation de composés exogènes comme les médicaments et les contaminants chimiques (CYP 1, 2, et 3).

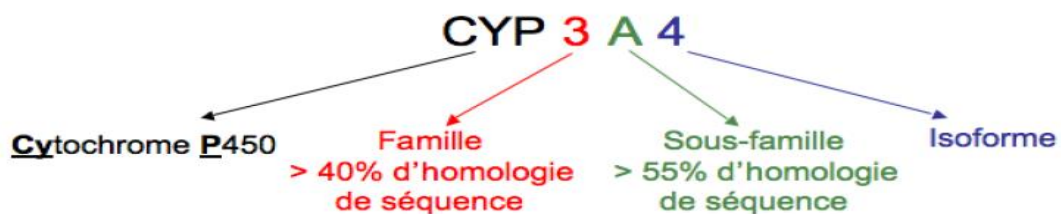
Classification et nomenclature

La nomenclature actuelle des cytochromes P450 tient compte de leur appartenance à des familles et sous familles grâce au pourcentage d'analogie dans la séquence d'acides aminés :

- S'il y a moins de 40% d'analogie dans la séquence d'acides aminés de deux cytochromes P450, ils seront classés dans des familles différentes.
- Si le pourcentage d'analogie dépasse 55% alors les deux cytochromes appartiendront à la même famille.

Pour le CYP3A4 : CYP désigne le cytochrome P450, 3 la famille, A correspond à la sous famille, 4 précise l'isoforme. Deux isoformes ont le même centre oxydatif, c'est-à-dire le même noyau hémique, mais ils diffèrent par la structure des protéines. Lorsqu'il est fait référence au gène, celui-ci est écrit en italique, par exemple : *CYP3A4*.

Chez l'homme il existe 17 familles de cytochromes et 42 sous familles.



CYP 1, 2 et 3 —————→ **Métabolisme des xénobiotiques**

CYP 4, 5, 7, 8, 11, 17, 19, 20, 21, —→ Métabolisme des substrats endogènes
24, 26, 27, 39, 46 et 51

Ces enzymes sont présentes en grande quantité dans les hépatocytes, dans les entérocytes de l'intestin grêle, et en plus faible quantité dans d'autres tissus comme le rein, le poumon, le cerveau, la peau.

Réactions catalysées par les CYPs

Les cytochromes P450 (CYP) ont pour fonction l'oxydation des molécules au moyen de réactions chimiques très diverses. Les CYP sont des hémoprotéines dont la structure est schématisée (**figure 3**). Le CYP est constitué d'une chaîne polypeptidique simple et d'un groupement prosthétique, noyau tétrapyrrolique (protoporphyrine) associé à un atome de fer, c'est à- dire un noyau héminique. Le Cytochrome P450 est donc une hémoprotéine contenant une molécule d'hème par molécule d'apoprotéine.

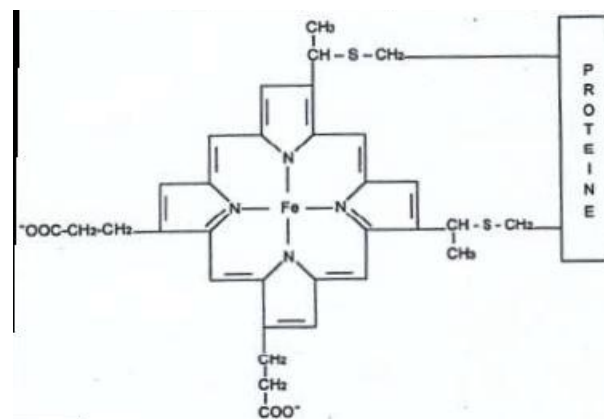


Figure 3. Structure d'un cytochrome P450 et du noyau porphyrinique

Les CYPs ont pour fonction l'oxydation des molécules au moyen de réactions chimiques très diverses. La réaction la plus courante des CYPs correspond à une activité monooxygénase, à savoir le transfert d'un atome d'oxygène provenant d'une molécule de dioxygène sur un substrat organique. Pour cette activité monooxygénase, les CYPs reçoivent des électrons depuis le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) ou NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) par une flavoprotéine (FAD-FMN) (FAD :

Flavine adénine dinucléotide, FMN : flavine mononucléotide) ; la NADP cytochrome P450 réductase, très fréquemment couplées à l'enzyme et ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique figure 4.

Ces réactions de cytochromes P450 monooxygénases peuvent s'écrire suivant la formule



Une série de réactions moléculaires s'opèrent entre le substrat (RH), l'oxygène (O_2), les électrons, le pouvoir réducteur (NADPH ou NADH) et l'atome de fer au centre du noyau porphyrique du cytochrome P450 (figure 04). En résumé, la partie héminique du CYP (de structure tétrapyrrolique), avec un atome de fer à l'état ferreux (Fe^{2+}), est capable de fixer l'oxygène moléculaire et de l'activer. Cet oxygène activé est ensuite transféré sur le xénobiotique, en regard de l'atome de fer alors à l'état ferrique (Fe^{3+}). Cette réaction nécessite du NADPH et des réductases, qui vont transformer l'atome de fer de l'état ferrique à l'état ferreux pour que le cycle d'oxydation puisse à nouveau fonctionner.

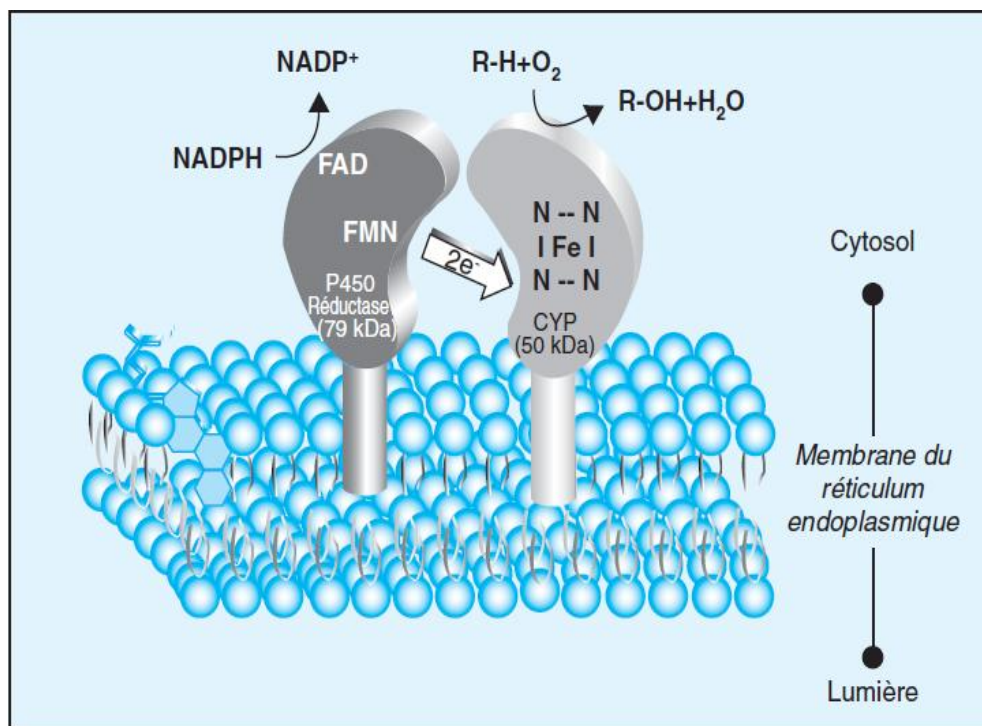


Figure 4. Localisation membranaire de cytochromes P450 dans le réticulum endoplasmique.

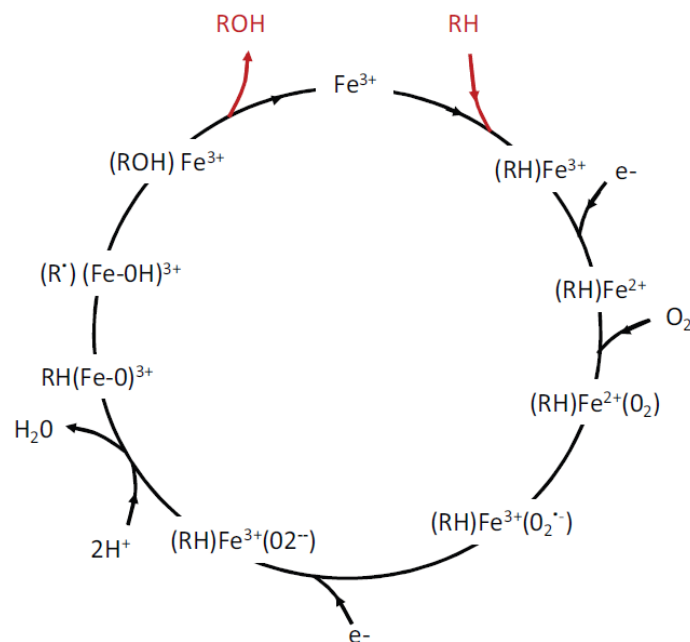


Figure 5. Cycle catalytique des cytochromes P450 à activité monooxygénase

Ces réactions de type monooxygénase correspondent par exemple à l'hydroxylation d'une liaison C-C en C-OH, à la formation d'époxydes, à la N-, S- ou O-déalkylation oxydative (insertion d'un atome d'oxygène sur une liaison C-H proche d'un hétéroatome comme l'oxygène, l'azote ou le soufre entraînant le clivage de l'hétéroatome), à une S-oxydation (passage de R-S-R' à RR'S+O-) ou à une Mhydroxylation (Figure 6). D'autres types de réactions d'oxydation moins fréquentes et différentes des réactions de type monooxygénase, peuvent être réalisées par les CYPs.

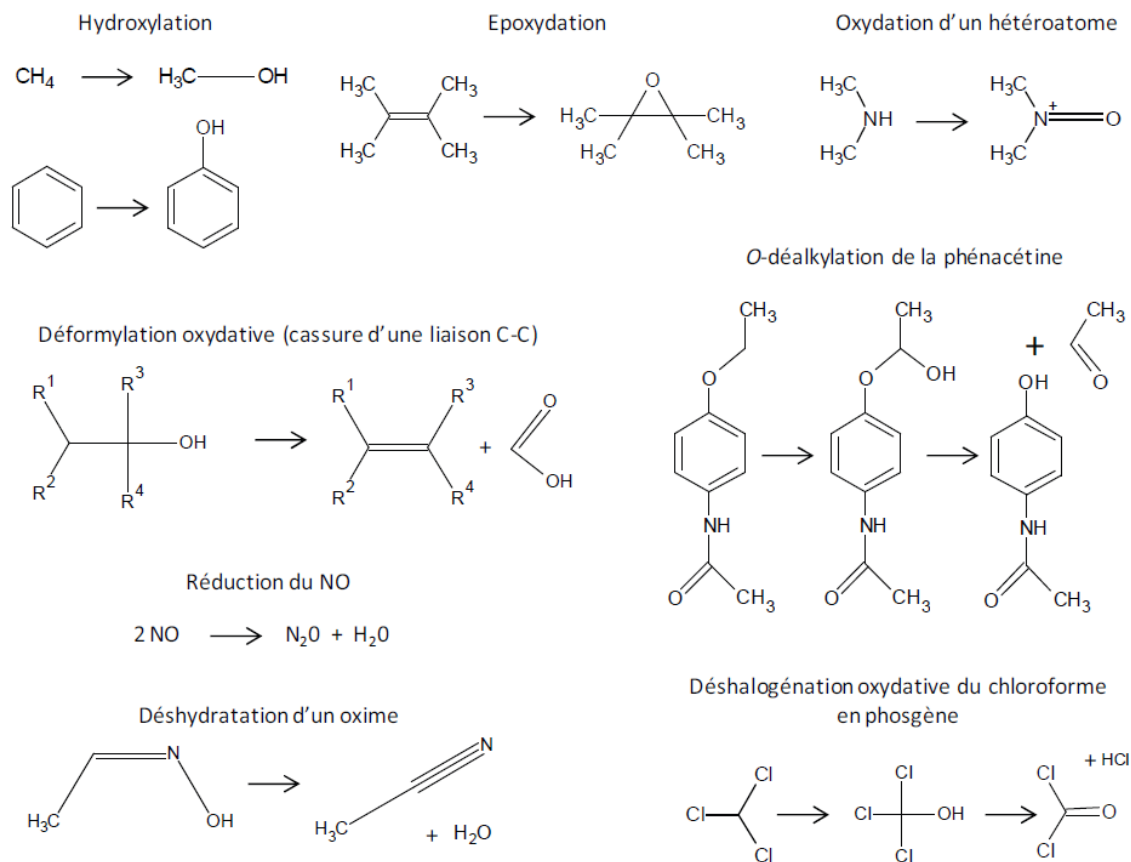


Figure 6. Exemples de réactions chimiques catalysées par les CYPs

3.2. Flavine-monooxygénases

Les monooxygénases dépendantes des flavines (FMO) sont en importance la deuxième famille d'enzymes impliquées dans les réactions de phase I. Elles participent à une grande variété de processus biologiques. Beaucoup de ces enzymes contribuent au catabolisme de composés endogènes et exogènes, mais d'autres participent à l'anabolisme d'hormones et de vitamines. Les FMO incorporent un atome d'oxygène du dioxygène dans un substrat en réduisant l'autre atome d'oxygène en eau (Figure 7). Comme pour les CYPs, les FMO sont abondamment présentes dans le foie, les reins, le tractus gastro-intestinal et les poumons. Certaines FMO ont été mises en évidence dans la peau et le cerveau. Ces enzymes ancrées à la membrane du réticulum endoplasmique sont responsables d'hydroxylations, de sulfoxidations, d'époxydations et d'halogénations. La grande sélectivité de ces enzymes permet des réactions régio- et énantiosélectives.

Les substrats des FMO peuvent être des amines (primaires, secondaires, tertiaires), des hydroxylamines, des hydrazines, des thiols, des sulfures et disulfures, des thiocarbamates, des mercaptoimidazoles, des dérivés phosphorés, séléniques ou encore boriques.

Actuellement, les FMO sont classées selon leur structure et leurs propriétés fonctionnelles (cofacteur, donneur d'électrons, type de réaction) en 8 groupes dénommés A à H.

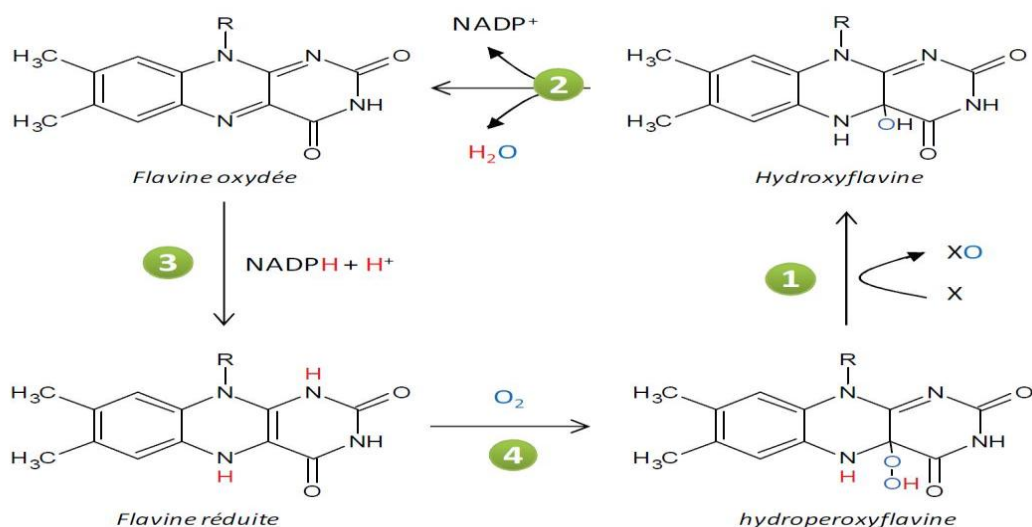


Figure 7. Mécanisme général d'oxydation d'un substrat (X) par les FMO

3.3. Les alcools et aldéhydes déshydrogénases (ADH et ALDH)

Ces enzymes catalysent l'oxydation de fonctions alcool en aldéhydes ou cétones, puis en acides carboxyliques. La réaction d'oxydation ne fait pas intervenir une molécule d'oxygène comme pour les CYP ou les FMO. Les ADH et ALDH ont été détectées dans l'épiderme, les glandes sébacées et les follicules pileux.

3.4. Les monoamines oxydases (MAO)

Les monoamines oxydases existent sous deux isoformes (MAO-A présente dans le foie, le tube digestif et le placenta, et MAO-B surtout présente dans les thrombocytes). Elles catalysent la désamination oxydative des amines primaires pour former des aldéhydes.

3.5. Estérases

Les estérases interviennent dans l'hydrolyse des fonctions esters présentes sur les xénobiotiques, libérant les fonctions alcool et acide carboxylique correspondantes.

3.6. Epoxydes hydrolases

Les époxydes hydrolases (EH) sont des enzymes microsomales réalisant la détoxification des époxydes par hydratation et formation de diols.

4. Les enzymes de phase II : réactions de conjugaison

Les réactions de conjugaison, réalisées par les EMX de phase II, conduisent au couplage du xénobiotique à un substrat endogène, consécutivement ou pas à une fonctionnalisation préalable par les enzymes de phase I selon le xénobiotique. Une réaction de phase II peut avoir lieu directement pour de nombreux composés. Différents types de conjugaison existent incluant la glucuronidation, la sulfatation, la méthylation, l'acétylation ou encore l'ajout d'une molécule de glutathion ou d'un acide aminé (Tableau 3)

Tableau 3. Principales familles des EMX de phase II

Familles d'EMX de phase II	Fonction
UDP-glucuronyltransférases (UGT)	Conjugaison d'un acide glucuronique depuis l'uridine diphosphate acide glucuronique (UDPGA) sur le xénobiotique
Sulfotransférases (SULT)	Conjugaison d'un sulfate depuis le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) sur le xénobiotique
N-acétyltransférases (NAT)	Conjugaison d'un acétate depuis l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) sur le xénobiotique
Méthyl-transférases (MT)	Conjugaison d'un méthyle depuis la S-adénosylméthionine (SAM) sur le xénobiotique
Glutathion-S-transférases (GST)	Conjugaison d'un glutathion sur le xénobiotique

4.1. Les UDP-glucuronyltransférases

Les UDP-glucuronyltransférases (UGTs) constituent une superfamille d'enzymes qui catalysent le transfert d'un sucre provenant de l'uridine diphosphate acide

glucuronique (UDPGA) sur un substrat nucléophile (O-, N-, S- ou C- ; Figure 8). La formation de la liaison avec l'UDPGA est possible pour de nombreux types de substrats comme des alcools aliphatiques, des phénols, des acides carboxyliques, des thiols ou des amines (primaires, secondaires, tertiaires). Les enzymes de chaque famille d'UGTs (exemple : UGT1, UGT2) partagent au moins 40% d'homologie dans leur séquence ADN, et les enzymes d'une même sous-famille en partagent 60% (exemple UGT1A, UGT1B). Les UGTs sont exprimées dans de nombreux tissus comme le foie, les reins, les intestins, les poumons, les glandes surrénales, la rate, la peau, les gonades et le cerveau. Au niveau cellulaire, les UGTs sont ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique.

La glucuronidation entraîne le plus souvent une modification du pKa des xénobiotiques ayant pour conséquence une meilleure solubilité aqueuse qui facilite alors leur élimination par voie biliaire ou rénale. Par exemple alors que le pKa du phénol, peu soluble dans un milieu aqueux, est de 10, celui de son conjugué glucuronide est de 3,4 environ. Les UGTs participent aussi à l'élimination de composés endogènes tels que la bilirubine, les acides biliaires, les hormones stéroïdiennes, les acides rétinoïques et les amines biogènes comme la sérotonine. Dans la majorité des cas, la glucuronidation d'un xénobiotique entraîne la formation d'un métabolite dépourvu d'activité biologique, et donc, non toxique. Toutefois il existe des exemples de xénobiotiques portant certaines fonctions chimiques susceptibles de devenir réactives après glucuronidation (figure 9).

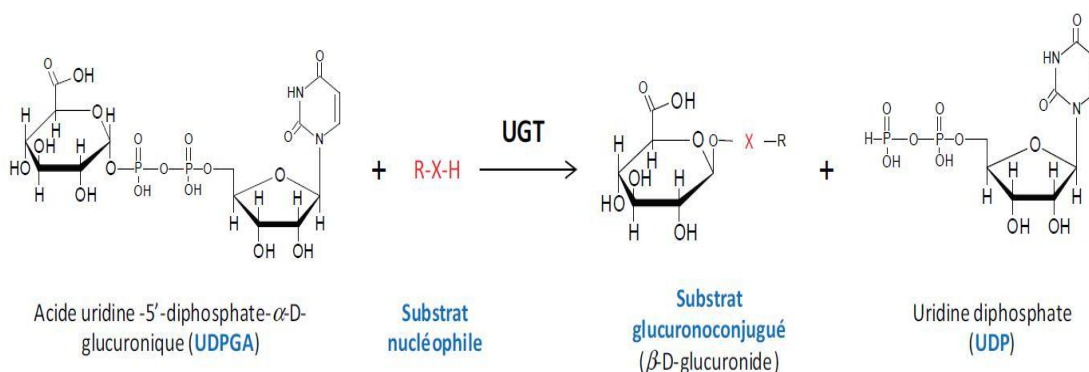


Figure 8. Réaction de conjugaison d'un substrat nucléophile avec l'UDPGA par l'UGT

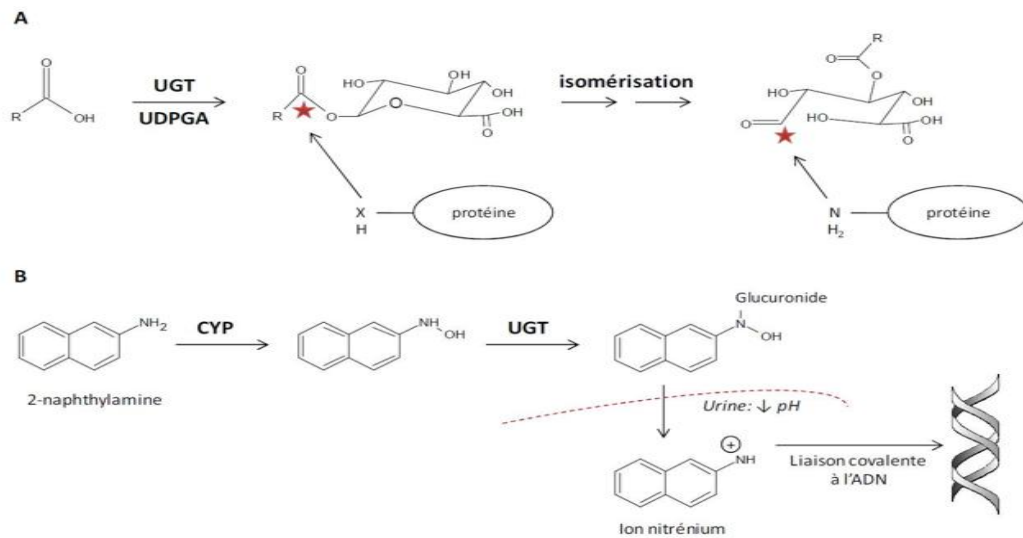


Figure 9. Formation de métabolites glucuronoconjugués réactifs. A. Cas d'acyl glucuronides. B. Cas de l'ion nitrenium issu de la 2-naphthylamine

4.2. Les sulfotransférases

Les sulfotransférases (SULTs) constituent une superfamille d'enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe sulfate à partir du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) sur un groupe accepteur (O, N- ou S-) d'un substrat (Figure 10). De manière générale, la sulfatation est impliquée dans le métabolisme de substrats endogènes (stéroïdes, catécholamines, sérotonine, iodothyronines, eicosanoïdes, rétinol, 6-hydroxymélatonine, acide ascorbique, vitamine D) aussi bien qu'exogènes.

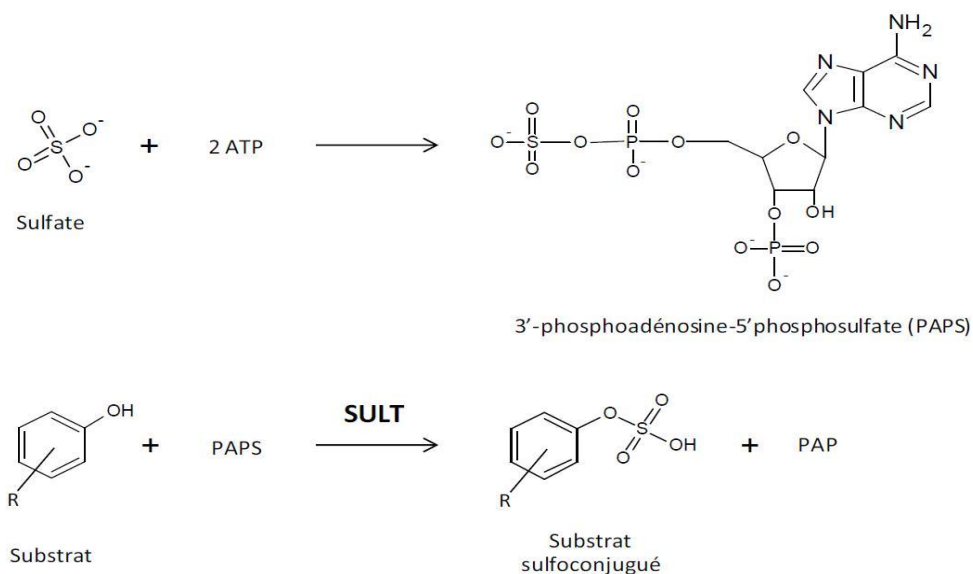


Figure 10. Formation du PAPS et réaction de sulfoconjugaison

Les SULTs peuvent être localisées dans le cytoplasme ou attachées à la membrane de l'appareil de Golgi. Ces dernières sont responsables de la sulfoconjugaison de peptides, de protéines, de lipides et de glycosaminoglycanes, alors que les SULTs cytosoliques prennent en charge les xénobiotiques et les petites molécules endogènes comme les stéroïdes, les acides biliaires et les neurotransmetteurs. Les SULTs sont exprimées dans de nombreux organes et tissus : foie, cerveau, glandes mammaires, intestins, poumons, glandes surrénales, endomètre, placenta et rein.

Dans la très grande majorité des cas, la sulfatation des xénobiotiques conduit à la formation de métabolites non toxiques. Pour autant, la sulfatation de certains composés chimiques (procancérigènes) donne lieu à la formation d'intermédiaires hautement réactifs qui peuvent établir des liaisons covalentes délétères avec l'ADN.

4.3. Les N-acétyltransférases

Les N-acétyltransférases (NATs) catalysent le transfert d'un groupe acétyl depuis l'acétyl-coenzyme A (AcCoA) vers des amines aromatiques ou l'azote terminal d'hydrazines (Figure 11). Elles sont responsables de O- et de N-acétylation. Chez l'Homme, les NATs sont codés par deux gènes (NAT1 et NAT2). Les NATs sont des enzymes cytosoliques également présentes dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Ces EMX présentent une distribution tissulaire assez distincte et une relative spécificité de substrat. Chez l'Homme les NAT1 sont exprimées dans l'ensemble des organes alors que l'activité des NAT2 a été retrouvée dans le foie, l'épithélium intestinal et le colon.

Les NATs sont impliquées dans des processus de bioactivation et de détoxification des xénobiotiques. Contrairement aux autres réactions de conjugaison, le transfert d'un groupe acétyl n'entraîne pas une augmentation de la solubilité aqueuse du métabolite. L'exemple le plus courant est celui des sulfonamides N-acétylés qui sont susceptibles de précipiter dans les urines. Les N-acétylations peuvent représenter une étape de bioactivation de xénobiotiques impliqués dans des processus de cancérogénèse. C'est le cas des amines aromatiques comme la benzidine, cancérigène reconnu chez l'Homme. Cette substance était auparavant utilisée pour la production de colorants azoïques.

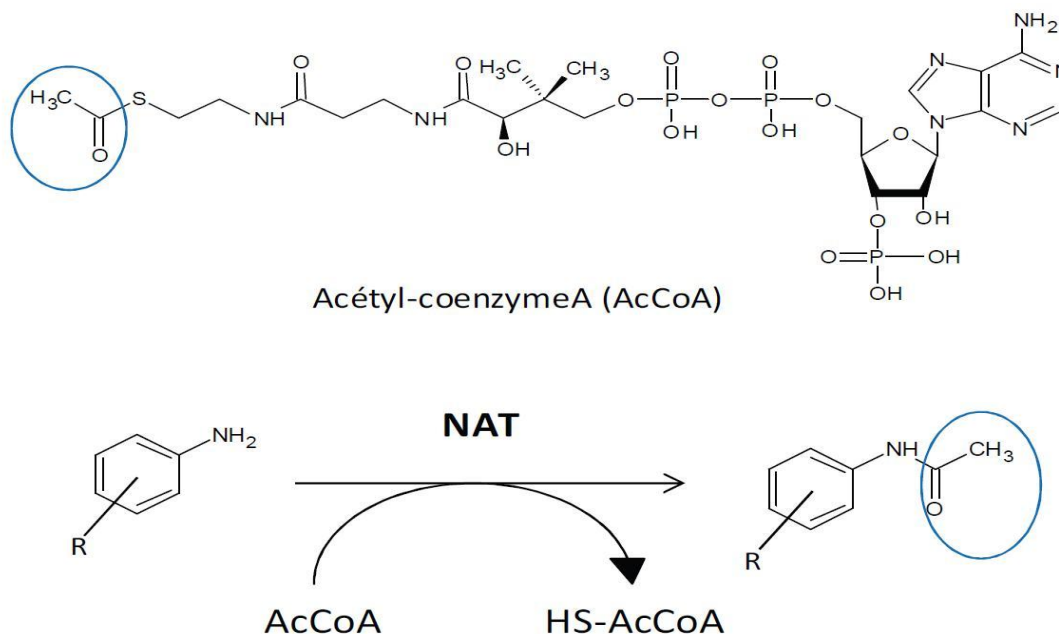


Figure 11. Réaction de N-acétylation des arylamines par les N-acétyltransférases

4.4. Les Glutathion-S-transférases

Les Glutathion-S-transférases (GSTs) catalysent le transfert d'un glutathion (GSH, tripeptide endogène) via la fonction thiol (formation d'une liaison thioéther) sur un substrat (Figure 12). Les GSTs sont responsables d'une grande variété de réactions comprenant par exemple des substitutions aromatiques nucléophiles, des isomérisations, des réductions d'hydroperoxydes ou encore des conjugaisons de composés hydrophobes et électrophiles. Les substrats pris en charge par les GSTs sont les composés capables de réagir avec une fonction thiol. Ce sont, en règle générale, des substrats électrophiles comme les époxydes, les cétones α,β -insaturées, les quinones, les sulfoxides, les esters, les peroxydes et les ozonides. La conjugaison au glutathion est notamment essentielle dans la détoxification d'époxydes dérivés d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et des cétones α,β -insaturées. Les GSTs sont également impliquées dans la prise en charge de composés endogènes comme les stéroïdes et les prostaglandines.

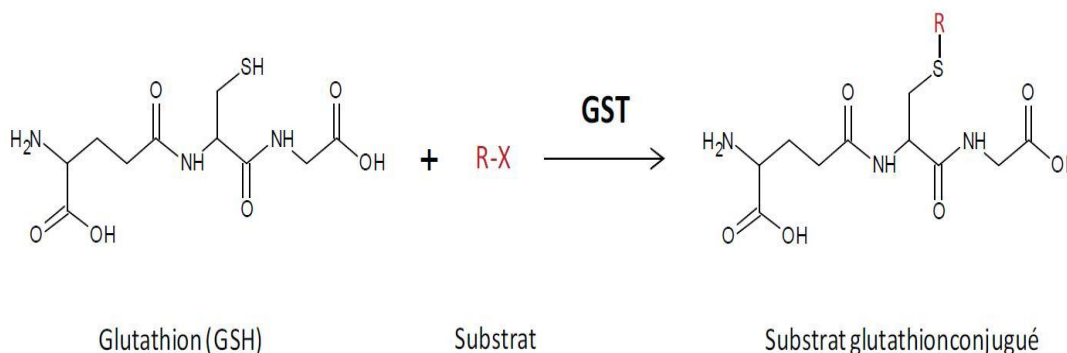


Figure 12. Réaction de conjugaison du glutathion

Deux principales superfamilles de GSTs ont été décrites. La première correspond à des GSTs dimériques solubles, divisées en huit classes (Alpha, Kappa, Mu, Pi, Sigma, Theta et Omega) et impliquées dans les processus de biotransformations de xénobiotiques et d'endobiotiques. Ces GSTs ont été retrouvées principalement dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau, les mitochondries et les peroxysomes. L'autre famille de GST, désignée par le sigle MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoids and glutathione metabolism) est impliquée dans le métabolisme de l'acide arachidonique. Les GSTs solubles et les MAPEG sont largement exprimées dans l'ensemble de l'organisme (foie, rein, cerveau, pancréas, testicules, coeur, poumons, intestins, muscles squelettiques, prostate et rate).

Les GSTs jouent un rôle important dans la biotransformation des xénobiotiques et dans la protection cellulaire au stress oxydatif. Les GSTs vont notamment permettre de diminuer le stress oxydant notamment représenté par les espèces réactives de l'oxygène (radical superoxide et peroxide d'hydrogène) naturellement formé lors des réactions chimiques catalysées par des CYPs et autres oxydases. Dans beaucoup de cas, la conjugaison d'un GSH permet de neutraliser et d'inactiver un composé réactif et de favoriser son excrétion rénale.

En conclusion, les réactions de phase I et de phase II conduisent dans la majorité des cas à la formation de métabolites dépourvus d'activité biologique. Toutefois, les EMX entraînent parfois la formation de métabolites réactifs et toxiques. Etant donné que toutes les espèces n'expriment pas qualitativement et quantitativement les mêmes EMX, il est important de noter que le devenir d'un xénobiotique entre des espèces différentes peut être

variable. Il en est de même entre des modèles *in vitro* d'origine (Homme, poisson, rat, souris, cobaye par exemple) et de nature (lignées cellulaires, cultures primaires, cultures d'explants par exemple) différentes. Par conséquent, la prise en compte du devenir des xénobiotiques dans l'interprétation toxicologique d'études menées entre des modèles *in vitro* ou *in vivo*, est nécessaire.

II. Les transporteurs des xénobiotiques

À ce jour, plus de 400 transporteurs membranaires ont été identifiés dans le génome humain. Ils sont classés en deux grandes familles : les transporteurs ABC (ABC signifiant *ATP-binding cassette*) et les « solute carriers » (SLC). Ces transporteurs sont exprimés dans les diverses membranes cellulaires du corps humain et facilitent l'entrée (l'influx) ou la sortie (l'efflux) de substrats endogènes tels des acides aminés, des nucléotides, des hormones ou des sucres dans les cellules membranaires ou dans les organelles. Certains transporteurs sont toutefois aussi reconnus pour effectuer le transport de xénobiotiques, des substrats exogènes, en plus du transport de molécules endogènes. On les retrouve surtout dans des organes ayant une fonction biologique de barrières tel l'intestin, le foie, les reins, le placenta et la barrière hématoencéphalique où ils jouent un rôle important dans la biodisponibilité, l'élimination biliaire, la sécrétion et la réabsorption tubulaires rénales, l'exposition foetale aux xénobiotiques et la distribution des médicaments au cerveau.

1. Les « ABC-transporters »

La superfamille des transporteurs ABC est une des plus importantes classes de protéines identifiées à ce jour. On y retrouve de nombreuses protéines impliquées dans le transport de molécules biologiques endogènes et exogènes à travers les membranes cellulaires. Bien qu'il existe une grande variété de transporteurs ABC, ils partagent la même structure de base, illustrée dans la Figure 13, composée de domaines transmembranaires (TMD) hydrophobes généralement formés de 6 hélices alpha et de deux domaines cytoplasmiques de liaison de nucléotides (nucleotide binding domains [NBD]) capables de lier et hydrolyser des molécules d'ATP pour fournir l'énergie nécessaire au transport des molécules. La séquence des acides aminés des NBD est très bien conservée parmi les différentes sous-familles de transporteurs ABC et présente de 30 à 40 % d'homologie dans une région clé de 200-250 acides aminés. Ce sont les TMD, avec leur grande variabilité de séquence, qui confèrent la spécificité des transporteurs ABC pour leurs substrats. En effet, les TMD forment le canal transmembranaire et contiennent les sites de liaison des substrats. De plus, les transporteurs ABC possèdent tous une ou plusieurs branches de N-glycosylation sur leurs boucles extracellulaires qui ne semblent pas nécessaires à l'activité des transporteurs, mais qui semblent impliquées dans l'acheminement du transporteur vers la membrane cellulaire de même que dans son insertion et sa stabilité à la membranaire cellulaire.

Environ une centaine de transporteurs ABC, divisés en 7 sous-familles (ABCA à ABCG), ont été identifiés, incluant 49 chez l'humain dont 12 impliqués dans le transport de xénobiotiques.

Les transporteurs ABC de xénobiotiques se répartissent dans 3 familles :

- ABCB (P-glycoprotéine)
- ABCC (MRPs)
- ABCG (ABCG2/BCRP)

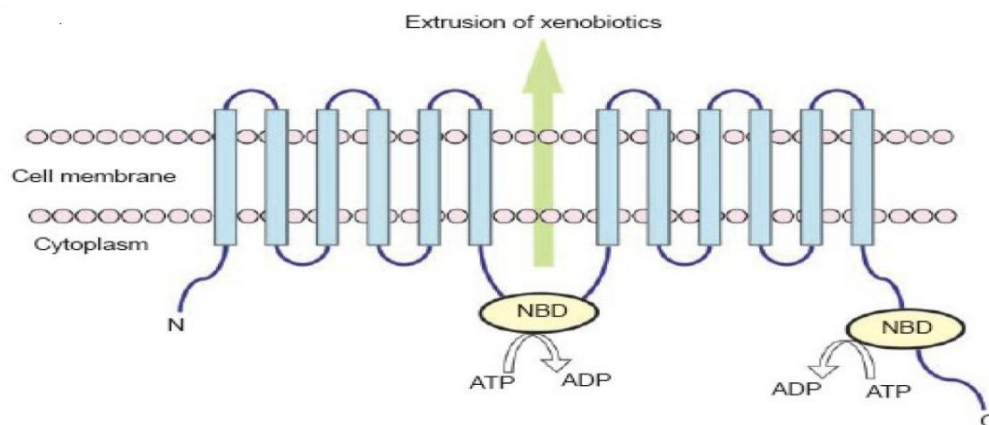


Figure 13. Structure secondaire des transporteurs ABC. Exemple du transporteur ABCB1 ou P-glycoprotéine.

1.1.P-glycoprotéine

La sous famille ABCB comprend 11 membres et 3 d'entre eux sont exprimés au niveau du pôle biliaire des hépatocytes : ABCB1 = MDR1 (multidrug resistance protein 1) = P-gp (P-glycoprotein), ABCB4 = MDR3 et ABCB11 = BSEP (Bile Salt Export Pump).

La P-glycoprotéine (P-gp) a été le premier transporteur ABC identifié chez l'humain et est sans contredit, à ce jour, le plus étudié et le mieux caractérisé. La P-gp a été découverte dans les années 1970 par Juliano et Ling qui ont identifié une protéine hautement glycosylée de 170 kDa exprimée à la surface de cellules ovariennes mutantes de hamster. Cette protéine réduisait la perméabilité de la membrane cellulaire pour plusieurs agents chimiothérapeutiques, et ce, proportionnellement à son niveau d'expression. Ils l'ont ainsi nommée P-glycoprotéine, P pour perméabilité. La P-gp peut aussi être désignée ABCB1, c'est-à-dire membre 1 de la sous-famille B des transporteurs ABC, ou MDR1 pour *multidrug resistance 1*. Il est, maintenant, bien connu que le mécanisme d'action de la P-gp réduisant la perméabilité de certains médicaments consiste à empêcher l'accumulation intracellulaire de

ses substrats en les rejetant à l'extérieur des cellules contre leur gradient de concentration (efflux).

On retrouve la P-gp du côté apical dans la muqueuse intestinale, les canalicules biliaires et le tubule proximal rénal où elle limite l'absorption intestinale et favorise l'élimination biliaire et urinaire des substances (Figure 17). De plus, on retrouve la P-gp dans les tissus avec une fonction de barrière comme la barrière hématoencéphalique, la barrière hémato-testiculaire ou dans le placenta où elle prévient l'accumulation de substrats dans ces organes. Cette distribution à travers le corps humain laisse supposer que le rôle de la P-gp est de protéger le corps humain et certains organes comme le cerveau de l'accumulation de substances toxiques comme les xénobiotiques.

La P-gp se démarque des autres transporteurs par la grande diversité structurale de ses substrats. Elle effectue le transport de plusieurs composés cationiques ou neutres, mais aussi de quelques composés anioniques tel que le méthotrexate. De plus, on connaît de nombreux inducteurs et inhibiteurs de la P-gp.

1.2 Les « Multidrug Resistance-Associated Proteins » (MRP)

Les « *multidrug resistance-associated proteins* » (MRP) font partie de la sous-famille ABCC des transporteurs ABC. Il s'agit de transporteurs d'efflux exprimés dans plusieurs membranes cellulaires, particulièrement dans l'intestin, le foie, les reins, la barrière hématoencéphalique et la barrière placentaire, ce qui témoigne de leur implication dans l'absorption, la distribution et l'élimination des xénobiotiques ainsi que dans leur fonction de barrière, protégeant les milieux essentiels et vulnérables aux xénobiotiques toxiques. Les MRP ont été décrits pour la première fois dans la lignée de cellules pulmonaires cancéreuses H69AR résistante à la doxorubicine, ainsi qu'à plusieurs agents chimiothérapeutiques, ne surexprimant pas la P-gp. Les auteurs y ont découvert une protéine de 1522 acides aminés fortement surexprimée qu'ils ont appelée « *multidrug resistance-associated protein* » et qu'ils ont identifiée comme faisant partie de la superfamille des transporteurs ABC. Cette protéine est maintenant connue sous le nom de MRP1 ou ABCC1, le premier de plusieurs MRP.

Les MRP présentent une grande diversité de substrats lipophiles anioniques endogènes et exogènes avec un certain chevauchement entre les différents transporteurs. Les MRP transportent de nombreuses molécules endogènes ou exogènes conjuguées au glutathion (p. ex : leukotriène C4), à l'acide glucuronique (p. ex : bilirubine) ou au sulfate (p. ex : sels

biliaires) par le métabolisme de phase II. L'efflux des métabolites de médicaments ou de molécules endogènes conjugués est souvent la dernière étape dans leur processus de détoxification. Les MRP y jouent donc un rôle clé puisqu'il s'agit de la plus grande famille de transporteurs d'efflux impliqués dans l'excrétion biliaire, urinaire ou intestinale des molécules conjuguées.

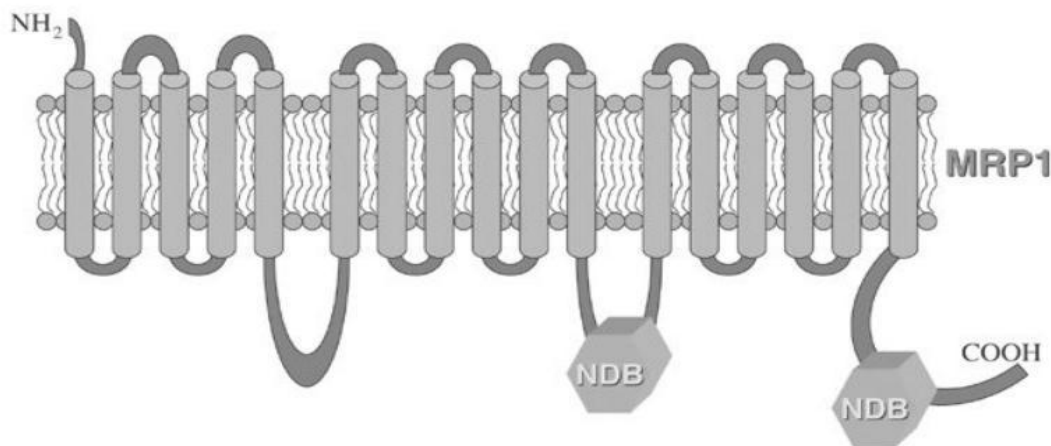


Figure 14. Topologie transmembranaire prédite de la «*multidrug resistance-associated proteins*» (MRP1)

Il existe 9 différents MRP chez l'humain et de nombreux gènes et protéines orthologues ont été identifiées dans différentes espèces mammifères. Les MRP2, MRP3 et MRP4, ainsi que leurs orthologues Mrp2, Mrp3 et Mrp4 chez le rat, sont toutefois les plus impliquées dans l'absorption et l'élimination des xénobiotiques. À la barrière hématoencéphalique, ce sont les transporteurs MRP4 et MRP5 qui jouent un rôle dans la protection du cerveau contre les xénobiotiques. L'expression de ces transporteurs peut être induite par de nombreuses molécules.

1.3 Les « *Breast Cancer Resistance Protein* » (BCRP)

De la famille ABCG des transporteurs ABC, le membre ABCG2, ABCG2 aussi appelée BCRP est le plus impliqué dans la pharmacocinétique des xénobiotiques. ABCG2 diffère des autres transporteurs ABC de par sa structure. En effet, ABCG2 est un demi-transporteur avec un seul NBD et 6 TMD (Figure 15). Son homodimérisation est nécessaire à son activité.

Les substrats de BCRP sont de grosses molécules hydrophobes, anioniques ou cationiques. Parmi eux, on retrouve, entre autres, des agents anticancéreux, des statines, des agents antiviraux, des substances cancérogènes et des molécules glucuronidées ou sulfatées.

L'organe exprimant le plus de BCRP est le placenta. On le retrouve aussi en moins grande quantité, entre autres, dans les cellules endothéliales cérébrales, les canalicules hépatiques, les entérocytes du petit intestin et les cellules interstitielles testiculaires. Il semblerait donc que BCRP soit impliqué dans l'excrétion biliaire de ses substrats, de même que dans la limitation de leur absorption intestinale et dans la protection d'organes ou de cellules vulnérables (cerveau, testicules) contre les xénobiotiques.

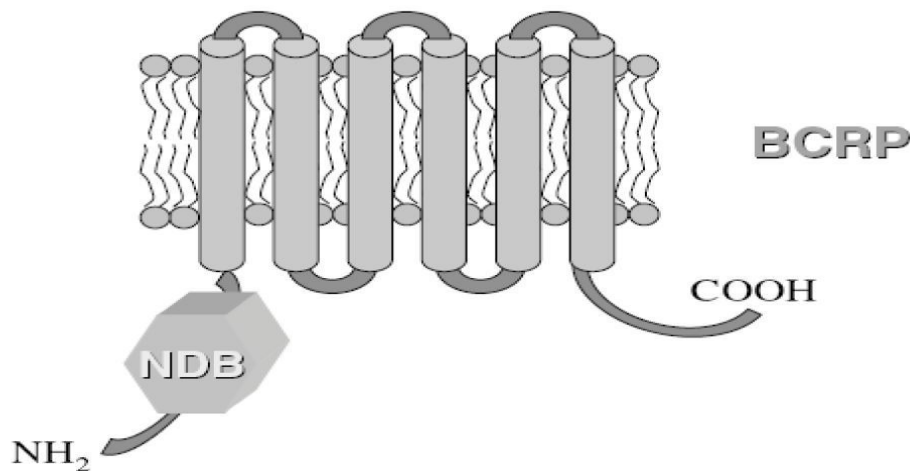


Figure 15. Topologie transmembranaire prédite de la «breast cancer resistance protein» (BCRP).

2. Les « Solute Carriers »

Contrairement aux transporteurs ABC, les transporteurs faisant partie de la famille des « solute carriers » (SLC) n'utilisent pas l'énergie de l'ATP pour transporter leurs substrats mais l'énergie produite par une différence de potentiel électrochimique créé par un transport actif primaire. Ils effectuent plutôt le transport des xénobiotiques par transport facilité, c'est-à-dire que leur substrat est transporté selon son gradient de concentration, ou par transport secondaire actif, c'est-à-dire qu'ils transportent leur substrat contre leur propre gradient électrochimique grâce à un second substrat (p.ex. sodium, hydrogène) voyageant en sens inverse selon son propre gradient de concentration.

Les SLC sont des échangeurs qui fonctionnent en mode uniport (un seul composé est transporté), antiport (le composé est transporté dans le sens inverse du gradient ionique) ou symport (deux composés sont transportés simultanément, ce système est également appelé cotransport).

Les transporteurs SLC participent à l'absorption cellulaire des xénobiotiques (uptake). C'est également une sous famille vaste avec de nombreux membres. Il existe au moins 48

familles de SLC chez l'humain et dans plusieurs espèces. Par contre, toutes ne sont pas impliquées dans le transport des xénobiotiques.

Les familles identifiées comme impliquées dans le transport des molécules exogènes sont :

- les «Organic Anions Transporting Polypeptide» ou OATPs,
- les «Organic Cations Transporters» ou OCTs,
- les «Organic Anions Transporters» ou OATs,
- les «Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide» ou NTCPs,
- les « Multidrug And Toxin Extrusion OU MATE» ,
- et les «*peptide transporteurs*» ou PEPT.

2.1. Les « *Organic Anion Transporting Polypeptides* » (OATP)

Les OATP sont des glycoprotéines à 12 passages transmembranaires, d'un poids moléculaire de 80 à 90 kDa, ayant leurs extrémités carboxy et amino terminales dans le milieu intracellulaire (figure 16). Ils sont des transporteurs sodium-indépendants d'anions organiques. Bien que certaines études suggèrent que les OATP sont des échangeurs d'anions organiques, les mécanismes du transport des substrats par les OATP n'ont pas été très bien caractérisés.

Les OATP sont retrouvés dans plusieurs tissus. Ils sont exprimés au niveau intestinal et vont faciliter l'influx de molécules substrats au travers de la membrane intestinale ; ils agissent en sens inverse des transporteurs d'efflux. Plusieurs sous-types ont été identifiés : OATP-A, B, C, D, E, F, et 8. Les sous types B, C et 8 sont exprimés dans le foie et permettant l'influx de molécules mais ils travaillent également en tandem avec les transporteurs d'efflux pour faciliter l'élimination de molécules de l'organisme. Le rôle des OATP dans l'absorption intestinale et l'élimination hépatique des médicaments est bien connu. Toutefois, bien que les OATP aient été identifiés dans les reins et le cerveau, leur implication dans l'élimination urinaire des médicaments et dans la distribution des médicaments au cerveau reste à déterminer

Les OATP sont reconnus pour leur grande variété de substrats amphipatiques anioniques, neutres ou cationiques incluant des molécules endogènes, tels des sels biliaires, des hormones stéroïdiennes conjuguées ou des hormones thyroïdiennes, ainsi que des xénobiotiques, tels des statines, des agents anticancéreux ou des antibiotiques.

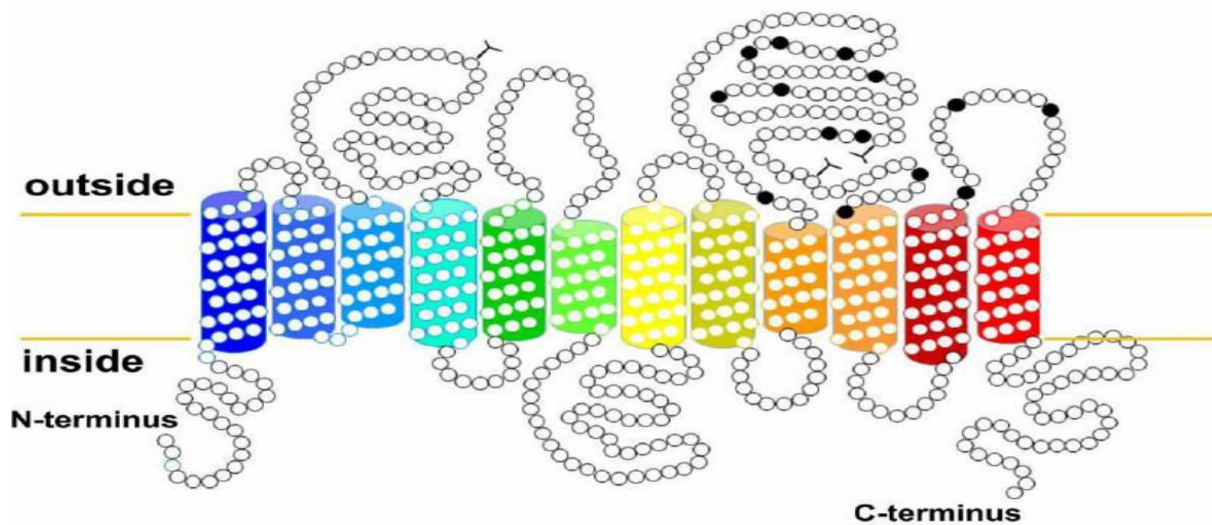


Figure 16. Structure protéique des OATPs

2.2. Les « *Organic Anion Transporters* » (OAT)

Dans la sous-famille SLC22 on retrouve principalement 3 sous-groupes de transporteurs divisés selon leurs substrats et leur mécanisme de transport : les transporteurs d'anions organiques (*organic anion transporters* [OAT]), les transporteurs de cations organiques (*organic cation transporters* [OCT]), et les « *organic cation/carnitine transporters* » ou « *novel organic cation transporters* » [OCTN].

Les transporteurs d'anions organiques (*organic anion transporters*) font partie de la sous-famille SLC22 de la grande famille des SLC. Les SLC22 transportent une grande variété de composés incluant des médicaments, des toxines environnementales ou des métabolites endogènes à travers les membranes cellulaires. Il s'agit de transporteurs polyspécifiques ayant de multiples substrats et de nombreux ligands pouvant inhiber leur activité. Les SLC22 sont exprimés dans de nombreux organes incluant l'intestin, le foie, les reins et le cerveau, ce qui témoigne de leur important rôle dans l'absorption et l'élimination des xénobiotiques.

Les OATs permettent le transport d'anions organiques de petit poids moléculaire au niveau rénal et hépatique. OAT1-4 et OAT1-3 ont été identifiés au niveau rénal et OAT2 et 5 au niveau du foie.

2.3. Les « *Organic Cation Transporters* » (OCT)

Le sous-groupe comprend les transporteurs de cations organiques (*organic cation transporters* [OCT]) médiant la diffusion facilitée de cations organiques, incluant les bases

faibles, par un mécanisme électrogénique indépendant du sodium pouvant être réversible. Le gradient électrochimique du cation organique transporté fournit l'énergie nécessaire au transport. Trois OCT1-3 (SLC22A1-3) ont été identifiés et sont exprimés majoritairement dans le foie et les reins, et OCT2 a aussi été retrouvé en moindre quantité dans le cerveau. Parmi les substrats des OCT, on retrouve des neurotransmetteurs (p.ex. acétylcholine, dopamine, sérotonine), des hormones (p.ex. progestérone, corticostérone) et différents médicaments (p.ex. vérapamil, metformine, quinine, morphine, cimétidine).

2.4. LES «organic cation/carnitine transporters» ou «novel organic cation transporters» (OCTN)

Les OCTN1-3 sont exprimés dans l'intestin, le foie et les reins où ils jouent un rôle essentiel dans la coabsorption et l'excrétion de la carnitine et de certains médicaments comme la quinidine et le vérapamil.

2.5. LES «Na⁺-Taurocholate Co-transporting Polypeptide» (NTCP)

La sous-famille SLC10 comprend actuellement 7 membres qui ont été identifiés en fonction de leurs homologies de séquence. Parmi eux, NTCP (SLC10A1 = Na⁺-Taurocholate Co-transporting Polypeptide), ASBT (SLC10A2 = Apical Sodium dependent Bile acid Transporter) et SOAT (SLC10A6 = Sodium-dependent Organic Anion Transporter) ont aujourd'hui des spectres de substrats assez bien définis. Les autres membres de cette famille sont considérés comme orphelins puisqu'aucun substrat n'a été identifié à ce jour. NTCP est le premier membre de cette famille et a été isolé chez le rat en 1978. Chez l'homme, c'est un transporteur spécifique du foie qui, initialement, a été décrit pour son intervention dans le cycle entérohépatique de par sa captation des acides biliaires au niveau du foie. Bien que NTCP ait été identifiée pour le transport des acides biliaires, son spectre de substrat s'est aujourd'hui notablement élargi puisque des hormones thyroïdiennes stéroïdiennes et des médicaments couplés ou non à des acides biliaires sont reconnus comme faisant partie de ses substrats.

2.6. LES «Multidrug And Toxin Extrusion» (MATE)

Les transporteurs de la sous-famille SLC47 sont plus communément appelés MATE pour Multidrug And Toxin Extrusion. Cette famille a été mise en évidence relativement récemment puisque MATE1 a été identifiée chez l'homme en 2005. Peu de temps après, MATE2 et ses isoformes MATE2K et MATE2B ont été décrites. MATE1 est fortement

exprimée au niveau du foie, au niveau du pôle canaliculaire des hépatocytes, et au niveau du rein. MATE1 est aussi détectable dans les glandes surrénales, le muscle squelettique, les testicules et le placenta. MATE2 et ses isoformes sont, quant à elles, exprimées majoritairement au niveau des reins.

Bien que les MATE appartiennent à la famille SLC, ils vont, contrairement à la plupart des transporteurs de cette famille, éliminer des substrats en dehors de la cellule. Ils fonctionnent sur un mode antiport qui est fonction du gradient de protons. Au début, les substrats identifiés comme étant transportés par les MATE étaient soit des cations organiques comme le TEA ou le MPP, soit des bases faibles chargées positivement comme la metformin ou la cimetidine. Ces substrats étaient alors reconnus comme étant transportés par les OCT. Il a donc été supposé que les MATE agissaient en coopération avec les OCT afin d'assurer un système complet d'entrée et d'élimination des cations organiques.

2.7. LES «peptide transporteurs» (PEPT)

Au niveau rénal deux isoformes ont été identifiées PEPT1 et PEPT2. PEPT1 permet le transport actif des xénobiotiques tel que les antibiotiques, ex : les céphalosporines et les bétalactamines ou encore le captopril ou le valacyclovir.

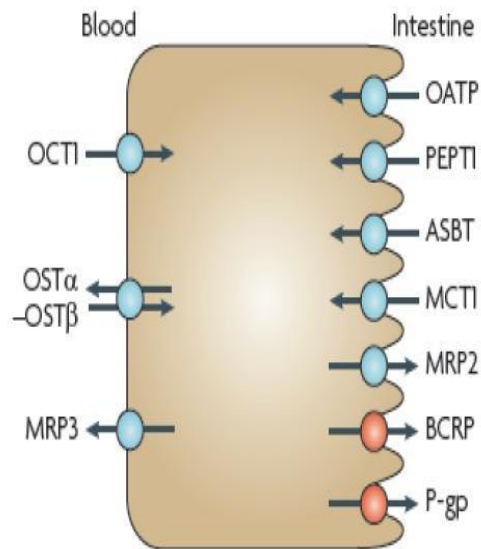
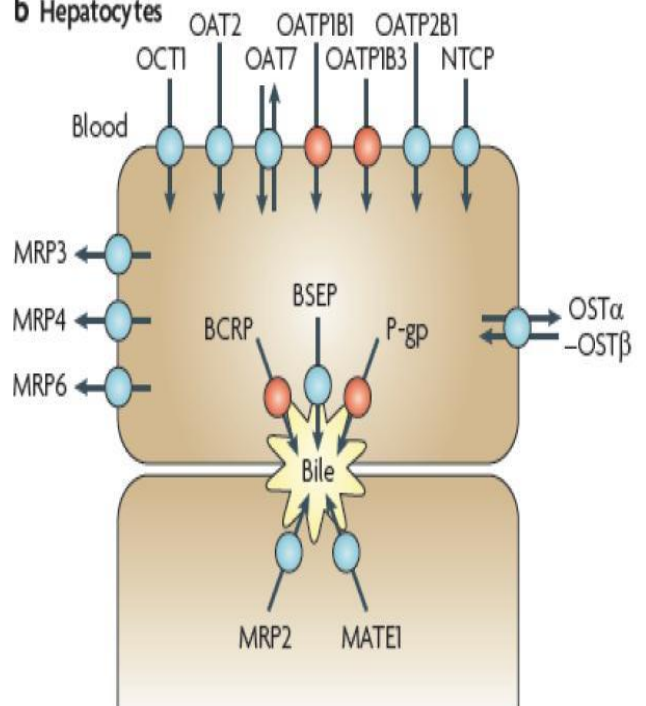
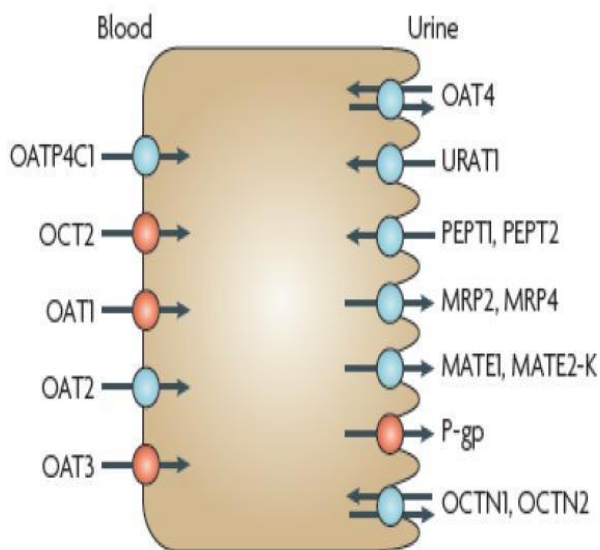
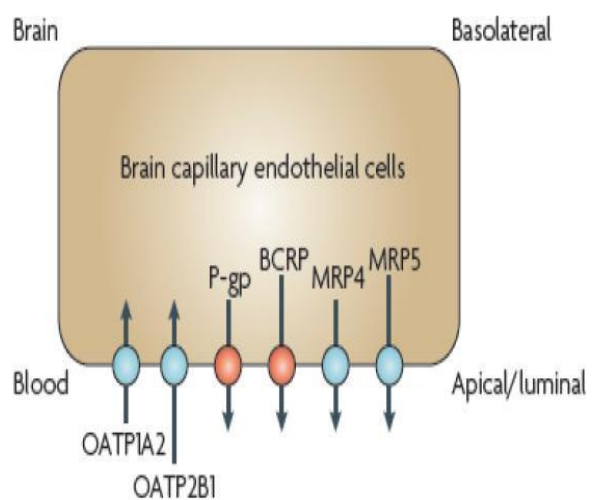
a Intestinal epithelia**b Hepatocytes****c Kidney proximal tubules****d Blood-brain barrier**

Figure 17. Représentation des transporteurs au niveau de l'épithélium intestinal(a), hépatocyte(b), le tubule proximal rénal(c) et la barrière hématoencéphalique (d).

Conclusion

Caractéristiques communes aux transporteurs membranaires

Ces différents transporteurs présentent des propriétés communes :

- ✓ Ils sont dépendants d'une source d'énergie, soit directement en consommant des molécules d'ATP, soit indirectement. Ce type de passage membranaire ne dépend pas de l'existence d'un gradient de concentration du xénobiotique.
- ✓ Les transporteurs peuvent être saturés.
- ✓ Les transporteurs peuvent être inhibés.
- ✓ Certains transporteurs sont inductibles : en réponse à la présence d'une grande quantité de certains composés, la cellule synthétise plus de transporteurs.
- ✓ Ils présentent une certaine spécificité. Tous les xénobiotiques ne peuvent être reconnus par les transporteurs et donc ne peuvent profiter de ce système de passage membranaire.

Chapitre III. Facteurs influençant le métabolisme et transport des xénobiotiques et leurs implications

Introduction

Le devenir d'une substance étrangère dans l'organisme peut présenter de grandes variations interindividuelles et même au cours du temps chez le même individu (variabilité intra-individuelle). Divers facteurs (endogènes et exogènes) peuvent en effet influencer le métabolisme (absorption, distribution, biotransformation, excrétion) des substances étrangères. On peut les grouper en trois classes :

- Facteurs génétiques ;
- Facteurs d'environnement ;
- Facteurs physiopathologiques.

1. Notion de polymorphisme génétique

Comme pour toutes les protéines de l'organisme, la qualité et la quantité des enzymes qui catalysent les réactions de biotransformation et de transport des molécules étrangères dépendent majoritairement de l'information portée par le gène qui les code. Or, ces gènes peuvent présenter des anomalies de séquences (ou mutations), telles que des mutations ponctuelles ou SNP (single nucleotide polymorphism), des insertions, des délétions partielles ou totales, des remaniements ou encore des duplications ou amplifications de gènes. Ces différentes versions d'un même gène définissent des allèles et chaque individu possède deux versions alléliques d'un même gène, identiques ou différentes (l'une héritée de la mère, l'autre héritée du père), déterminant un génotype particulier. L'existence dans la population générale de ces différentes versions alléliques d'un même gène et, par conséquent, de différents génotypes, définit un polymorphisme génétique.

2. Polymorphisme génétique des EMTX et leurs implications

Il est maintenant bien établi qu'un facteur déterminant dans la susceptibilité interindividuelle aux xénobiotiques repose sur la variabilité génétique rencontrée au sein du groupe d'enzymes qui participent à la biotransformation de ces composés. De nombreux polymorphismes génétiques d'enzymes de métabolisme et transport des xénobiotiques (EMTX) ont été découverts, touchant aussi bien des enzymes de phase I (CYP) que des enzymes de phase II (UGT, GST, EH, sulfof- et méthyltransférases...) et de phase III (la

glycoprotéine-P, produit du gène ABCB1). Ces polymorphismes possèdent plusieurs caractéristiques : ils touchent de nombreux enzymes, la fréquence des allèles déficitaires est souvent élevée (quelquefois > 50 %), enfin les délétions et les duplications de gènes sont fréquentes. Il a été établi que dans certains cas, ces variations sont à la base d'altérations (positives ou négatives) de l'activité de ces enzymes. Il semble actuellement établi que chaque individu possède une gamme distincte d'activités enzymatiques et que l'interaction complexe de ces différentes variantes est finalement à l'origine de variations du métabolisme des substances chimiques dans l'organisme et donc également de leur toxicité potentielle.

Les polymorphismes génétiques affectant l'expression ou **l'activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques** s'expriment dans la population générale sous forme de différents phénotypes métaboliques, définissant au moins deux groupes d'individus : les métaboliseurs lents (ML), qui présentent un déficit d'activité enzymatique, et les métaboliseurs rapides (MR), à activité normale. Pour certaines enzymes, sont décrits également des métaboliseurs ultra-rapides (MUR), chez qui l'activité enzymatique est augmentée et des métaboliseurs intermédiaires (MI), à activité réduite (Figure 18). De ce fait, la capacité métabolique de l'individu dépend du nombre d'allèles fonctionnels du gène codant pour l'enzyme. Si les deux allèles sont inactivés (homozygote muté), on parle de métaboliseur lent (activité enzymatique absente ou diminuée). Si un seul des deux allèles est muté (hétérozygote), on parle parfois de métaboliseur intermédiaire. Si les deux allèles sont sauvages, on parle de métaboliseur rapide ou extensif. Dans certains cas assez rares, il peut exister une amplification du gène, conduisant à une augmentation de l'activité et à un phénotype de métaboliseur ultra-rapide.

Les polymorphismes génétiques sont accompagnés d'effets fonctionnels et concernent de nombreuses enzymes de phase I comme de phase II. Les enzymes polymorphes majeurs sont les enzymes du cytochrome P450 pour la phase I, et les N-acétyltransférases (NAT) et les Glucuronosyltransférases (GST) pour la phase II. Le Tableau 4 présente quelques exemples d'enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments pour lesquels des anomalies de réponse d'origine génétique ont été démontrées.

Les variants enzymatiques connus sont présents à des fréquences variables au sein des différentes populations humaines. Les différences phénotypiques peuvent cependant être discrètes et dépourvues d'impact clinique important.

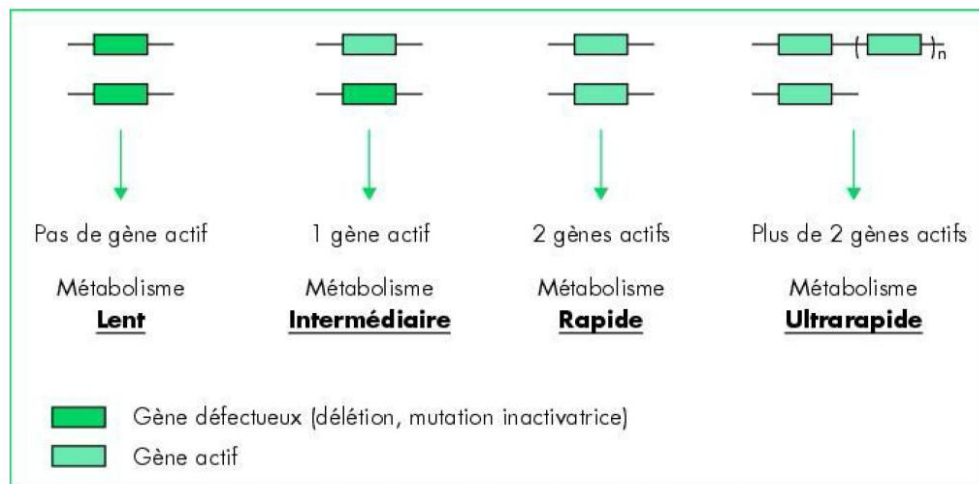


Figure 18. Bases moléculaires des polymorphismes d'activité enzymatique.

Tableau 4. Exemples de polymorphismes génétiques affectant la réponse aux médicaments

Gene enzymes du métabolisme	Médicaments-Substrats	Conséquences Cliniques Liées Au Polymorphisme
CYP2C9	Anticoagulants oraux (warfarine acénocoimiarol)	Hémorragies
	Sulfamides hypoglycémiants (glibenclamide, glipizide)	Hypoglycémie
CYP2C19	Oméprazole	Efficacité accrue chez ML. utilisation de doses adaptées
CYP2D6	Antidépresseurs tricycliques	Inefficacité chez MUR Toxicité chez ML
	Codéine	Absence d'analgésie chez ML (prodrogue)
NAT2	Isoniazide	Xeurotoxicité chez ML. Hépatotoxicité chez MR
UGT1A1	Irinotécan	Diarrhée, neutropénie

Les polymorphismes génétiques affectant l'expression **des transporteurs des xénobiotiques** s'exprime par une variabilité au niveau de pharmacocinétique de ces substances (l'absorption, la distribution et l'excrétion de ces composés), conduisant ainsi à une variabilité de la réponse pharmacologiques, si ce composés est un médicament, ou influençant la voie de détoxification de ces composées. De nombreux polymorphismes génétiques de transporteurs ont été identifiés. L'exemple le plus connues est le transporteur ABCB1, encore appelé P-glycoprotéine (p-gp) ou ABCB1. Le gène codant pour ce transporteur est un gène très polymorphe situé sur le bras long du chromosome 7. Certains polymorphismes d'*ABCB1* ont été associés avec une altération de l'expression de l'ARNm d'*ABCB1*, de l'expression de la protéine ou de l'activité du transporteur in vitro ou dans différents tissus notamment l'intestin. Chez les individus présentant une augmentation de l'expression ou de la fonction du transporteur ABCB1, on s'attendra ainsi à une diminution de la biodisponibilité par voie orale, une diminution des concentrations plasmatiques maximum et/ou une augmentation de la clairance. En plus d'un effet sur la pharmacocinétique des substrats transportés, les polymorphismes peuvent influencer la réponse biologique à de nombreux traitements substrats d'*ABCB1* au niveau de leur pharmacodynamie (efficacité du traitement, effets indésirables).

3. Variations environnementales

L'expression des EMX peut également varier en fonction de l'environnement. En effet, ces enzymes sont fréquemment inductibles et répressibles. L'induction est une réponse adaptative rapide permettant d'augmenter transitoirement la capacité cellulaire et tissulaire d'élimination du xénobiotique. Par contre, l'inhibition peut conduire à en augmenter la demi-vie biologique.

3.1. Induction / inhibition des EMX

Stimulation enzymatique

Il est impossible de donner une liste exhaustive des substances qui peuvent stimuler l'activité des enzymes microsomiques. Elles présentent des structures chimiques très variées et beaucoup sont utilisées couramment comme médicaments. Exp : des hypnotiques (phénobarbital, barbital.....), la phénylbutazone, l'aminopyrine, la zoxazolamine, la fumée de tabac.....

Le tableau 5 indique quelques inducteurs et leurs cibles parmi les EMX. Le taux de cette induction peut être élevé (jusqu'à 50 fois), elle peut affecter plusieurs enzymes (CYP, GST, UGT, etc.), et être elle-même sous la dépendance de facteurs génétiques.

Comme la concentration d'une protéine est déterminée par l'équilibre entre sa synthèse et sa dégradation, **l'induction** d'un CYP peut résulter soit :

- de la stimulation de sa synthèse, le plus souvent par augmentation de sa transcription ; s'accompagne généralement d'une prolifération des membranes du réticulum endoplasmique lisse des cellules hépatiques. Il s'agit donc d'une induction de la synthèse de nouvelles molécules d'enzymes microsomiques ;
- soit de la diminution de sa dégradation.

L'activation transcriptionnelle des EMX, comme les CYPs (comme aussi pour les enzymes de phase II et III de métabolisation) est régulée par des membres de la famille des récepteurs nucléaires (Figure 19), qui sont activés par une variété de composés endogènes et exogènes.

L'induction peut avoir diverses conséquences ; il en résulte une accélération du métabolisme des xénobiotiques qui pourra se traduire par :

- Une diminution de l'effet si les métabolites sont inactifs, c'est-à-dire une diminution de l'activité pharmacologique pour une même dose administrée.
- Une augmentation de l'effet si les métabolites sont actifs.
- Une augmentation de la toxicité si les métabolites sont réactifs.

Tableau 5. Quelques exemples d'inducteurs chez l'homme.

Inducteurs	Enzymes induits
Barbituriques	CYP (2B, 2C, 3A), UGT
Fumée et cigarette, dioxine	CYP (1A, 1B), UGT, GST
	AIDH...
Rifanopidine, carbamazépine	CYP 3 A
Stéroïdes	
Éthanol	CYP2E1

CYP: cytochromes P450.

UGT: UDP glycosyl transférase.

GST: glutathione-S-transférase.

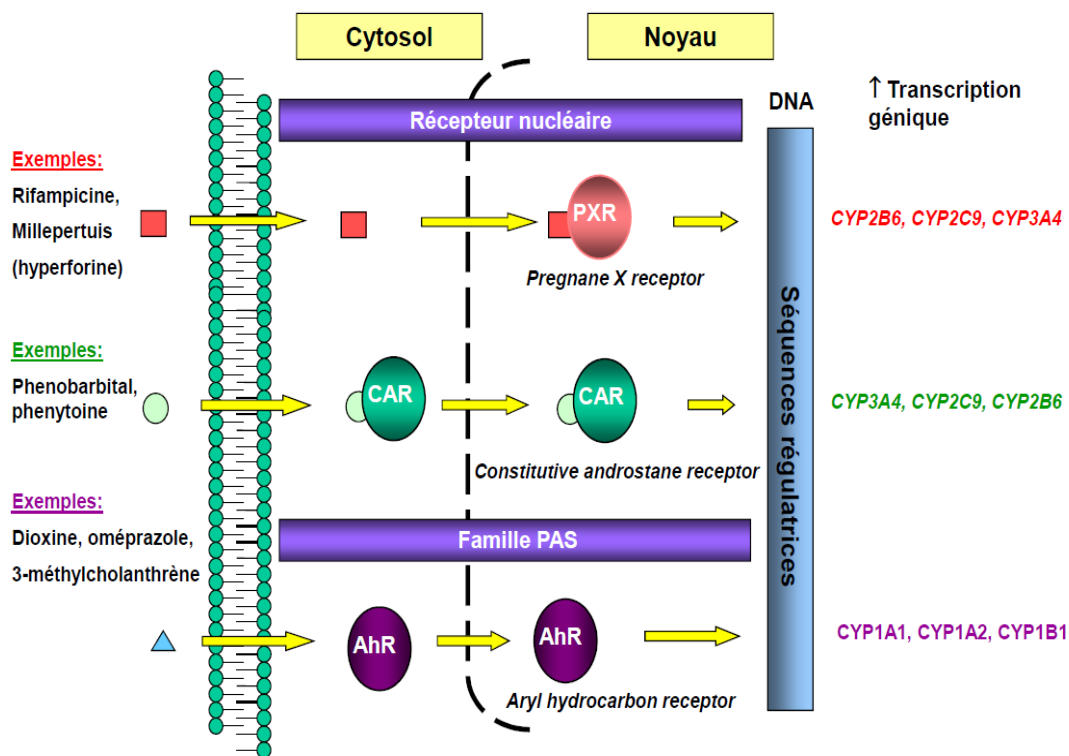


Figure 19 : Mécanismes moléculaires d'induction des CYP450 (ex: hépatocytes)

Inhibition enzymatique

Ces enzymes sont également sensibles à l'inhibition par des xénobiotiques, qui peuvent bloquer leur activité enzymatique de façon réversible ou irréversible. De nombreux médicaments, mais également des substances de l'environnement sont capables d'interférer avec l'enzyme et de moduler ainsi le métabolisme d'autres xénobiotiques. Ainsi chez un même individu, la capacité métabolique peut être largement modulée aussi bien quantitativement que qualitativement, par des composés endo- ou xénobiotiques.

L'inhibition réversible se produit quand l'inhibiteur atteint des concentrations suffisantes pour se fixer d'une manière non covalente sur le site actif et diminuer la vitesse de l'enzyme. Les inhibiteurs compétitifs des EMX sont les plus communs et leur effet est transitoire. En revanche, l'inhibition irréversible se produit lorsque l'agent inhibiteur est converti en un métabolite réactif qui se lie de manière covalente à l'enzyme (à l'hème ou à l'apoprotéine dans le cas de CYP). La suppression de cette espèce n'est pas possible et la perte de l'activité de l'enzyme est permanente (jusqu'à la resynthèse de la protéine).

3.2. Induction / inhibition des transporteurs des xénobiotiques

L'inhibition et l'induction des transporteurs membranaires (Tableau 6) peuvent avoir des conséquences importantes sur l'absorption des substances actives et être à l'origine soit de traitements inefficaces par défaut d'absorption ou toxiques par augmentation de l'absorption.

Exemple : Des jus de fruit modifient certains transporteurs membranaires appartenant à la famille des transporteurs ABC (transporteurs de relargage) et SLC (transporteurs d'absorption).

La substance active talinolol utilisée dans le traitement de problèmes cardiaques peut être absorbée par diffusion passive, mais une fraction des molécules absorbées est relarguée par des transporteurs ABC des entérocytes. Il a été démontré que l'absorption de la talinolol était plus importante si le malade prenait un jus de pamplemousse en même temps que son traitement. Certains composés du jus de pamplemousse inhibent les transporteurs ABC et la fraction de la substance active talinolol normalement relarguée dans la lumière du tube digestif ne l'est plus. La totalité des molécules absorbées par diffusion passive se retrouve donc dans l'organisme et peut être à l'origine d'un surdosage.

Les jus d'oranges et de pommes contiennent des composés qui peuvent inhiber les transporteurs OATP qui sont des transporteurs SLC. Ainsi, si le malade prend un jus de fruits en même temps que son traitement, l'absorption d'une substance active normalement transportée par ces transporteurs sera inhibée. La quantité de substance active absorbée peut alors être insuffisante et le traitement se révélera inefficace.

L'induction des transporteurs peut également modifier l'efficacité d'un traitement et expliquer l'apparition de résistance. C'est d'ailleurs la résistance de certaines cellules aux anticancéreux qui a permis de découvrir les transporteurs ABC. La présence des transporteurs ABC, en plus grande quantité explique également l'émergence d'insectes devenus résistants à certains insecticides. Par contre, l'absence de ces transporteurs peut expliquer une plus grande sensibilité toxicologique de certains individus.

Tableau 6. Inhibiteurs et inducteurs de la P-gp, de BCRP, d'OATP1A2

Transporteurs	Inhibiteurs	Inducteurs
P-gp, MDR1 (ABCB1)	Antiarythmiques : vérapamil, quinidine, amiodarone Macrolides : érythromycine, clarithromycine Inhibiteurs de protéases : indinavir, nelfinavir, ritonavir Antifongiques : itraconazole, kétoconazole Antidépresseurs : fluoxétine, paroxétine, sertraline Autres : tacrolimus, dipyridamole, hydrocortisone, GF120918	Rifampicine, millepertuis, réserpine, phénobarbital
BCRP (ABCG2)	Immunosuppresseurs : ciclosporine, tacrolimus, sirolimus Inhibiteurs de protéases : amprénavir, atazanavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir Autres : éfavirenz, abacavir, tamoxifène, fumitrémorgine (FTC), GF120918	
OATP1A2, OATP-A (SLC01A2)	Naringine, ritonavir, lopinavir, saquinavir, rosuvastatine, rifampicine	

3.3. Interaction métabolique

Les mécanismes d'inductions/inhibitions décrits ci-dessus peuvent être à l'origine d'interactions métaboliques en cas de co-exposition à plusieurs xénobiotiques. En effet, si un xénobiotique induit une enzyme impliquée dans le métabolisme d'un autre, le métabolisme de celui-ci sera modifié. S'il se transforme en métabolite réactif, la toxicité sera donc augmentée. C'est le cas de la co-exposition de l'alcool et du paracétamol. En effet, l'alcool en induisant le CYP2E1 augmentera la formation de NAPQI, métabolite toxique. A l'inverse, le jus de pamplemousse inhibant le CYP3A4, influence la toxicité d'un xénobiotique métabolisé par celui-ci. Ces mécanismes sont impliqués dans les interactions médicamenteuses et sont à prendre en compte lors d'une polymédication.

Si des xénobiotiques empruntent la même voie métabolique, il y aura compétition pour le même site de liaison enzymatique. Il en résulte une diminution du métabolisme de la substance qui a la plus faible affinité pour ce site. Si la voie métabolique affectée représente la principale voie d'élimination, les concentrations plasmatiques de la molécule mère sont augmentées. Ceci peut se traduire par des effets toxiques prolongés. Dans plusieurs cas, d'autres voies métaboliques alternatives peuvent se mettre en place, ce qui n'est pas toujours bénéfique.

3.4. Divers stress

L'exposition au froid peut augmenter l'activité de certaines enzymes microsomiques. La lumière peut avoir une influence sur le métabolisme des substances étrangères. Ainsi chez l'animal maintenu à l'obscurité, le métabolisme de l'hexobarbital est plus rapide que chez l'animal exposé à la lumière.

On connaît l'effet bénéfique de la photothérapie sur l'hyperbilirubinémie du prématuré. Pendant la photothérapie, la bilirubine présente dans les couches superficielles de la peau est photooxydée en dérivés hydrophiles qui peuvent être éliminés par voie urinaire ou biliaire.

4. Facteurs physiopathologiques

4.1. Age

La plupart des activités enzymatiques microsomiques à l'égard des corps étrangers (en particulier la glucuronoconjugaison) sont plus faibles chez les prématurés que chez les nouveau-nés à terme et aussi plus faibles chez ces derniers que chez l'adulte. Ces enzymes se développent progressivement au cours de la période néonatale et atteignent leur activité maximale environ après deux mois. Les nouveau-nés présentent d'ailleurs une plus grande sensibilité à l'action de nombreux corps étrangers, sauf vis-à-vis de ceux qui doivent être activés par l'organisme.

Comme chez l'adulte, il est néanmoins possible d'induire l'activité des enzymes microsomiques fœtales par l'administration d'inducteurs à la mère (par exemple, induction de la glucuronyltransférase par administration de phénobarbital à la mère). Il est intéressant de signaler que chez le fœtus, contrairement à ce qui se passe chez la mère, la transformation d'un corps apolaire en un composé polaire peut réduire son élimination (barrière placentaire) et entraîner son accumulation dans l'organisme.

Après la période néonatale, l'activité des enzymes microsomiques peut cependant être plus élevée chez l'enfant que chez l'adulte. Il semble par contre que la réaction de glucuronoconjugaison n'atteigne son activité maximale qu'à l'âge adulte. Une réduction de la métabolisation de certains médicaments a été observée chez les vieillards.

4.2. Sexe

L'absorption orale du cadmium (et peut-être aussi du plomb) semble plus importante chez la femme que chez l'homme car inversement proportionnelle à la charge corporelle en fer. Le rat mâle adulte biotransforme beaucoup de corps chimiques plus rapidement que la femelle.

Cette différence semble moins évidente dans l'espèce humaine. La demi-vie biologique du benzène est plus longue chez la femme que chez l'homme. Quand une substance est biotransformée par diverses voies métaboliques, leur importance relative peut être différente selon le sexe. Ainsi, le trichloréthylène est préférentiellement oxydé en acide trichloroacétique chez la femme, et en trichloroéthanol chez l'homme. Suite à une exposition aux isomères du dinitrotoluène, l'homme excrète proportionnellement plus d'acide dinitrobenzoïque que la femme et moins de dérivé glucuronoconjugué de l'alcool dinitrobenzylique.

4.3. Hormones

Les stéroïdes, en général, stimulent l'activité des enzymes microsomiques. D'autres hormones (thyroxine, insuline) semblent aussi influencer l'activité de ces enzymes, mais parfois de manière différente suivant le système enzymatique considéré. L'influence hormonale pourrait expliquer l'existence d'un cycle circadien dans le métabolisme de certaines substances.

4.4. Grossesse

Il se produit, au cours de la grossesse ainsi qu'au cours de la prise de contraceptifs oraux, une réduction de l'activité des enzymes métabolisant les substances étrangères. Ainsi les réactions d'oxydation sont nettement réduites en fin de grossesse et ce phénomène va de pair avec une réduction de l'activité du cytochrome P450. A la fin de la grossesse, la glucuronoconjugaison des corps étrangers est aussi très réduite probablement par suite de la présence d'une grande quantité de progestérone et de pregnanediol qui sont des inhibiteurs de la glucuronyltransférase.

4.5. Etat nutritionnel

L'influence de l'état nutritionnel sur le devenir des substances étrangères a surtout été étudiée chez l'animal mais on peut concevoir que dans certaines circonstances (obésité, malnutrition) elle puisse s'observer chez l'homme.

Par exemple : la quantité de produits lipophiles peu biotransformés (par exemple : chlorure de méthylène) retenue dans l'organisme sera proportionnelle à la masse de tissu adipeux. Un état de déshydratation modifie la distribution et ainsi la toxicité de substances hydrosolubles (sels solubles de plomb et d'antimoine; métacholine) mais n'augmente pas la susceptibilité aux substances liposolubles (benzène, trichloréthylène).

4.6. Maladies

Un état d'achlorhydrie est associé à une diminution de l'absorption gastrique des acides faibles. Une insuffisance hépatique sera souvent accompagnée d'une réduction de la capacité de métaboliser (biotransformations, excrétion) les substances étrangères.

Un état d'hyperthyroïdie stimule les enzymes microsomiques. Un état d'hypothyroïdie a en général un effet inverse.

La concentration hépatique de différentes formes du cytochrome P450 est cependant augmentée chez le rat rendu diabétique par la streptozotocine.

IV. Exploration du métabolisme et de transport des xénobiotiques : modèles (*in vitro* et *in vivo*) et approche d'étude de métabolisme

Toutes les connaissances acquises sur le métabolisme des xénobiotiques résultent de nombreux travaux expérimentaux. Ces travaux ont nécessité l'emploi de méthodes qui ont évolué au cours du temps, principalement grâce aux avancées technologiques.

L'exploration du métabolisme d'un xénobiotique peut être réalisée sur différents modèles : sur l'homme, lors des étapes de la recherche clinique d'un médicament, mais avant cela, sur des animaux (majoritairement les rongeurs), lors de la phase de recherche préclinique du médicament ou pour la recherche de toxicité de substances chimiques. D'autres modèles sont également utilisés : l'organe isolé, ou les cultures cellulaires (animales ou humaines). Tous ces modèles ont été classés en 3 groupes : les modèles *in vivo*, les modèles *in vitro* et les modèles *in silico*.

1. Les modèles *in vivo*

Ces modèles permettent la détermination de la toxicité aiguë, chronique, de la clairance, ainsi que du potentiel mutagène et carcinogène. Les animaux employés peuvent être sains, présenter une pathologie préexistante spontanée ou provoquée, ou être des animaux modifiés génétiquement pour permettre une étude ciblée. Ces études sont longues et très coûteuses en particulier lors des études chroniques. Par ailleurs, l'utilisation massive de ces animaux pose un problème financier, de variabilité inter-espèces mais surtout un problème éthique qui doit être résolu. En effet, en 2006, près d'un million d'animaux ont été utilisés pour des tests toxicologiques au niveau mondial (Dernière enquête publiée par la Commission Européenne relative à l'utilisation d'animaux à des scientifiques, COM (2007) 675, paru au Journal Officiel C9 du 15/01/2008). Ainsi depuis ces vingt dernières années des méthodes alternatives à l'expérimentation animale (également sollicités par la directive REACH) ont été recherchées. Ces méthodes doivent être capables de répondre à la règle des 3R de Russel and Burch (1959) : « Refine – Reduce – Replace » (raffiner, réduire, remplacer). Le concept de raffiner, d'optimiser l'expérimentation concerne la méthodologie appliquée sur les animaux lors des tests toxicologiques. L'objectif est tout d'abord optimiser le protocole afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, le stress subis par les animaux que ce soit dans l'intérêt de l'animal comme dans celui de l'obtention de résultats pertinents. Le deuxième R : réduire, implique une réduction du nombre d'animaux utilisés lors des expérimentations mais également une

réduction du nombre des expériences qui sont parfois superflues. Lors de cette étape, l'utilisation de statistiques est fortement conseillée, afin de concevoir un protocole expérimental destiné à estimer le nombre d'animaux réellement nécessaire. Enfin la troisième règle : remplacer, préconise le remplacement des animaux chaque fois que cela est possible par des modèles *in vitro* ou *in silico*. Cependant dans l'état actuel des connaissances, ces méthodes sont la plupart du temps des méthodes complémentaires d'un projet global utilisant des animaux. C'est pourquoi, les autorités encouragent le développement des méthodes alternatives (*in vitro* et *in silico*) qui constituent de réelles voies de substitution à l'utilisation des animaux comme modèles d'études toxicologiques.

Exemples

- Du fait de l'important recouvrement de substrats entre différents transporteurs d'une part, et entre transporteurs et enzymes du métabolisme d'autre part, la contribution précise d'un transporteur donné, dans la pharmacocinétique ou dans les interactions médicamenteuses, est le plus souvent étudiée à travers des modèles expérimentaux *in vivo*. Diverses souches de souris ou de rats *knock-out* (KO) pour un transporteur donné (souris *mdr1*^{-/-}, rats *mrp2*^{-/-}, etc.) peuvent être utilisées pour conduire des études *in vivo*. Par exemple, les rats TR-/GY et Eisai hyperbilirubinémiques (EHBR) sont des souches de rats spontanément mutants qui présentent un défaut d'excrétion de la bilirubine conjuguée et d'autres anions organiques et qui n'expriment pas MRP2.
- Afin d'obtenir une vue d'ensemble des fonctions des différents transporteurs ABC, des souris KO pour un ou plusieurs transporteurs ont été développées suivant des techniques de mutagenèse sur des cellules souches. Ces animaux sont couramment utilisés pour analyser le rôle d'un transporteur donné dans la pharmacocinétique d'un médicament ou dans les IAM.

2. Les modèles *in vitro*

Ils sont de plus en plus utilisées non seulement lors des étapes de screening, mais aussi au cours du développement du médicament. Elles sont donc menées afin d'identifier l'enzyme spécifique responsable du métabolisme d'une molécule donnée.

Les modèles biologiques utilisés dans les études de métabolisme connaissent un développement permanent et une évaluation croissante. Ils sont pour la plupart disponibles

pour plusieurs espèces animales, mais les modèles humains sont toutefois préférés pour faciliter l'extrapolation des résultats à la clinique.

Les modèles *in vitro*, comprennent outre l'enzyme recombinante toutes les techniques de culture de cellules, de tissus ou d'organes en dehors de tout organisme, sur un milieu nutritif et dans des conditions contrôlées. Les cellules ou tissus peuvent être cultivées dans des supports de culture classiques, on parle alors de modèle 2D statique, ou en conditions 3D, complétées parfois par des bioréacteurs qui permettent de recréer, par la perfusion, un environnement proche des conditions *in vivo*. On parle alors plutôt d'ingénierie tissulaire.

2.1. Fractions subcellulaires

Les fractions sub-cellulaires sont obtenues par broyage tissulaire, lyse cellulaire et centrifugation différentielle (Figure 20). Les fractions sub-cellulaires permettent 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.

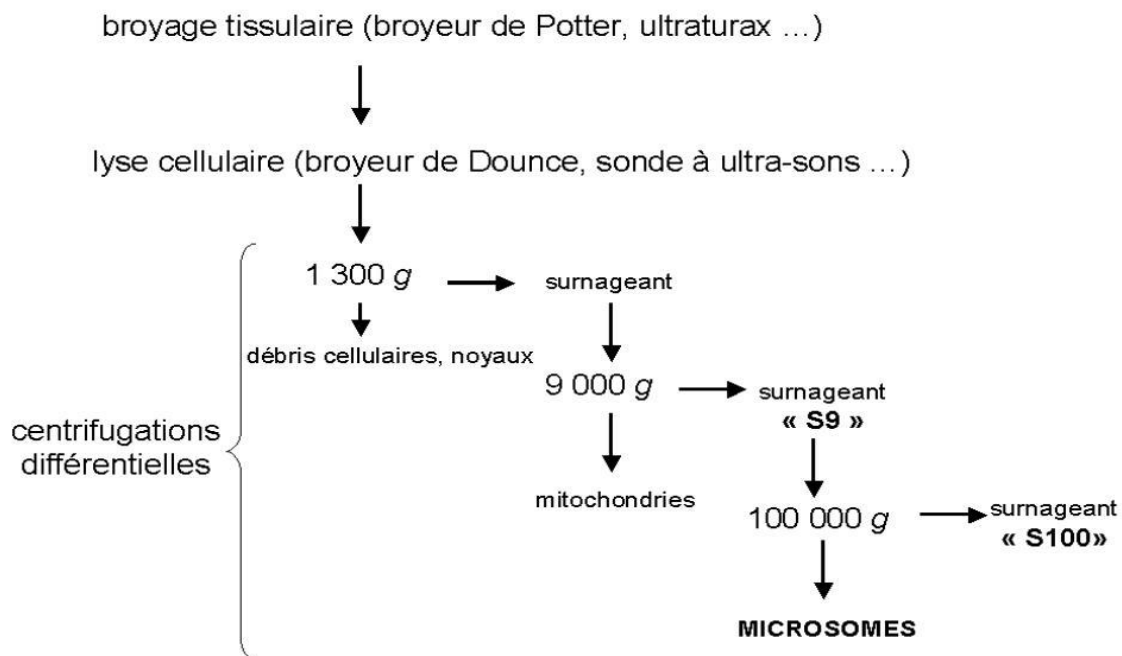


Figure 20. Illustration de l'isolement des fractions subcellulaires

2.1.1. Microsomes

Les microsomes sont des vésicules de réticulum endoplasmique lisse. Ils contiennent les enzymes membranaires (microsomaux) : la superfamille du cytochrome P450, les monooxygénases à flavine, les époxydes hydrolases et UDP-glucuronyltransférases (UGT). L'utilisation de co-facteurs particuliers ou de conditions expérimentales spécifiques permet la sélection de l'enzyme à étudier, avec la possibilité de combiner des co-substrats afin d'estimer la clairance pour différents composés métabolisés à la fois par les CYP et UGT, malgré la destruction de l'organisation naturelle des éléments intracellulaires.

Ainsi les mono-oxygénases nécessitent un co-substrat de type NADPH. Les UGT requièrent de l'acide UDP-glucuronique ainsi qu'une activation pour rendre accessible le site actif de l'enzyme, activation obtenue par l'emploi de détergents ou d'alaméthicin. Afin de refléter une activité standard de l'enzyme et d'éviter de tirer des conclusions à partir d'échantillons pouvant posséder des voies métaboliques aberrantes, il faut utiliser, soit individuellement soit en pool, des microsomes préparés à partir de plusieurs donneurs différents.

Les fractions microsomales hépatiques présentent différents avantages :

- Elles sont très riches en enzymes de phase I (toutes les isoformes de CYP, FMO, époxydes hydrolases membranaires, ...) mais contiennent également certaines enzymes membranaires de phase II comme les UDP-glucuronosyl-transférases.
- La préparation est aisée et le coût raisonnable
- Elles présentent une bonne conservation à - 80°C pendant plusieurs années sans perte de leurs propriétés catalytiques
- Les microsomes offrent la possibilité de fabriquer des pools de différents donneurs de façon à s'affranchir de la variabilité inter-individuelle ou, au contraire, de constituer des banques de donneurs aux phénotypes divers et variés (métaboliseurs lents du CYP2D6, CYP3A4 induit, métaboliseurs lents CYP2C9, ...).
- Leur utilisation est facile et rapide et le modèle constitue un bon outil pour déterminer de façon primaire les différentes voies métaboliques pour un composé. Elles permettent la réalisation de comparaisons inter-espèce,

d'identification de métabolites et d'identification d'enzymes impliqués dans une réaction métabolique.

Le modèle présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients :

- Les réactions enzymatiques de phase I et de phase II ne peuvent pas être étudiées en séquence car elles nécessitent des conditions expérimentales différentes (cofacteur, tampon).
- De plus, les enzymes cytosoliques sont absentes et le profil métabolique peut, de ce fait, être incomplet.
- Enfin, le modèle reste très artificiel, il ne permet pas de tenir compte de la perméabilité et nécessite l'ajout de cofacteur pour initier les réactions enzymatiques (NADPH pour les CYP et FMO ; UDPGA pour les UGT).

2.1.2. Fraction S9

La fraction intracellulaire S9 est le surnageant de l'homogénat résultant de la précipitation des noyaux et des mitochondries par centrifugation à la vitesse de 9000 g (d'où l'appellation « S9 »). Elle contient des enzymes microsomaux et des enzymes cytosoliques (solubles). L'addition de cofacteurs s'avère nécessaire pour l'activation des enzymes : NADPH pour les CYP, UDP-GlcA pour les UGT, de l'adénosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate pour les sulfo-transférases, de l'acétyl-coenzyme A et son système régénérateur, et du dithiothréitol pour les N-acétyl-transférases. Comme les microsomes, le S9 peut se cryoconserver pendant plusieurs années. Son contenu enzymatique permet d'évaluer une activité métabolique globale et d'étudier des réactions séquentielles. L'activité enzymatique de ce type de préparation est toutefois inférieure à celle pouvant être obtenue avec des microsomes (pour les enzymes microsomaux) ou du cytosol (pour les enzymes solubles)

2.1.3. Fraction cytosolique

La fraction cytosolique, dite aussi « S100 », est le surnageant obtenu après la sédimentation des microsomes par ultra-centrifugation à 100 000 g. Elle contient uniquement les trois enzymes solubles de phase II : les N-acétyltransférases, glutathion-S-transférases et sulfo-transférases. La fraction cytosolique est disponible commercialement pour la plupart des espèces animales. L'avantage principal de cette préparation est de disposer des trois enzymes solubles de phase II à des concentrations supérieures à celles de

la fraction S9 et de pouvoir étudier spécifiquement chacune de ces enzymes en fonction du co-substrat utilisé.

2.2. Culture cellulaire

2.2.1. Hépatocytes

Les tissus hépatiques utilisés pour l'isolement des hépatocytes humains sont la plupart du temps obtenus après résection d'une tumeur hépatique primaire ou secondaire ou lorsqu'un foie de donneur n'est pas transplantable. Les hépatocytes sont isolés par perfusion du tissu hépatique avec une solution de collagénase suivie de différents lavages. Les cellules ainsi obtenues peuvent être utilisées soit immédiatement en suspension, soit dans les heures qui suivent, après immobilisation sur des supports prétraités au collagène I (monocouche). Un approvisionnement restreint en tissu humain rend les hépatocytes humains relativement précieux. Grâce aux progrès de la cryopréservation, il est aujourd'hui possible de se fournir en hépatocytes humains ou animaux cryopréservés permettant l'utilisation de cultures primaires en routine.

L'avantage des cellules cryopréservées réside sans conteste dans leur facilité d'utilisation et la liberté qu'elles offrent dans la planification des études sans être tributaire de l'approvisionnement en tissu frais. En outre, la disponibilité constante des cellules permet de répéter les expériences sur un même donneur ou sur plusieurs donneurs en fonction du phénotype de ceux-ci.

Les hépatocytes humains présentent de nombreux avantages par rapport aux microsomes. Ils contiennent un système enzymatique complet (phase I, II et III), et des concentrations physiologiques en cofacteurs. Il s'agit du modèle « Gold standard » pour les études de métabolisme et la pharmacocynétiques des xénobiotiques puisqu'il permet l'étude de la distribution intra- et extracellulaire d'un composé. Les cellules primaires, lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions adéquates, expriment toutes les principales enzymes du métabolisme et les protéines transporteuses responsables de l'excrétion des xénobiotiques transformés permettant donc une étude globale du métabolisme avec prise en compte du passage intra-cellulaire.

Les hépatocytes en suspension ou en monocouche sont très utilisés pour la caractérisation et notamment pour l'identification des voies métaboliques, la détermination de la clairance intrinsèque *in vitro* et l'étude des interactions médicamenteuses.

La disponibilité limitée des hépatocytes humains primaires est l'inconvénient majeur de ce modèle. Ainsi, en raison du prix élevé des ampoules d'hépatocytes cryopréservés ($\approx 500\text{€}$ /ampoule contenant entre 5 et 10 millions d'hépatocytes), leur utilisation reste globalement confinée aux industries pharmaceutiques. Après isolement, les hépatocytes peuvent être maintenus en culture mono-couche pendant quatre semaines. Cependant, la viabilité des cellules limite leur utilisation à quelques jours après l'isolement. Toutefois, l'amélioration et le progrès des techniques de conservation par cryogénisation les rendent aujourd'hui commercialement accessibles.

2.2.2. Lignées cellulaires hépatiques

Une lignée cellulaire est une lignée clonale transformée, où les cellules filles vont proliférer indéfiniment lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu et des conditions appropriées. Contrairement aux cultures de cellules primaires, des lignées cellulaires ne sont pas limitées à un nombre de divisions cellulaires dues à des mutations dans une ou plusieurs voies de contrôle de la croissance, il n'y a pas de mort programmée. Ces lignées sont issues, en général, de cellules cancéreuses prélevées chez un patient (ex : HepG2) mais peuvent avoir été transformées artificiellement par transfection d'un gène « immortalisant » tel que l'antigène T du virus SV40, ou peuvent encore avoir été créées par mutation de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (ex : la protéine P53).

Les lignées de cellules hépatiques sont un modèle *in vitro* très populaire pour étudier les fonctions du foie et les mécanismes généraux de toxicité de part leur facilité d'entretien et d'utilisation. Cependant, elles sont généralement inadaptées lors de l'étude du métabolisme des médicaments et la prédiction de la toxicité, car certaines ne contiennent pas toutes les familles d'enzymes métaboliques, ou des enzymes qui ne sont pas présentes à leurs niveaux physiologiques. Autres inconvénients, bien que ces lignées soient « immortelles » : l'expression des gènes est dépendant du nombre de passages, ainsi petit à petit ces cellules perdent leurs caractéristiques génétiques et finissent par se différencier

Une équipe de l'Inserm a caractérisé la lignée « HepaRG » au phénotype très proche des hépatocytes natifs, exprimant de manière stable les enzymes du métabolisme en quantité proche de la physiologie, et exprimant également les récepteurs nucléaires permettant l'induction sur une période de six semaines en culture.

Les lignées cellulaires transgéniques, dont font partie les supersomes, permet l'étude des réactions enzymatiques spécifiques et individuelles. Il peut également être utilisé pour produire des métabolites, élucider leur structure chimique et les caractériser sur le plan pharmacologique. La limite de ce modèle est le nombre d'isoformes exprimées (une ou quelques unes), qui ne reflète pas la situation *in vivo*.

2.4. Coupes tissulaires

Cette technique dont les prémices datent du début du 20ème siècle, a connu depuis une quinzaine d'années un vif regain d'intérêt. La mise au point de microtomes de haute précision, permettant l'obtention de tranches fines. Les progrès technologiques rendent possible la production de façon reproductible de coupes plus fines (250 µm) d'épaisseur régulière et ce avec un traumatisme cellulaire minimal. Ces micro-tranches ou slices tissulaires constituent le modèle *in vitro* le plus complexe, et le plus proche de la situation *in vivo*. L'architecture cellulaire du tissu et les communications intercellulaires sont préservées et l'ensemble des enzymes du métabolisme est exprimé. Il a été utilisé dans de nombreuses études de métabolisme avec des résultats très pertinents. L'architecture complexe de ce modèle, ralentissant la diffusion des nutriments et de l'oxygène dans le tissu, est vraisemblablement à l'origine d'une activité métabolique plus faible que celle pouvant être observée avec les hépatocytes ou les microsomes. Ceci peut être compensé par des durées d'incubation plus longues (allant jusqu'à 24 heures). Ce modèle est une alternative à la culture cellulaire pour les études d'induction. L'absence de technique de cryoconservation limite les applications à grande échelle de ce modèle.

2.5. Organe isolé perfusé

L'organe isolé et perfusé est un modèle *in vitro* qui reproduit les fonctions de l'organe *in situ* (conservation de l'architecture tridimensionnelle). Il n'a jamais été mis en œuvre avec des organes humains et existe uniquement à petite échelle avec les organes animaux.

En utilisant cette technique pour l'intestin, la biotransformation de certains composés a été étudiée en combinaison avec le sens d'excrétion des métabolites. Plusieurs équipes ont utilisé cette méthode pour l'étude de métabolisme de phase I et II, du transport, mais également des interactions médicamenteuses. Cette technique reste difficile à mettre en place, et elle est moins attractive pour les études de métabolisme du fait d'une intégrité fonctionnelle courte (3h) et d'une reproductibilité faible.

2.6. Enzymes recombinantes

Les préparations microsomales contenant les isoformes enzymatiques humaines recombinantes de manière individuelle sont très utiles pour l'évaluation de l'activité d'isoformes enzymatiques. Les enzymes recombinantes sont obtenues par des méthodes conventionnelles de préparation des microsomes à partir de différents systèmes d'expression transfectés : des bactéries (*Escherichia coli*), des levures (*Saccharomyces cerevisiae*), des cellules d'insectes et des cellules de mammifères (lymphoblastes). Ces systèmes permettent l'expression d'une seule enzyme ou, dans le cas des CYP, associée à un partenaire oxydo-réducteur : cytochrome oxydoréductase et cytochrome *b5*.

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*.

Toutefois, en raison de l'absence de voies métaboliques compétitives dans ces systèmes, il est impossible d'obtenir des données sur la contribution relative de l'isoforme en question sur le métabolisme global du substrats *in vivo*. Afin de surmonter ce problème lors de l'extrapolation *in vitro-in vivo*, deux approches ont été proposées : celle du facteur d'activité relative (relative activity factor ; RAF) et celle du facteur d'extrapolation inter-système (inter-system extrapolation factor ; ISEF).

3. Approches d'étude de métabolisme *in vitro*

3.1. Identification des métabolites et des voies métaboliques

In vitro, l'identification des métabolites peut être réalisée à partir d'incubations utilisant des préparations hépatiques humaines. Le choix des modèles et/ou des co-substrat permettra l'identification du type de voies métaboliques (phase I ou phase II). Des modèles plus complets (hépatocytes, slices) permettent une approche globale. L'identification structurale des métabolites passe par des techniques analytiques spécifiques.

3.2. Identification des isoformes enzymatiques responsables d'une réaction enzymatique

Lorsque les métabolites sont identifiés, l'étude des isoformes participant à leur production est nécessaire. La nature et le nombre des isoformes enzymatiques impliquées dans une réaction métabolique influencent la variabilité interindividuelle.

La réaction de phénotypage est le processus d'identification de l'enzyme responsable du métabolisme d'un composé donné. Plusieurs approches existent pour étudier le métabolisme *in vitro* (figure 21), et une combinaison de méthodes est souvent nécessaire. Le métabolisme d'un médicament peut être mesuré dans différents échantillons et modèles biologiques, et les résultats obtenus sont liés à la variation de quantité ou d'activité des enzymes des échantillons individuels.

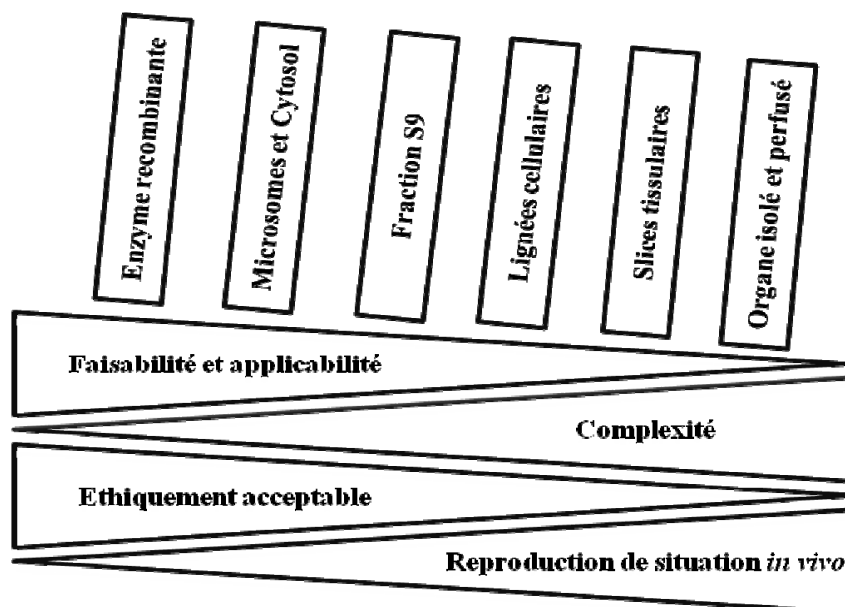


Figure 21. Comparaison des modèles biologiques utilisés pour l'étude de métabolisme *in vitro*

3.2.1. Enzymes recombinantes et méthodes d'extrapolation

Les enzymes recombinantes sont très utiles dans l'identification d'isoformes enzymatiques compétentes pour une réaction métabolique. Le substrat à tester est incubé avec chacune des isoformes, individuellement et à une seule concentration. Si une seule isoforme enzymatique est active, l'interprétation est facilitée. Si au contraire plusieurs isoformes sont actives, l'interprétation est plus délicate : la mesure de la vitesse de formation du métabolite (ou de consommation du produit parent) par les isoformes actives ne suffit pas pour conclure sur leurs implications relatives.

Les enzymes recombinantes peuvent également être utilisées de façon quantitative. Les paramètres de la cinétique enzymatique (K_m , V_{max} , Cl_{int}) peuvent être calculés. Le K_m apparent d'une enzyme recombinante reflète bien l'affinité de l'enzyme pour le substrat *in vivo* quel que soit le système d'expression. Des valeurs proches de K_m entre une isoforme recombinante et des microsomes peuvent être utilisées comme argument pour

confirmer l'implication unique ou majoritaire de cette isoforme. Cependant, les différences d'activité entre microsomes hépatiques et enzymes recombinantes nécessitent d'utiliser des méthodes d'extrapolation pour interpréter de façon pertinente des résultats obtenus.

Extrapolation des résultats

L'activité microsomale hépatique d'une isoforme individuelle pourra être estimée à partir des résultats obtenus par utilisation d'une enzyme recombinante. La plupart de ces méthodes concernent les CYP.

✓ Méthode du contenu relatif en enzyme

Une des méthodes les plus simples pour transposer *in vivo* l'activité d'une isoforme spécifique *in vitro* consiste à multiplier le taux de formation du métabolite obtenu avec l'enzyme recombinante exprimé par unité d'enzyme (pmole), par la quantité de cette enzyme présente en moyenne dans des microsomes hépatiques humains (Q_i). Bien qu'une grande variabilité existe, la quantité moyenne d'isoformes de CYP peut être obtenue à partir de la littérature.

La somme linéaire des activités observées pour chaque isoforme active permet d'estimer l'activité hépatique totale et le pourcentage de contribution relative de chaque isoforme (i) pourra alors être estimé. L'inconvénient majeur de cette méthode est lié aux différences d'activité existantes entre microsomes hépatiques et enzymes recombinantes.

✓ Méthode RAF

Cette approche est actuellement fréquemment utilisée pour estimer la contribution relative d'une isoforme dans une voie métabolique particulière en corrigeant les différences d'activité entre enzymes recombinantes et microsomes hépatiques. La méthode RAF (**Relative Activity Factor**) fut initialement proposée pour les CYP en utilisant des activités spécifiques. Cette méthode implique la mesure de l'activité métabolique de microsomes hépatiques humains et d'une isoforme enzymatique pour un substrat spécifique de cette isoforme. Le coefficient RAF de l'isoforme (i) est estimé par l'équation suivante (les deux activités étant exprimées dans la même unité : pmol/mg de protéine/min) :

$$RAF_i = \frac{\text{Activité des microsomes pour le substrat sonde de } i}{\text{Activité de } i \text{ recombinante pour son substrat sonde}}$$

Pour que le coefficient RAF soit le plus pertinent possible, il est recommandé d'utiliser des microsomes préparés à partir de multiples donneurs ou des activités moyennes obtenues à partir de plusieurs préparations individuelles.

L'activité obtenue avec une enzyme recombinante pour un substrat à tester sera multipliée par le coefficient RAF de l'isoforme. L'activité calculée reflétera l'activité microsomale moyenne liée à cette isoforme. Si l'enzyme recombinante est plus active que les microsomes hépatiques, le coefficient RAF sera inférieur à 1, l'activité observée pour un substrat à tester sera pondérée. Si au contraire, l'activité de l'enzyme recombinante est inférieure à celle de microsomes hépatique, le coefficient RAF sera supérieur à 1, il permettra d'augmenter l'activité observée pour le substrat testé.

Facteur d'extrapolation inter-système (ISEF ; Inter-System Extrapolation Factor)

Proctor et col. ont développé le facteur ISEF pour comparer les activités de rCYP versus microsomes hépatiques, en prenant en considération la concentration hépatique de chaque isoforme (Proctor et al., 2004) :

$$ISEF_i = \frac{V_{\max} \text{ MFH}}{V_{\max} \text{ rCYP}_i \times \text{Abondance CYP}_i \text{ dans MFH}}$$

(MFH : microsome de foie humain)

3.2.2. Test d'inhibition spécifique

Cette approche nécessite l'utilisation d'agents inhibiteurs spécifiques et puissants, qu'il s'agisse d'anticorps ou d'inhibiteurs chimiques.

Elle peut être utilisée avec des fractions sub-cellulaires ou éventuellement en culture cellulaire à la condition que l'inhibiteur utilisé soit non cytotoxique et facilement transporté dans la cellule. L'inhibition microsomale d'une isoforme par un inhibiteur spécifique renseignera sur l'implication et la contribution relative de cette isoforme dans le métabolisme microsomal global. De plus, la réalisation d'une batterie d'incubations avec différents inhibiteurs et en comparant les taux relatifs de métabolisme, permet d'identifier quel inhibiteur réduit significativement le métabolisme global et ainsi découvrir la voie métabolique qui contribue le plus à la clairance du composé.

Des anticorps inhibiteurs spécifiques sont disponibles sur le marché pour la majorité des CYP. Toutefois, leur utilisation est peu répandue en raison du coût important engendré pour un intérêt limité par rapport aux inhibiteurs chimiques. L'inhibition

chimique constitue un outil simple et peu cher tant que les substrats inhibiteurs sont sélectifs et disponibles. La contribution relative d'une isoforme individuelle dans une voie métabolique peut être directement estimée en utilisant cette méthode.

Les problèmes ou difficultés potentiellement rencontrés dans ce type d'étude sont :

- ✓ le manque de spécificité des inhibiteurs : il est nécessaire que la concentration inhibant 50% de l'activité d'une isoforme (CI50) soit 100 fois plus faible que pour les autres isoformes ;
- ✓ le manque de puissance inhibitrice : inhibition incomplète à des concentrations assurant la spécificité ;
- ✓ Des problèmes d'interférences chromatographiques si la technique analytique n'est pas suffisamment spécifique.

3.2.3. Test de corrélation

Le test de corrélation nécessite l'utilisation d'une banque de microsomes individuels. Pour chaque préparation les activités spécifiques des isoformes enzymatiques sont connues. Des corrélations sont recherchées entre les activités de chaque isoforme et la vitesse de biotransformation du médicament à tester. Une corrélation significative démontre l'implication de l'isoforme testée.

Une autre approche consiste à rechercher une corrélation entre la quantité d'isoforme déterminée par technique de Western Blot et la vitesse de biotransformation du substrat.

Pour être pertinent le test de corrélation doit être réalisé avec une banque d'au moins 10 préparations individuelles. Les résultats de ce type d'étude confirment le plus souvent les résultats obtenus à partir d'autres tests (test de compétence, test d'inhibition). Cependant des incohérences sont parfois décrites. Elles peuvent être liées à des spécificités de substrat chevauchantes.

3.3. Extrapolation *in vitro-in vivo*

L'extrapolation *in vitro-in vivo* (ivive) des activités métaboliques consiste à prédire la clairance intrinsèque (CL_{int}) d'un substrat donné et ses interactions médicamenteuses. Ces extrapolations restent semi-quantitatives compte tenu des difficultés de la prise en

considération des facteurs de variabilités physiologiques (flux sanguin hépatique, fixation aux protéines plasmatiques, métabolisme extrahépatique ...).

3.3.1. Etude de cinétique enzymatique

L'étude d'une réaction de biotransformation nécessite l'estimation des paramètres de la cinétique enzymatique de production du métabolite (affinité apparente, K_m et activité maximale, V_{max}).

La réaction de biotransformation par microsomes et enzymes recombinantes, présente rarement des cinétiques « atypiques » ou non-Michaeliennes, et ceci constitue le facteur critique dans le choix du modèle expérimental pour calculer les paramètres cinétiques et pour leur application lors de l'extrapolation *in vivo*. De même, l'activation homo- et hétérotropique, survenant suite à la présence de multiples sites de fixation de substrat et d'effecteur, doit être prise en compte dans la conception et l'interprétation des études de cinétique et d'inhibition.

- **Détermination des paramètres cinétiques**

Le plus classique des modèles de cinétiques enzymatiques est celui de Michaelis-Menten caractérisé par une fonction hyperbolique, où v est la vitesse de la réaction, S est la concentration du substrat.

$$v = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S}$$

Le K_m est la constante de Michaelis (K_m) décrivant l'affinité de l'enzyme, ou l'affinité apparente des microsomes pour le substrat et correspond à la concentration de substrat permettant d'obtenir la moitié de l'activité maximale (V_{max}).

Deux isoformes ou plus, avec des affinités distinctes, peuvent être impliquées dans une réaction de biotransformation. Dans de tels cas, la relation entre v et S devient « biphasique » et correspond à la somme linéaire de deux fonctions de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{V_{max1} \times S}{K_{m1} + S} + \frac{V_{max2} \times S}{K_{m2} + S}$$

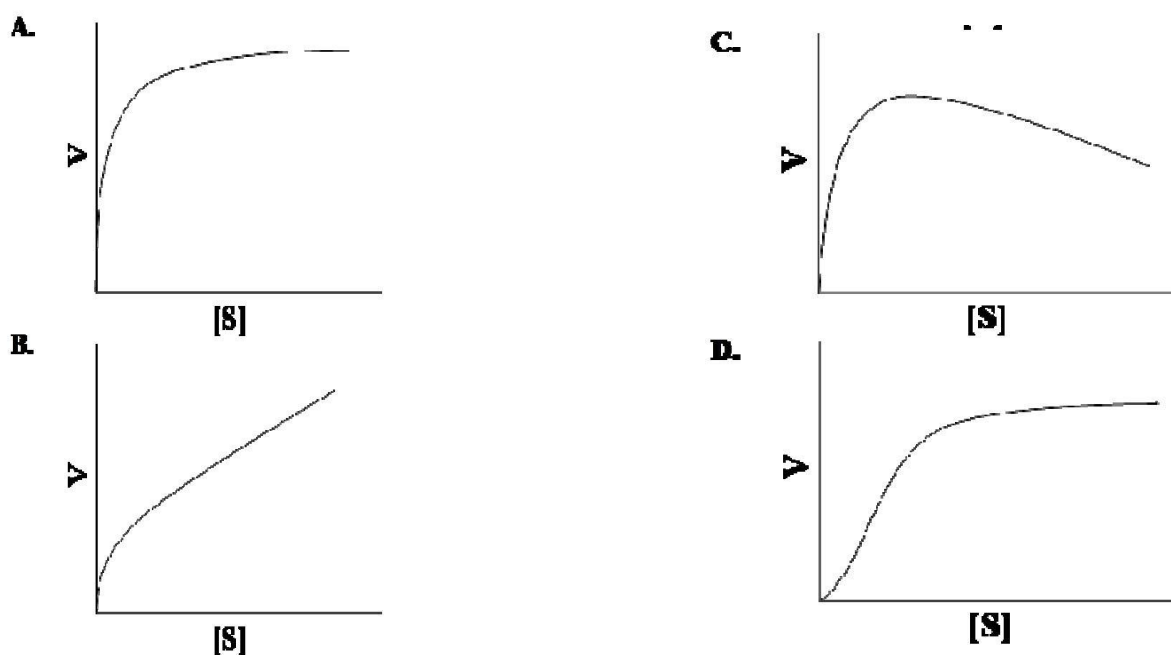


Figure 22. La vitesse (V) de transformation du produit versus la concentration du substrat ([S]) pour les réactions Michaeliennes à une (A) ou deux enzymes (B) ; d'auto-inhibition (C) ; et d'auto-activation (D).

Cependant, deux modèles de cinétiques atypiques s'écarteraient de la fonction de Michaelis-Menten peuvent se produire dans les cas suivants :

Une auto-inhibition qui donne lieu à une courbe au profil convexe (Figure 22-C), en raison d'une vitesse de biotransformation non maintenue à fortes concentrations de substrat. Ce type d'inhibition peut être assimilé à une inhibition non compétitive et décrit par l'équation suivante où K_{si} est la constante décrivant l'inhibition par le substrat :

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + (K_m/S) + (S/K_{si})}$$

Une auto-activation qui donne lieu à une cinétique sigmoïde caractérisée par l'équation de Hill où S_{50} correspond au K_m apparent et « n » au coefficient de Hill (Figure 22.D).

$$v = \frac{V_{\max} \times S^n}{S_{50}^n + S^n}$$

3.3.2. Prédiction de la clairance intrinsèque (CLint)

La clairance intrinsèque est un paramètre important pour l'extrapolation des données obtenues *in vitro* à la situation *in vivo*. La CLint est le coefficient entre la vitesse de biotransformation et la concentration de substrat.

$$v = CL_{int} \times S$$

Elle reflète donc l'activité enzymatique *in vitro* par unité enzymatique. Cette unité peut être des picomoles d'enzyme, des millions de cellules ou plus fréquemment des milligrammes de protéines microsomales.

La CLint est une mesure directe de l'activité enzymatique sans influence des paramètres physiologiques *in vivo*. La CLint *in vitro* est exprimée par l'équation suivante : Si la cinétique enzymatique est définie par le modèle de **Michaelis-Menten** et en considérant que la concentration soit très inférieure au Km, la CLint est alors estimée par l'équation :

$$CL_{int} = V_{max} / K_m$$

Dans le cas d'une cinétique biphasique, la CLint est estimée par l'équation :

$$CL_{int} = V_{max1} / K_{m1} + V_{max2} / K_{m2}$$

3.3.3. Méthode de la demi-vie *in vitro*

La CLint peut également être estimée par l'approche de la « demi-vie *in vitro* », qui consiste à suivre la disparition du substrat dans le temps. Cette cinétique est modélisée par une équation exponentielle décroissante, où S0 représente la concentration initiale du substrat et k sa constante de disparition :

$$S = S_0 \times e^{-k.T}$$

La demi-vie (T_{1/2}) *in vitro* correspond au temps au bout duquel 50% du substrat incubé a été métabolisé :

$$T_{1/2} = \ln 2 / k = 0,693 / k$$

Si Vi correspond au volume de l'incubation (ml) et Q la quantité de microsomes (mg), la CLint est alors déterminée par l'équation :

$$CL_{int} = \frac{0,693}{T_{1/2}} \times \frac{V_i}{Q}$$

Les conditions expérimentales suivantes sont nécessaires pour ce type de réaction :

- Une concentration du substrat testée inférieure au K_m ,
- L'utilisation de concentrations faibles de microsomes (< 0,5 mg/ml) ou d'hépatocytes (< 0,5 x 10⁶ cellules/ml) afin d'éviter les phénomènes de fixation protéique du substrat, qui entraînent une sous-estimation de la CL_{int} ,
- Limitation du temps d'incubation à 30 minutes pour éviter une perte d'activité enzymatique pouvant être à l'origine d'un profil bi-phasique
- Enfin, la vérification qu'aucun métabolite n'est inhibiteur de l'enzyme active.

3.3.4. Pharmacogénétique des enzymes du métabolisme

Les enzymes du métabolisme sont génétiquement régulées. La présence d'une mutation sur une enzyme peut engendrer des variants à activité catalytique importante, intermédiaire ou dans certains cas à l'abolition totale de l'activité. Par conséquent, la variabilité pharmacogénétique doit être prise en considération lors de la détermination des paramètres cinétiques (K_m , V_{max} ou CL_{int}) utilisant des microsomes individuels ou des pools. Ceci permettra de rechercher *in vitro* l'impact d'un polymorphisme sur le métabolisme et constitue une alternative ou éventuellement un préalable aux études cliniques. La contrainte est de disposer d'une banque de microsomes suffisante pour envisager l'étude de mutations intervenant avec des fréquences faibles.

3.3.5. Prédiction de la clairance métabolique *in vivo*

La CL_{int} du foie humain peut être estimée à partir de la CL_{int} déterminée *in vitro*, en utilisant des facteurs d'extrapolation comme :

- le contenu protéique microsomal (48,8 mg de protéine microsomale/g de foie),
- le nombre d'hépatocytes par gramme de foie (120 x 10⁶),
- le poids du foie (25,7 g/kg poids corporel),
- le flux sanguin hépatique (20 mL/min/kg).

Les modèles complexes (culture d'hépatocytes ou slices) donnent les meilleurs résultats d'extrapolation *in vivo*. Les microsomes sont inadaptés pour ce type de prédiction.

Dans tous les cas, il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble des voies métaboliques, y compris extra-hépatiques. La prise en compte d'autres facteurs physiologiques comme la fixation aux protéines plasmatiques nécessite l'utilisation de modèles pharmacocinétiques *in vivo*.

V. Modèles physiologiques d'extrapolation in vitro-in vivo

Introduction

Les effets bénéfiques ou indésirables relatifs à l'exposition à une substance ne sont pas uniquement liés à la dose externe reçue mais dépendent de la quantité de produit actif atteignant les cellules cibles. Ainsi deux phases se distinguent : le cheminement de la substance dans l'organisme jusqu'aux tissus cibles (la pharmacocinétique) et l'action de la substance aux niveaux des tissus cibles (la pharmacodynamie). Schématiquement, la pharmacocinétique ou toxicocinétique pour les substances chimiques peut être définie par l'action de l'organisme sur la substance, et la pharmacodynamie par l'action de la substance sur l'organisme. Afin de comprendre et contrôler les effets des xénobiotiques thérapeutiques ou toxiques, il est donc essentiel de caractériser leur pharmacocinétique. Des modèles «toxicocinétiques» (ou « pharmacocinétiques » quand il s'agit de substances thérapeutiques) sont développés pour représenter, comprendre et prévoir la distribution locale et temporelle d'un agent thérapeutique ou toxique dans un organisme. Donc, la modélisation pharmacocinétique permet de prédire l'ADME (absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion) de substances chimiques naturelles ou synthétiques chez l'homme ou l'animal.

Les modèles toxicocinétiques se classent en deux groupes : les modèles toxicocinétiques empiriques classiques et les modèles toxicocinétiques physiologiques.

Les modèles à fondement physiologique, appelés aussi PBPK pour *Physiologically Based Pharmacokinetic*, décrivent les processus ADME en se basant sur des considérations anatomiques, physiologiques, biochimiques et physicochimiques. Un modèle PBPK subdivise l'organisme en compartiments représentant des tissus ou organes et les relie entre eux par l'intermédiaire d'un fluide circulant, le plus souvent le sang. Les paramètres du modèle correspondent à des entités physiologiques et biochimiques spécifiques à l'organisme et à la substance étudiés, telles que les volumes des organes, les flux sanguins tissulaires, les affinités de la substance pour les tissus ou encore les vitesses de métabolisme. De ce fait, les modèles toxicocinétiques physiologiques répondent aux contraintes économiques ou éthiques existant en toxicologie.

1. Principe des modèles PBPK

La modélisation PBPK est un outil qui relie les concepts pharmacocinétiques aux processus physiologiques. Les modèles PBPK tentent de mimer et de modéliser mathématiquement l'ensemble des processus physiques et biophysiques qui déterminent le devenir du médicament dans l'organisme. La modélisation PBPK est capable d'intégrer des données *in vitro*, physicochimiques et pharmacocinétiques (par exemple des données relatives au métabolisme ou aux interactions) avec des paramètres physiologiques, démographiques et génétiques pour prédire des profils de concentrations plasmatiques et tissulaires en fonction du temps avant que toute étude *in vivo* ne soit réalisée.

Dans un modèle PBPK, les organes de l'espèce étudiée sont représentés par des compartiments. Chaque compartiment est caractérisé par un flux sanguin, un volume et un coefficient de partition tissu/plasma. Les compartiments représentant un organe d'élimination sont également caractérisés par une valeur de clairance intrinsèque. Le transport de la substance d'un compartiment à l'autre est modélisé à partir des flux sanguins et des perméabilités membranaires. La dynamique de xénobiotique dans chaque tissu, c'est-à-dire sa pénétration à travers la membrane plasmique, son élimination dans le tissu et son entrée dans la circulation systémique, est représentée par des équations différentielles.

Un modèle PBPK comprend les composantes suivantes :

- des données spécifiques à l'espèce : données démographiques, physiologiques, anatomiques, biochimiques reconstituant un organisme virtuel, le système.
- des données spécifiques à la molécule étudiée qui seront superposées au système. Ces données provenant de différentes sources (*in silico*, *in vitro* et *in vivo*), peuvent être incorporées dans le modèle PBPK. Ces paramètres composé-spécifiques sont, par exemple, des paramètres physicochimiques (masse moléculaire, pKa, logP, etc.) et biochimiques ;
- un modèle structural (design de l'étude), qui correspond aux tissus et aux organes inclus dans le modèle et à la façon dont ils interagissent entre eux (figure 23).

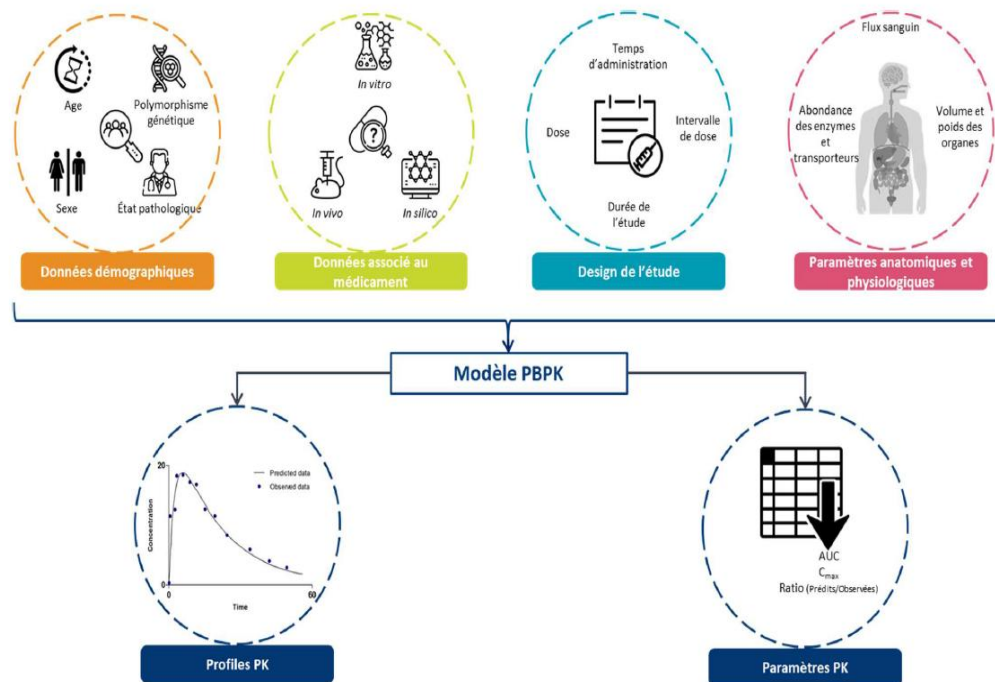


Figure 23. Les principaux éléments constituant un logiciel PBPK

Comme le montrent les figures 24 et 25, les paramètres physiologiques sont couplés aux paramètres composé-spécifiques pour prédire la cinétique des concentrations plasmatiques et tissulaires d'un composé en fonction du temps dans un système vivant (animal ou humain) après une administration principalement intraveineuse ou orale.

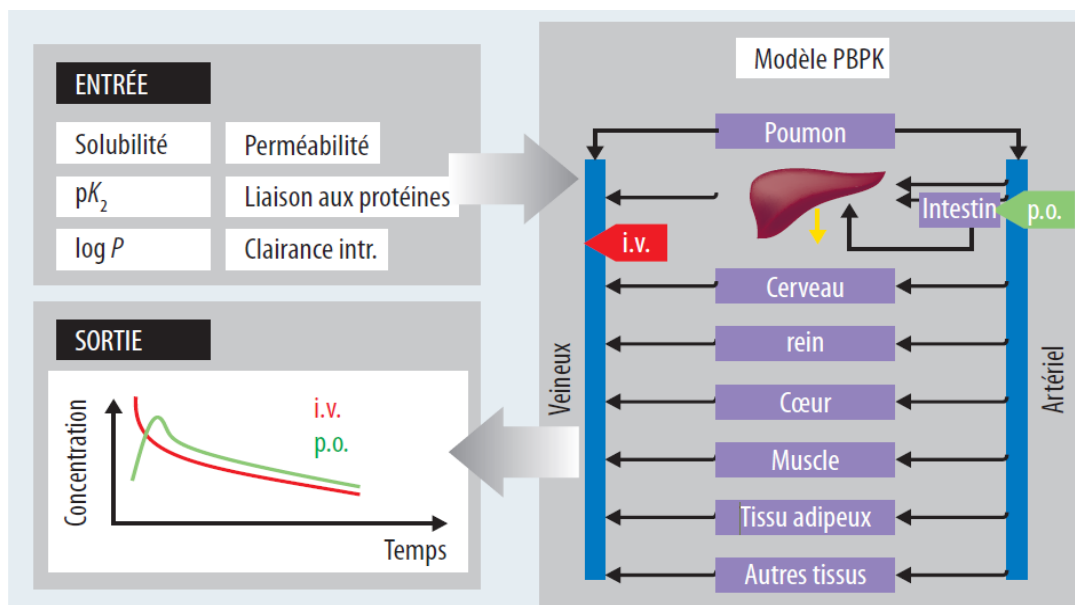


Figure 24. Structure conceptuelle des modèles PBPK représentant l'ensemble du corps

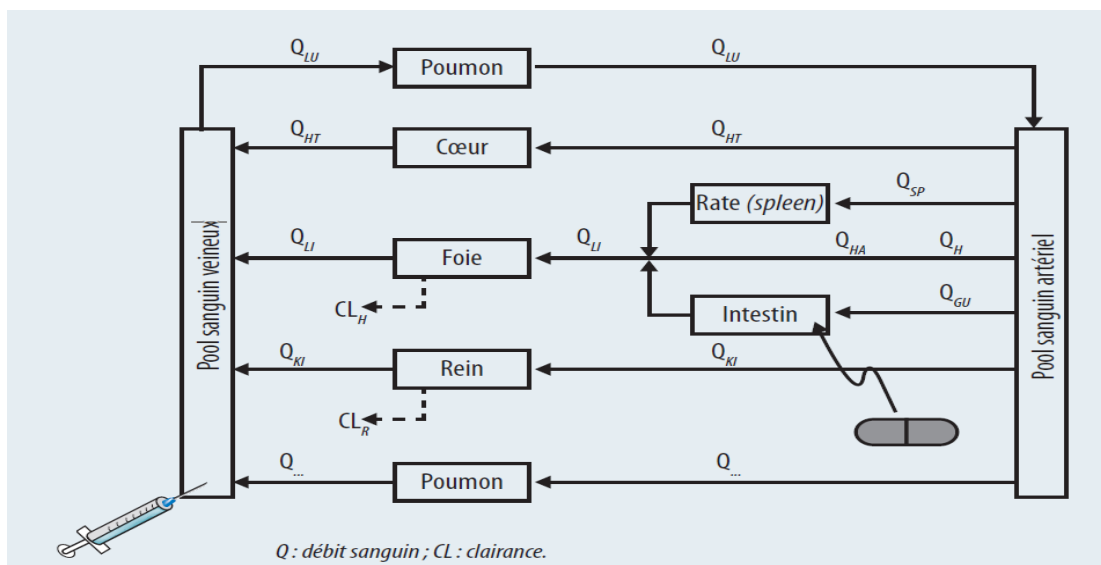


Figure 25. Exemple d'un modèle PBPK où les compartiments représentent les tissus et les organes réels organisés anatomiquement. Une administration intraveineuse et une administration orale sont illustrées.

2. Logiciels

Au vu de l'intérêt porté à la modélisation PBPK et de la demande croissante dans ce secteur, différentes sociétés ont développé des logiciels de modélisation PBPK. Certains sont destinés à la construction des modèles : Matlab, Mathematica, ACSL ou acslXtreme. D'autres, tels que GastroPlus, Simcyp, PK-Sim ou Cloe PK, pourraient être qualifiés de "prêts à l'emploi", c'est-à-dire que l'utilisateur n'a pas besoin de créer son modèle, les équations différentielles décrivant les différents processus ADME ont été intégrées dans ces logiciels. Ces logiciels de modélisation PBPK sont fondés sur des principes similaires, mais diffèrent par leur puissance, et leurs applications sont différentes.

3. Applications des modèles PBPK

Les modèles PBPK sont des modèles compartimentaux comme beaucoup d'autres, mais ils présentent quelques avantages par rapport aux modèles pharmacocinétiques dits « classiques », moins ancrés dans la physiologie. Les modèles PBPK permettent d'abord d'abstraire et éventuellement de réconcilier des données disparates (issues d'expériences physico-chimiques ou biochimiques, d'expériences pharmacologiques ou toxicologiques in vitro ou in vivo, etc.). sur le site de leurs effets, qu'ils soient thérapeutiques ou toxiques. Les modèles PBPK ont également pour objectif d'extrapoler des conditions expérimentales vers

les situations environnementales. L'analyse de données obtenues après expositions expérimentales et/ou la détermination d'un mécanisme d'action opérant chez l'animal ne serait guère utile en l'absence de procédures scientifiques d'extrapolation (ou «transposition») des résultats à l'homme. Il s'agit alors de statuer sur des expositions plus faibles, plus fortes ou sur des expositions par inhalation quand les données concernent l'ingestion par exemple. Même lorsque des données humaines sont disponibles, la question se pose par exemple de leur validité pour la femme, la femme enceinte, l'enfant, et autres populations sensibles. La recherche en pharmaco-toxicologie se concentre sur l'étude des mécanismes d'action et tend à considérer qu'un modèle mécaniste conduit à des extrapolations plus robustes qu'un modèle empirique. L'incorporation de considérations statistiques sur la variabilité des valeurs de paramètres physiologiques dans les populations considérées peut également intervenir dans le processus d'extrapolation.

Dans la suite, les différents types d'extrapolation sont détaillés, en particulier les extrapolations inter-doses, inter-durées d'exposition, inter-voies d'administration, inter-espèces, inter-sujets et intra-individuelle.

- **Extrapolations inter-doses et inter-durées**

La dose interne est la principale variable décrite par les modèles toxicocinétiques (qu'ils soient physiologiques ou non) puisqu'elle **conditionne l'effet toxique des molécules**. Elle est à son tour conditionnée par le niveau de concentration externe qui est, lui-même, une fonction arbitraire du temps dans le cas des toxiques. Par exemple, l'exposition peut être unique ou répétée, se faire à concentration fixe ou fluctuante. Les doses internes atteintes lors d'expérimentations sont souvent très différentes de celles rencontrées dans les situations réelles d'exposition sur les lieux de travail ou dans l'environnement. Pour extrapoler d'une exposition donnée à une autre prédite, il « suffit » de changer, en entrée du modèle, le niveau de concentration d'exposition, la durée d'exposition, sa fréquence, etc.

Néanmoins, **une extrapolation entre faible et forte dose** reste bien sûr délicate car l'on s'intéresse à ce qui se passe en dehors de l'intervalle d'observation du phénomène. Les modèles empiriques ajustés peuvent fournir une interpolation sur la plage d'observation des données. Hors de cet intervalle, tout modélisateur est conscient qu'il peut, hélas, s'éloigner considérablement du phénomène réel qu'il cherche à prédire. Les modèles physiologiques sont, en revanche, théoriquement capables de donner des prédictions

correctes même en dehors de l'intervalle de collection des données puisqu'ils s'appuient sur des mécanismes physiologiques supposés être indépendants de l'exposition.

- **Transpositions inter-voies d'exposition**

Les expérimentations dans lesquelles la voie d'exposition n'est pas la voie d'intérêt peuvent également être mises à profit grâce à la modélisation physiologique. Une fois dans le corps, la substance se distribue selon les mêmes mécanismes indépendamment de la voie d'administration. Le système d'équations différentielles (et ses paramètres associés) caractérisant la distribution de la substance est alors le même quelle que soit la voie d'exposition considérée. On peut donc prédire la toxicocinétique d'un agent inhalé, par exemple, sur la base d'études utilisant autre voie d'exposition. Il suffit pour cela que le modèle décrive les voies concernées et les flux de substance correspondants.

- **Extrapolations inter-espèces**

Pour des raisons éthiques évidentes et pour des raisons techniques, il est difficile voire impossible d'exposer des volontaires humains et d'observer des doses internes. C'est pourquoi la plupart des études toxicologiques visant à déterminer des doses admissibles (doses maximales ne causant pas d'effet toxique) utilisent des systèmes in vitro ou ont recours à l'expérimentation animale. Les études in vitro permettent de comprendre le mécanisme toxique local (au niveau des cellules cibles, par exemple). Cela n'est pas toujours suffisant car il reste à comprendre le phénomène de distribution jusqu'à ces tissus cibles. C'est alors que l'expérimentation animale devient utile. Malgré tout, des différences significatives (qualitatives et quantitatives) existent entre les physiologies humaine et animale. Pour transposer les doses admissibles obtenues d'une espèce à une autre, deux solutions sont envisageables : l'utilisation de «facteurs d'incertitude» ou la modélisation physiologique. La première solution consiste à diviser par un facteur (10, en général) les doses obtenues chez l'animal pour les transposer à l'homme. Ce facteur, choisi plus ou moins arbitrairement, est souvent discutable. En revanche, la modélisation physiologique permet, par sa description paramétrique de l'organisme, **d'expliquer les différences inter-espèces**. Le principe de base de transposition par modélisation physiologique est de supposer que les mécanismes (de pénétration, distribution, métabolisme et excrétion) sont identiques chez les espèces considérées et que les différences concernent uniquement les grandeurs physiologiques. Des différences de mécanisme connues (par exemple, de métabolisme) peuvent également

être prises en compte en adaptant le modèle. Les procédures de transposition consistent donc à conserver ou adapter la structure du modèle et à modifier la valeur de ses paramètres physiologiques (volumes des organes, flux plasmatiques...) **en fonction de l'espèce** (par l'intermédiaire de bases de données existantes, par exemple).

- **Extrapolation inter-sujets ou intra-individuelle**

Malgré les difficultés éthiques, certaines études expérimentales de toxicologie observent directement des populations humaines. Ces études expérimentales sont très contrôlées et un comité d'éthique doit toujours être consulté.

Dans ce type d'étude, la dose d'exposition est comparable ou inférieure aux doses environnementales habituelles. Néanmoins, l'accroissement possible du risque individuel pour les volontaires ainsi que le coût du montage de l'expérience conduisent à limiter leur recrutement. L'information recueillie suite à l'exposition des sujets est intéressante mais c'est plutôt la population dans sa globalité que l'on souhaite protéger et non les volontaires eux-mêmes. L'analyse sur un échantillon de population doit donc être utile pour renseigner sur l'ensemble de la population malgré les variations inter-individuelles.

On peut aussi s'intéresser à la toxicocinétique d'un agent chez des populations notoirement différentes de celles observées. Ces différences peuvent concerner le sexe, l'âge, l'ethnie ou l'état physiologique des sujets. Par exemple, les femmes enceintes ne sont jamais volontairement exposées, mais on peut vouloir inférer la toxicocinétique d'une substance chez elles. On peut s'intéresser, également, à la toxicité du plomb chez les enfants et ne disposer que de données chez l'adulte. Les différences expliquées entre les individus sont prises en compte par l'introduction de covariables dans le modèle. Ces covariables permettent également de traiter les changements intra-individuels observables entre deux expérimentations (variation de la masse, de l'âge, de l'état physiologique d'un même sujet).

Certaines de ces extrapolations sont « paramétriques » : seules des modifications de valeurs d'entrée ou de paramètres sont nécessaires pour réaliser l'extrapolation (c'est généralement le cas pour les extrapolations de dose et de temps). D'autres sont « non paramétriques » en ce sens qu'un changement dans la structure même du modèle est nécessaire (p. ex., lors de l'extrapolation à une femelle gravide, des équations pour le fœtus devraient être ajoutées).

En raison de la base mécaniste des modèles PBPK, une autre utilisation potentielle de la modélisation PBPK est le test d'hypothèse. Par exemple, si un composé médicamenteux a montré une biodisponibilité orale inférieure aux attentes, diverses structures de modèles (c.-à-d. hypothèses) et valeurs de paramètres peuvent être évaluées pour déterminer quels modèles et/ou paramètres correspondent le mieux aux données observées. Si l'hypothèse selon laquelle le métabolisme dans les intestins était responsable de la faible biodisponibilité a donné le meilleur ajustement, alors les résultats de la modélisation PBPK soutiennent cette hypothèse par rapport aux autres hypothèses évaluées.

En tant que tel, la modélisation PBPK peut être utilisée, entre autres, pour évaluer l'implication du transport médié par le transporteur, la saturation de la clairance, la recirculation entérohépatique du composé parent, l'élimination extra-hépatique/extra-intestinale ; solubilité in vivo plus élevée que prévu in vitro ; retards de vidange gastrique induits par les médicaments ; perte intestinale et variation régionale de l'absorption intestinale.

VI. Pharmacotoxico-cinétique et pharmacodynamie et développement des médicaments

1. Pharmacotoxico-cinétique

1.1. Introduction : définition et buts

Les effets bénéfiques ou toxiques relatifs à l'exposition à une substance ne sont pas uniquement liés à la dose externe reçue mais dépendent de la quantité de produit actif atteignant les cellules cibles. Ainsi deux phases se distinguent : le cheminement de la substance dans l'organisme jusqu'aux tissus cibles (la pharmacocinétique) et l'action de la substance aux niveaux des tissus cibles (la pharmacodynamie). Schématiquement, la pharmacocinétique (ou toxicocinétique pour les substances chimiques) peut être définie par l'action de l'organisme sur la substance, et la pharmacodynamie par l'action de la substance sur l'organisme. Afin de comprendre et contrôler les effets des xénobiotiques thérapeutiques ou toxiques, il est donc essentiel de caractériser leur pharmacocinétique.

La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme. On peut distinguer schématiquement 4 phases (ADME) dans la pharmacocinétique d'un médicament:

- **Absorption (voies de pénétration)** : Pénétration du xénobiotique dans l'organisme.
- **Distribution** : Répartition du xénobiotique dans l'organisme.
- **Métabolisme (Biotransformation)** : Biotransformation du xénobiotique (voire cours sur le métabolisme).
- **Excrétion** : Elimination de l'organisme du xénobiotique et de ses métabolites.

La détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament apporte les informations qui permettent de choisir les voies d'administration et d'adapter les posologies pour son utilisation future.

La toxicocinétique inclut les 4 phénomènes (ADME) des xénobiotiques. Elle permet de déterminer la quantité de substance toxique susceptible d'atteindre sa cible et de préciser sous quelle forme (composé initial ou métabolites) elle y parvient.

1.2. Les étapes pharmacocinétiques

1.2.1. Etape 1 : Absorption d'un médicament

L'absorption est le processus par lequel le médicament inchangé passe de son site d'administration à la circulation générale (site de mesure). La voie d'administration du médicament influence cette première phase : la voie intra-veineuse est la voie de référence puisque par définition, à la différence des autres voies (orale par exemple) toute la dose administrée atteint la circulation générale.

1.2.1.1. Modalités d'absorption

À l'exception de la voie I.V, l'absorption est en effet limitée par le passage de membranes épithéliales lipoprotéiques comme la muqueuse buccale, gastro-intestinale, pulmonaire ou la peau.

Les différents types de transport membranaire :

a- Diffusion passive :

- ❖ Elle représente le mécanisme le plus important. Elle concerne les molécules liposolubles non ionisées capables de se dissoudre dans les constituants membranaires.
- ❖ Le transfert des molécules se fait dans le sens du gradient de concentration existant de part et d'autre de la membrane (la vitesse est proportionnelle au gradient).
- ❖ C'est un phénomène qui ne nécessite pas de l'énergie et de transporteurs.
- ❖ Non spécifique, non saturable et sans compétition entre molécules $\Rightarrow$ Loi de Fick++.

b- Transport actif :

- ❖ Contre un gradient de concentration.
- ❖ Nécessite de l'énergie (ATP) et des transporteurs.
- ❖ Saturable, Spécifique.
- ❖ Compétition possible entre 2 substrats pour le même transporteur.

c- Filtration :

- ❖ Concerne les molécules hydrosolubles et de petite taille.
- ❖ Selon le flux d'eau à travers des pores protéiques dans la membrane.
- ❖ Le passage se fait en fonction du gradient de pression hydrostatique ou osmotique.

- ❖ Absence de phénomène de saturation, de compétition et de spécificité.

d- Diffusion facilitée :

- ❖ C'est un mécanisme qui met en jeu un transporteur, facilite la diffusion, mais ne met pas en jeu d'énergie.
- ❖ Le transport va toujours se faire dans le sens du gradient de concentration comme la diffusion passive. Mais la vitesse est augmentée.
- ❖ C'est un phénomène spécifique et saturable.
- ❖ Compétition possible entre 2 substrats pour le même transporteur.

e- Transport par endocytose (rare pour les médicaments):

- ❖ C'est le passage transmembranaire des grosses molécules emprisonnées dans des vésicules formées par invagination de la membrane plasmique. Des oligonucléotides formés de 10 à 20 unités, comme ceux qui sont utilisés en thérapie antisens (Méd) pénètrent dans les cellules essentiellement par endocytose.

L'absorption est influencée par :

Les caractéristiques du médicament :

- Physico-chimiques : pKa (la forme non ionisée d'un médicament est absorbée plus facilement)
- Hydro/lipo solubilité
- Taille et morphologie de la molécule
- La forme galénique (sirop, comprimé, gélule...) qui détermine la vitesse de dissolution du médicament...

Les caractéristiques liées à l'individu :

- Le pH digestif
- La vitesse de vidange gastrique et la mobilité intestinale
- L'alimentation : repas riche en graisses...
- La prise associée de médicament (pansements digestifs, modificateurs de vidange gastrique)
- L'âge.

1.2.1.2. Evaluation de l'absorption : la biodisponibilité

La biodisponibilité se définit comme étant la fraction de la dose de médicament administré qui atteint la circulation générale et la vitesse à laquelle elle l'atteint.

Trois paramètres principaux reflétant la vitesse d'absorption :

- La concentration maximale C_{max}
- T_{max} : temps pour atteindre C_{max}
- La surface sous la courbe SSC ($AUC = \text{Area Under the Curve}$)

La biodisponibilité ne peut être appréciée que par rapport à une forme de référence. On distingue ainsi :

- ✓ La biodisponibilité absolue.
- ✓ La biodisponibilité relative.

Biodisponibilité absolue

Par définition, après injection IV, la biodisponibilité d'un médicament est égale à 100% puisque la totalité de la dose est injectée dans la circulation.

La biodisponibilité absolue, correspondant au rapport de la quantité absorbée par une voie d'administration donnée à celle obtenue par voie IV (la voie de références est la voie IV).

La fraction de médicament qui, après administration, atteint la circulation générale est déterminée, en pratique, de la manière suivante : on compare l'évolution dans le temps des concentrations plasmatiques d'un médicament après une administration d'une même dose par voie intraveineuse (i.v.) et par une autre voie d'administration (orale en général). A partir des courbes représentant l'évolution des concentrations plasmatiques en fonction du temps, on calcule les aires sous la courbe ($\text{Area under the curve} = AUC$) pour les deux formes d'administration.

La courbe après administration i.v. décrit la disparition du médicament du compartiment plasmatique. Celle-ci est due à la distribution du médicament dans d'autres compartiments et à son élimination (figure 26)

Après administration par voie orale, la courbe est biphasique : elle décrit tout d'abord l'augmentation des concentrations plasmatiques liée à la résorption du médicament puis la diminution de ces concentrations liée à sa distribution et à son élimination. Le point où la concentration est maximale correspond à un équilibre entre la quantité de médicament qui est résorbée et celle qui disparaît du plasma.

Dans cet exemple, la biodisponibilité absolue (F) de la forme orale est déterminée par le rapport :

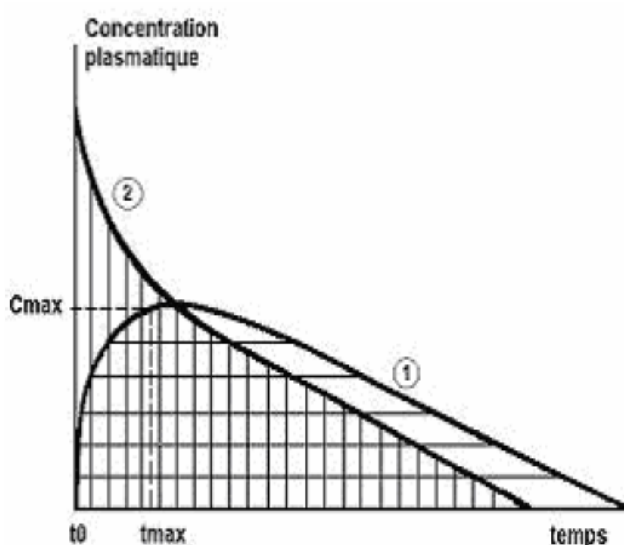
$$F = \frac{\text{AUC orale}}{\text{AUC IV}}$$

De même, la biodisponibilité absolue d'une forme administrée par une autre voie sera déterminée par le rapport

$$F = \frac{\text{AUC autre voie}}{\text{AUC IV}}$$

Une biodisponibilité absolue de 0,5 pour un produit signifie que seule la moitié de la quantité administrée est retrouvée dans la circulation générale.

- La biodisponibilité absolue est comprise entre 0 et 1 (ou 0 et 100 %).
- Une biodisponibilité absolue après administration orale de 0,5 signifie que 50 % de la quantité administrée par voie orale sera retrouvée dans la circulation générale.
- La quantité de médicament qui atteint la circulation générale (ou systémique) est fonction de la quantité absorbée par l'épithélium digestif (et donc de la dose administrée) mais également, d'autres processus d'élimination pré-systémique :
 - **dégradation dans la lumière intestinale,**
 - **métabolisme au niveau des entérocytes,**
 - **captage hépatique important au premier passage.**



Courbe 1 : Concentration plasmatique après prise orale.
La pente du tracé de l'augmentation des concentrations de t 0 à t max traduit la vitesse de résorption

Courbe 2 : Concentration plasmatique après injection intraveineuse d'une même dose.

Le rapport de l'aire sous la courbe 1 per os sur l'aire sous la courbe 2 i.v. permet de calculer la biodisponibilité absolue

$$\left(\frac{\text{AUC}_{\text{per os}}}{\text{AUC}_{\text{i.v.}}} \right)$$

Figure 26. Courbes de concentration plasmatique après prise orale et injection IV.

Biodisponibilité relative

- La forme de référence est administrée par une autre voie que la voie IV.
- permettant de comparer entre elles deux formes du médicament administrées par la même voie (ex. comprimé vs sirop), alors que la biodisponibilité absolue est déterminée lors de l'étude d'un nouveau médicament.

Effet de premier passage hépatique

Lorsque le médicament a une forte affinité pour l'hépatocyte et les enzymes hépatiques, une fraction de la dose absorbée est captée lors du premier passage, c'est à dire avant même d'atteindre la circulation générale. La quantité de médicament retrouvée dans la circulation systémique est alors diminuée. C'est l'effet de premier passage hépatique.

Voies d'administration permettant d'éviter l'effet de premier passage hépatique

- Voie intra-veineuse +++
- Voie sub-linguale
- Voie trans-dermique
- Voie inhalée
- Voie nasale

1.2.2. Etape 2 : Distribution

La distribution correspond au processus de répartition du médicament dans l'ensemble des tissus et organes. Après résorption, le médicament est véhiculé par le sang. Il se retrouve soit sous forme libre, soit fixé aux protéines et/ou aux éléments sanguins. Seule la fraction libre est active. Toute modification de cette fixation peut être à l'origine d'une augmentation de la fraction libre. Une fois la circulation sanguine atteinte, les médicaments vont se distribuer dans l'organisme. Les caractéristiques physico-chimiques du médicament conditionnent son affinité pour les différents tissus mais d'autres facteurs vont influencer la distribution.

1.2.2.1. Volume apparent de distribution

Il est difficile de quantifier la distribution d'un médicament compte-tenu de l'impossibilité de mesurer les concentrations tissulaires, seul le secteur plasmatique étant facilement accessible.

La relation entre la quantité totale de médicament présente dans l'organisme et la concentration observée au niveau plasmatique s'exprime par le **Volume de distribution**. Connaissant la dose administrée (**D**) et la concentration plasmatique (**C**) extrapolée à l'origine **C₀** après injection intraveineuse, il est en effet simple de calculer ce Volume de distribution.

$$V = \text{dose} / C_0$$

NB : On calcule aussi Vd à partir de la clairance du médicament et de la constante d'élimination ($V_d = \text{Clairance} / K_e$)

L'ordre de grandeur du volume de distribution d'un médicament a une signification pharmacologique comme l'illustre le tableau ci-dessous.

Tableau 7. Significations pharmacologiques de valeur de volume de distribution

Vd (l/kg)	Compartiment de distribution	Exemples
0,05	Plasma	Poids moléculaire élevé : Héparine Insuline Forte fixation aux protéines plasmatiques : Phénylbutazone Warfarine Aspirine
± 0,20	Eau extracellulaire	Théophylline Aténolol Pénicilline
± 0,55	Eau totale	Ethanol Paracétamol Indométacine
> 2 et jusqu'à > 10	Stocké ou lié spécifiquement dans certains tissus	Morphine Propranolol Imipramine

1.2.2.2. Facteurs modifiant la distribution

✓ La liaison aux protéines plasmatiques

Certaines protéines plasmatiques possèdent la propriété de fixer des substances endogènes mais également les produits exogènes comme les médicaments. Il en résulte la formation d'un complexe [protéine – médicament] menant à la distinction du médicament sous une forme libre et sous forme liée. La liaison médicament-protéine est réversible. Elle répond à la loi d'action de masse :

médicament libre + protéine plasmatique $\rightleftharpoons$ médicament lié à la protéine

Seule la forme libre du médicament est active pharmacologiquement. La forme liée est inactive pharmacologiquement et ne peut diffuser pour atteindre son lieu d'action. Cette inactivité n'est que temporaire car les formes liée et libre sont en équilibre réversible. Au fur et à mesure de la disparition de la forme libre (par diffusion vers les tissus ou élimination), il y a passage de la forme liée vers la forme libre.

Différentes protéines plasmatiques sont impliquées dans la fixation des médicaments :

- l'albumine
- l' α_1 glycoprotéine acide
- les lipoprotéines
- la γ globuline

L'albumine et l' α_1 glycoprotéine acide sont les deux principales protéines impliquées dans la fixation des médicaments.

La fixation aux protéines plasmatiques dépend des caractéristiques acido-basiques des médicaments.

Le seul pourcentage de fixation aux protéines est insuffisant pour comprendre les conséquences de la fixation sur la pharmacocinétique d'un médicament. En effet il existe un équilibre entre le plasma, les tissus et les voies d'élimination.

Lorsqu'il est déjà fixé un médicament fortement fixé aux protéines plasmatiques est soit éliminé soit distribué vers les tissus. Si les voies de métabolisme sont efficaces, cette défixation n'aura le plus souvent aucune conséquence.

En pratique, la fixation protéique n'est à considérer que si elle est élevée (> 90 %) et si le médicament a une marge (ou un index) thérapeutique étroite (concentration toxique proche de concentration efficace).

✓ **Facteurs tissulaires**

La quantité de médicament contenue dans chaque tissu dépend de trois facteurs :

a- l'affinité tissulaire : le concept d'affinité tissulaire exprime l'importance de la fraction liée et l'intensité de cette liaison. Cette notion reste largement théorique. Ce que l'on mesure (chez l'animal ou chez l'homme dans des prélèvements opératoires), ce sont des concentrations tissulaires. Celles-ci sont la résultante des différents facteurs de distribution et pas seulement de l'affinité. Ce n'est qu'à l'équilibre que le rapport des concentrations entre les tissus est le rapport des affinités

b- la vascularisation : on classe les tissus au point de vue de leur vascularisation, en 4 groupes :

- tissus richement vascularisés : coeur, poumons, foie, reins, cerveau, glandes endocrines
- tissus moyennement vascularisés : peau, muscles
- tissus peu vascularisés : moelle, tissu adipeux
- tissus très peu vascularisés : os, dents, tendons, ligaments, cartilages, phanères

La vitesse de pénétration dans le tissu dépend de l'importance de sa vascularisation. Un excès de médicament par rapport à l'état d'équilibre (atteint lors d'administrations prolongées) peut s'observer momentanément dans le premier groupe, un déficit dans le dernier. Une baisse du débit régional, quelle qu'en soit la cause, entraîne une moindre fixation du médicament dans l'organe intéressé

c- le volume : plus un tissu est volumineux, plus la quantité totale de médicament qu'il contient sera élevée.

1.2.3. Etape 3 : Métabolisme

Le métabolisme d'un médicament correspond à la transformation par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs composés, dits métabolites qui peuvent être actifs pharmacologiquement, inactifs pharmacologiquement ou parfois toxiques.

Le métabolisme est une des phases de l'élimination d'un médicament : les différentes étapes du métabolisme conduisent à la formation de substances hydrosolubles plus facilement éliminées par les milieux aqueux que sont les urines, la bile, la salive ou la sueur.

Il est important de noter que le métabolisme des médicaments n'aboutit pas forcément à son inactivation. Ainsi les prodrogues (ou promédicaments) inactifs pharmacologiquement sont rapidement métabolisés en métabolites actifs pharmacologiquement.

De nombreux tissus peuvent réaliser le métabolisme des médicaments : foie, rein, poumon, intestin...

Le principal site de métabolisme des médicaments est le foie : les hépatocytes sont riches en enzymes impliquées dans le métabolisme.

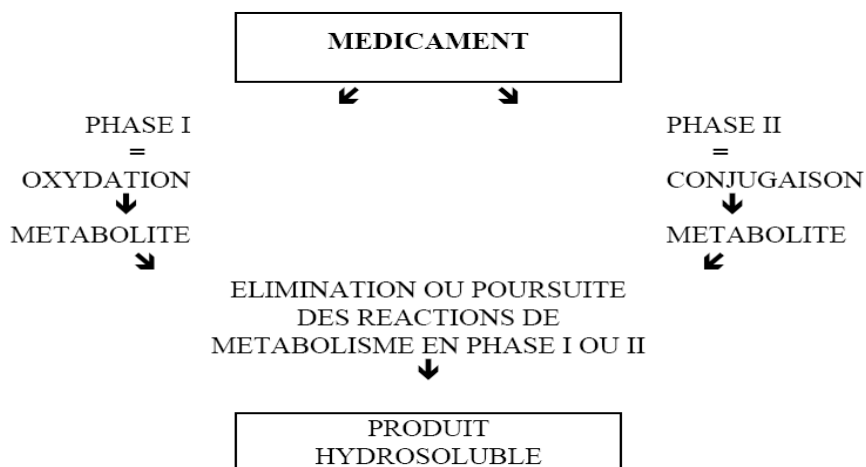
On distingue 2 grandes phases dans le métabolisme des médicaments :

les réactions de phases I et les réactions de phases II

1.2.3.1. Les voies métaboliques

➤ Les réactions de phases I

La *phase I* est une étape d'oxydation des médicaments qui conduit à la formation de métabolites, qui peuvent soit être éliminés directement s'ils ont atteint un degré d'hydrosolubilité suffisant, soit poursuivre les processus de métabolisation par la phase II. La phase I n'est pas obligatoire : certains médicaments peuvent subir immédiatement la phase II.



Les réactions de phase I sont des réactions :

- d'oxydation : qui impliquent des mono-oxygénases telles que le cytochrome P450. Elles ont essentiellement lieu au niveau des microsomes hépatiques.
- de réduction moins fréquente
- d'hydrolyse : qui ont lieu au niveau des organes (rein, foie, intestin, poumon..) mais aussi au niveau du plasma. Les estérases impliquées dans les réactions d'hydrolyse ne sont pas spécifiques. Les métabolites formés par les réactions de phase I ont des groupes fonctionnels hydroxyles (OH), amines (NH₂) ou carboxyles (COOH) qui peuvent ensuite être conjugués par les réactions de phases II.

➤ La phase II

La phase II est une phase de conjugaison qui aboutit à la formation de substances conjuguées, hydrosolubles et facilement éliminées par les urines ou la bile. Les

métabolites ou les médicaments, subissent différentes réactions de conjugaison : glycuco- (ou glucuro ou glucuruno) conjugaison ; sulfo-conjugaison ; acétylation ; alcoylation (transfert d'un groupement méthyl) pour donner un produit conjugué qui sera éliminé. La conjugaison est le transfert sur un groupe fonctionnel (OH, NH₂, COOH) d'un composé de type sulfate, glucoronide, méthyl ...

1.2.3.2. Les conséquences du métabolisme

Le tableau 8 résume les différentes possibilités :

Tableau 8. Les conséquences de métabolisme des médicaments

Spécialité pharmaceutique	Métabolite correspondant
Active	Inactif
Active	Actif
Inactive ou (<i>promédicament</i> = prodrogue)	Actif
Active	Toxique

1.2.4. Elimination

Les médicaments sont éliminés par l'organisme suivant divers émonctoires qui forment les «voies d'élimination » des médicaments. La substance initiale et chacun de ses métabolites sont éliminés séparément.

1.2.4.1. Elimination hépatique

Outre ses capacités métaboliques, le foie participe à l'excrétion des médicaments, sous forme intacte ou bien souvent après avoir été métabolisé ou conjugué hors de l'organisme par le biais du système biliaire.

Après excrétion dans la bile, le médicament se retrouve dans la lumière intestinale où il peut être réabsorbé : c'est le cycle **entéro-hépatique**.

Conditions

L'élimination biliaire n'est en règle que partielle (exceptions : vert d'indocyanine, rifamycines).

Il faut que :

- le poids moléculaire soit important, au minimum 300
- la molécule soit amphipathique, c'est-à-dire qu'elle comporte à la fois une partie polaire fortement hydrosoluble et une partie lipophile.

1.2.4.2. Elimination rénale

La plupart des molécules sont éliminées dans les urines, soit sous forme inchangée, soit sous forme de produits de dégradation. Le plus souvent les médicaments ou leurs métabolites ont une masse moléculaire bien inférieure à 5000 et sont de ce fait filtrés par le glomérule. Seule la partie non fixée est filtrée.

La réabsorption tubulaire intervient tout au long du néphron. Il s'agit le plus souvent d'un processus passif qui est influencé par le degré d'ionisation du médicament : seule la fraction non ionisée au Ph urinaire est réabsorbée. Cette propriété est utilisée dans certains surdosages pour accélérer l'élimination du médicament en alcalinisant les urines pour bloquer la réabsorption.

Une sécrétion active est également observée pour quelques molécules, entre autres des cations ou anions qui sont sécrétés dans la lumière du tubule par des systèmes de transport spécifiques, consommant de l'énergie et à capacité saturable. On peut donc observer des phénomènes de compétition.

1.2.4.3. Autres voies d'excrétion

Les autres voies (salivaires, pulmonaire...) sont usuellement négligeables par rapport aux voies rénale et hépatique.

Néanmoins on soulignera l'importance de la voie lactée pouvant donner des risques d'intoxications du nourrisson lors de l'allaitement.

Les glandes salivaires éliminent électivement les métaux, certains alcaloïdes, certains antibiotiques. Ces substances peuvent être ensuite avalées.

Les glandes sudoripares, lacrymales, bronchiques, génitales, éliminent le même type de substances mais en faibles quantité ; les glandes bronchiques éliminent les iodures.

Les phanères concentrent certains métaux et métalloïdes (arsenic) ainsi qu'un antibiotique (griséofulvine).

1.2.5. Quantification du métabolisme et de l'élimination

1.2.5.1. Notion de clairance

La capacité globale de l'organisme à éliminer une molécule est la clairance, définie comme le volume de plasma totalement épuré par unité de temps ; elle est ainsi habituellement exprimée comme un débit en ml/min.

La clairance totale est égale à la somme des clairances de chaque organe susceptible d'intervenir dans l'élimination du médicament : clairance rénale, hépatique, intestinale, pulmonaire, etc.

❖ Clairance d'un organe

La clairance d'un organe correspond à la quantité de sang qui traverse cet organe et qui va être totalement débarrassée du médicament par unité de temps.

Elle est égale au produit du débit sanguin dans l'organe par le coefficient d'extraction de l'organe :

$$Cl = Q \times E$$

où Cl = la clairance, Q le débit sanguin et E le coefficient d'extraction

Le coefficient d'extraction se calcule selon :

$$E = \frac{C_A - C_V}{C_A}$$

où :

C_A est la concentration du médicament à l'entrée de l'organe,

C_V est la concentration du médicament à la sortie de l'organe.

❖ Clairance totale

Elle correspond au rapport de la dose injectée par voie intraveineuse à l'aire sous la courbe des concentrations sanguines ou plasmatiques obtenues :

$$Cl = \frac{\text{Dose i.v.}}{\text{AUC i.v.}}$$

❖

Ou pour une administration orale :

$$Cl = F \times \frac{\text{Dose orale}}{\text{AUC orale}}$$

❖

Avec F = biodisponibilité absolue

1.2.5.2. Notion de coefficient d'extraction

La capacité d'un organe à éliminer un médicament est ainsi exprimée par la fraction du flux sanguin le traversant qui est complètement épurée du médicament par unité de temps. Cette fraction est définie comme le coefficient d'extraction E .

Pour un organe on a :

Clairance = Débit sanguin(Q) × Coefficient d'extraction de l'organe

$$E = \frac{Ca \text{ (concentration sanguine artérielle)} - Cv \text{ (concentration sanguine veineuse)}}{Ca \text{ (concentration sanguine artérielle)}}$$

Les médicaments peuvent ainsi être divisés en plusieurs groupes selon leur comportement au niveau de l'organe :

- **fortement extraits si $E > 0,7$**
- **moyennement extraits quand $0,3 < E < 0,7$**
- **faiblement extraits quand $E < 0,3$**

Tableau 9. Exemples de coefficients d'extraction hépatiques et rénaux

	<i>faiblement extrait</i> $0 < E < 0,3$	<i>moyennement extrait</i> $0,3 < E < 0,7$	<i>Fortement extrait</i> $0,7 < E < 1$
Extraction hépatique (<i>E_h</i>)	phénytoïne diazépam théophylline	codéine nortriptyline quinidine aspirine	désipramine morphine propranolol
Extraction rénale (<i>E_r</i>)	Furosémide	pénicillines	Glucuronoconjugués

1.2.5.3. Clairance hépatique

La clairance hépatique se décompose en deux :

- **clairance métabolique**
- **clairance biliaire**

Clairance métabolique

Dépend de deux facteurs :

- la clairance intrinsèque qui est la capacité du ou des systèmes enzymatiques hépatiques à métaboliser le médicament indépendamment des autres facteurs (débit sanguin par exemple). Elle traduit la fonction brute du foie.
- la fraction libre plasmatique du médicament qui est fonction du degré de fixation protéique.

On peut alors distinguer 2 situations :

- Lorsque le foie extrait fortement un médicament ($E_h > 0,7$), l'élimination métabolique est dite débit-dépendent. En effet E_h tend vers 1 alors $Cl_h = Q_h \times E_h$

= Qh . Tous les facteurs qui influenceront le débit hépatique (cf infra) modifieront donc l'élimination de ce médicament.

- Lorsque le foie extrait faiblement un médicament ($E_h < 0,3$), l'élimination dépend de la clairance métabolique (fraction libre du médicament et clairance intrinsèque)

Clairance biliaire

C'est la capacité du système biliaire à éliminer le médicament. Ce système élimine principalement les molécules de forte masse moléculaire. La sécrétion biliaire est le plus souvent active par le biais de transporteurs.

Facteurs influençant la clairance hépatique

- Modification du débit sanguin hépatique : Insuffisance cardiaque ; Shunt porto-cave, repas, médicaments (béta-bloquants, verapamil...)
- Modification de la clairance intrinsèque : Induction & Inhibition enzymatique (cfsupra) ; polymorphismes génétiques ; insuffisance hépato-cellulaire ; hypoxie ; âge
- Modification de la fraction libre
- Modification de la clairance biliaire : cholestase intra et extrahépatique.

1.2.5.4. Clairance rénale

On a par définition $Clr = Qr \times Er$

(Clr =Clairance rénale/ Q =Débit sanguin/ E coefficient d'extraction)

Mais aussi :

$$Cl \text{ rénale} = Cl \text{ filtration} + Cl \text{ sécrétion} - Cl \text{ réabsorption}$$

Facteurs influençant la clairance rénale

- Modification du débit de filtration glomérulaire : Insuffisance rénale, insuffisance cardiaque, âge
- Modification de la sécrétion tubulaire : Insuffisance rénale ; insuffisance cardiaque ; âge ; interaction médicamenteuse
- Modification de la réabsorption tubulaire : pH, débit fraction filtrée, âge
- Modification de la fraction libre

1.2.6. Demi-vie d'un médicament

Un paramètre synthétique est largement utilisé pour exprimer l'élimination d'un médicament de l'organisme : la demi-vie ($t_{1/2}$). La $t_{1/2}$ correspond au temps nécessaire pour passer d'une concentration plasmatique à sa moitié, quel que soit le niveau de cette concentration. Le facteur de proportionnalité, entre la dose administrée et la concentration plasmatique, est le volume de distribution. Une autre manière d'exprimer la même notion est de considérer la $t_{1/2}$ comme le temps mis pour diminuer de moitié la quantité totale de molécule contenue dans l'organisme quelle que soit la dose.

Généralement la demi-vie est calculée à partir des concentrations plasmatiques mesurées durant la phase d'élimination.

$$t_{1/2} = 0,693 / K_e \quad \text{et } K_e = \frac{\log(C_1/C_2)}{t_2 - t_1}$$

C_1 est la concentration au temps 1 et C_2 la concentration au temps 2.

L'élimination de la molécule inchangée ne peut se faire qu'à partir des organes d'élimination, en contact avec le sang ou le plasma. Comme par ailleurs la quantité de médicament dans le sang ou le plasma à tout moment dépend du volume de distribution, la vitesse de disparition du médicament dépendra à la fois de la clairance et du volume de distribution. D'où :

$$t_{1/2} = 0,693 \times V_d / Cl$$

Pour une clairance élevée, les molécules à petit volume de distribution, donc à concentrations plasmatiques élevées, seront éliminées avec une demi-vie courte et réciproquement. La $t_{1/2}$ n'est ainsi qu'un résumé de deux paramètres physiologiques caractéristiques de chaque molécule, la clairance et le volume de distribution.

La demi-vie n'est donc pas le reflet unique de l'élimination du médicament mais un critère composite lié à la distribution et à l'élimination de celui-ci.

Ainsi, des situations cliniques existent où la $t_{1/2}$ reste constante alors que l'élimination du médicament est altérée. Mais Cl et V_d ont varié de la même proportion dans le même sens (c'est le cas chez l'insuffisant rénal pour certains médicaments).

Les études pharmacocinétiques chez les malades qui n'utilisent que la demi-vie comme l'indicateur de l'élimination se trouvent parfois faussées car elles négligent le fait qu'une pathologie donnée puisse modifier la clairance et/ou le volume de distribution : si l'on est dans le cas où V_d et Cl sont diminués, tous les deux de la même proportion, la $t_{1/2}$ calculée selon l'équation restera inchangée mais les concentrations plasmatiques du

médicament auront augmenté et ce de façon potentiellement importante. Les risques de toxicité peuvent augmenter en même temps.

- En pratique, la $t_{1/2}$ intervient dans la réflexion pour établir le rythme posologique.

Elle permet d'estimer le temps mis pour atteindre le **plateau d'équilibre** ($5 t_{1/2}$

dans tous les cas) et la fluctuation de concentrations entre les prises. Lorsqu'un médicament est administré en chronique, le profil des concentrations dépendra du rapport entre la $t_{1/2}$ et l'intervalle entre les prises

Facteurs intervenant dans la détermination du rythme posologique

- $t_{1/2}$
- Relation PK (concentrations) / PD (effet) : reliée ou non ?
- C max / C résiduelle : effet pic recherché ou non ? (ex : antibiotiques)
- Facteurs physiopathologiques influençant la PK
- Durée de traitement / Observance prévisible

1.2. Toxicocinétique

La toxicocinétique est basée sur des principes analogues à ceux de la pharmacocinétique mais dans un contexte totalement différent puisque la pharmacocinétique appliquée a pour but principal la surveillance des concentrations des médicaments dans les liquides biologiques et l'adaptation de la posologie pour obtenir des concentrations efficaces sur le plan thérapeutique. Alors que, l'étude de la toxicocinétique permet de :

- Evaluer la gravité de l'intoxication en comparant les données cliniques (symptômes) et analytiques (paramètres cinétiques) et les facteurs pronostiques afin de poser l'indication de certaines thérapeutiques ;
- Suivre l'élimination du toxique de l'organisme ;
- Apprécier l'efficacité d'un traitement épurateur ou antidotal.

2. Pharmacodynamie

2.1. Introduction : définition et buts

On appelle effet pharmacodynamique une modification mesurable et reproductible, fonctionnelle ou organique, provoquée par un médicament dans un système biologique appelé « effecteur ».

Un médicament provoque un ou plusieurs effets pharmacodynamiques, pour des doses qui peuvent être différentes. Un même effet pharmacodynamique peut être provoqué par plusieurs médicaments ; l'ensemble de ces médicaments constitue une famille pharmacologique (figure 27)

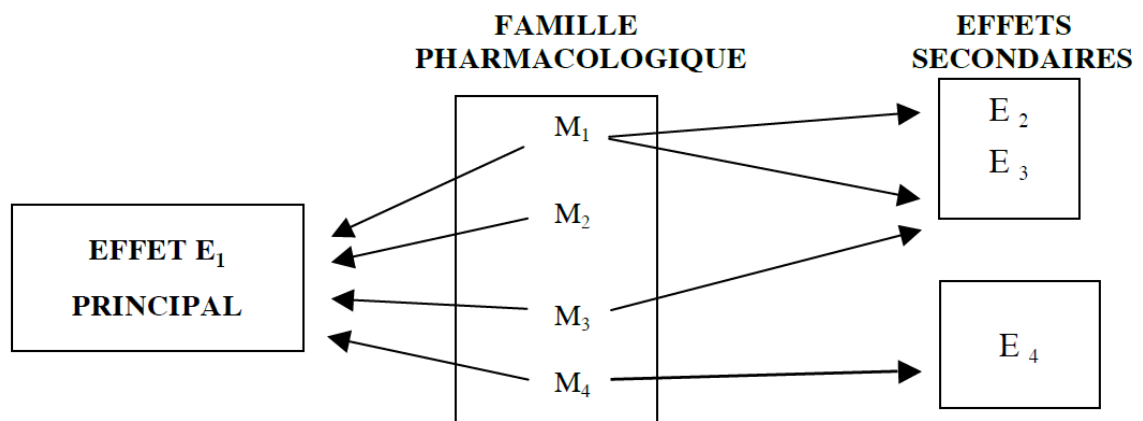


Figure 27. Familles pharmacologiques

Un médicament possède :

- un effet principal, utilisé en thérapeutique
- des effets secondaires (latéraux), qui sont utiles ou indifférents ou gênants ou nuisibles.

Un même effet pharmacodynamique peut être provoqué par plusieurs médicaments ; l'ensemble de ces médicaments constitue une famille pharmacologique.

2.2. Mécanismes d'action

Les structures sur lesquelles les médicaments agissent sont appelées « cibles ».

2.2.1. Action par fixation spécifique

Les médicaments agissent en général par fixation dans l'organisme. Cette fixation est spécifique du médicament et de son effet. Elle dépend étroitement de sa structure et de ses propriétés chimiques.

La structure moléculaire sur laquelle se fixe le médicament est appelée «récepteur».

Remarque : le terme de récepteur est ambigu. Il est pris ici dans une acception large, celle d'une molécule qui fixe un médicament, quelle que soit chimiquement ou fonctionnellement.

2.2.1.1. Fixation sur une protéine

Dans la plupart des cas, la fixation s'effectue sur une protéine. Il peut s'agir de :

- **récepteurs** : les récepteurs sont des protéines particulières qui font partie des systèmes physiologiques de communication intercellulaire (transmission de l'information).

Remarque : le terme récepteur est pris ici dans son sens restrictif

- **enzymes** : les médicaments peuvent :
 - activer ou inhiber le fonctionnement de l'enzyme (activateurs enzymatiques et inhibiteurs enzymatiques). Leur action peut être réversible ou irréversible.
 - détourner l'activité enzymatique. C'est le cas des anti-métabolites, faux substrats qui ressemblent au substrat physiologique et qui prennent sa place, mais les produits de la réaction sont inactifs.
- **transporteurs** : les transporteurs sont des protéines qui font passer les ions et les petites molécules physiologiques à travers les membranes cellulaires.

On distingue :

- des transports passifs (transporteurs, pour un ion ou une molécule dans un sens; symporteurs, pour plusieurs ions ou molécules ; antiporteurs, pour des échanges d'ions ou de molécules).
- des transports actifs, avec dépense d'énergie (pompes). C'est la cible de médicaments qui activent ou inhibent leur fonctionnement.
- **canaux ioniques** : les canaux sont des protéines transmembranaires permettant le passage sélectif de certains ions (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Cl^-) suivant le gradient électrochimique. Ils peuvent être ouverts ou fermés. Leur ouverture peut être provoquée par un ligand (excitation) ou par un potentiel d'action. Les effets

peuvent être la naissance d'un potentiel d'action, une contraction, une sécrétion ou inversement une inexcitabilité cellulaire

- **Protéines de la structure cellulaire** : comme la tubuline, rarement.

2.2.1.2. Fixation sur le génome

Des médicaments peuvent se fixer sur le génome (ADN, ARN, protéines associées).

Ils peuvent moduler l'expression génétique. Certains peuvent empêcher la prolifération cellulaire. Cette fixation peut être aussi responsable de l'effet mutagène ou cancérigène de certains d'entre eux.

2.2.1.3. Autres sites de fixation

Certains rares médicaments se fixeraient ailleurs que sur des protéines ou des nucléotides, par exemple sur les lipides membranaires ou les sels de calcium de la trame osseuse.

2.2.2. Sans fixation dans l'organisme

Ces médicaments agissent grâce à leurs propriétés physiques (volume, pouvoir couvrant, etc.) ou en modifiant celles du milieu extra cellulaire (pouvoir osmotique, équilibre acido-basique, équilibre électrolytique, etc.). Les structures chimiques peuvent être très différentes pour un même effet.

2.2.3. Action sur des organismes étrangers

Certains médicaments agissent sur des organismes pathogènes (bactéries, virus, parasites, champignons).

2.3. Théorie des récepteurs

2.3.1. Définition

On appelle « récepteur pharmacologique », une structure chimique fonctionnelle sur laquelle la fixation spécifique d'une molécule médicamenteuse provoque un stimulus qui est à l'origine de l'effet pharmacodynamique.

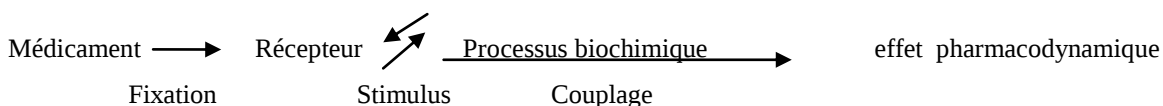
La notion de récepteur est généralisable à toute substance pharmacologique, physiologique ou xénobiotique qui se fixe sur une structure fonctionnelle de l'organisme. Ces substances sont des « **ligands** » dont les médicaments sont un cas particulier.

Dans tous les cas, le médicament est porteur d'une information qu'il transmet au récepteur. Celui-ci déclenchera alors l'effet cellulaire.

Un récepteur est une structure moléculaire qui reçoit, traite et transmet de l'information.

2.3.2. Stimulus et effet

En se fixant sur le récepteur, le ligand provoque une modification de celui-ci appelée «**stimulus**»



Entre le stimulus, dû à la fixation du médicament sur son récepteur et l'effet pharmacodynamique que l'on constate, la liaison est faite par un processus appelé «**couplage**» ou **transduction**.

Les substances qui en se fixant sur un récepteur entraînent **sa stimulation** sont appelées **agonistes** de ce récepteur.

2.3.3. Liaison et site actif

La liaison entre l'agoniste et le récepteur est due à des forces de faible intensité. Elle est labile et réversible. Elle a lieu au niveau d'une partie particulière de la macromolécule (récepteur), le « site actif ». Les configurations (structures, fonctions chimiques, charges électriques) de l'agoniste et du site actif se correspondent, ce qui assure la spécificité de la fixation.

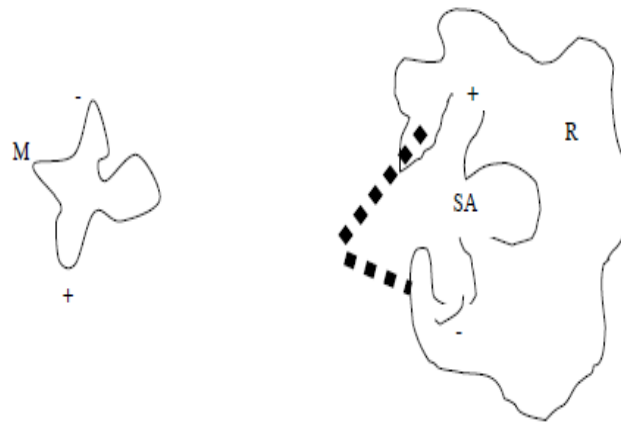


Figure 28. Récepteur et site actif - Un récepteur est une macromolécule dont le site actif constitue la partie à laquelle se lie le principe actif comme « la clé dans la serrure ».

R récepteur, SA site actif, M principe actif.

La fixation entraîne une modification structurale de la macromolécule, une « perturbation moléculaire », qui correspond au stimulus.

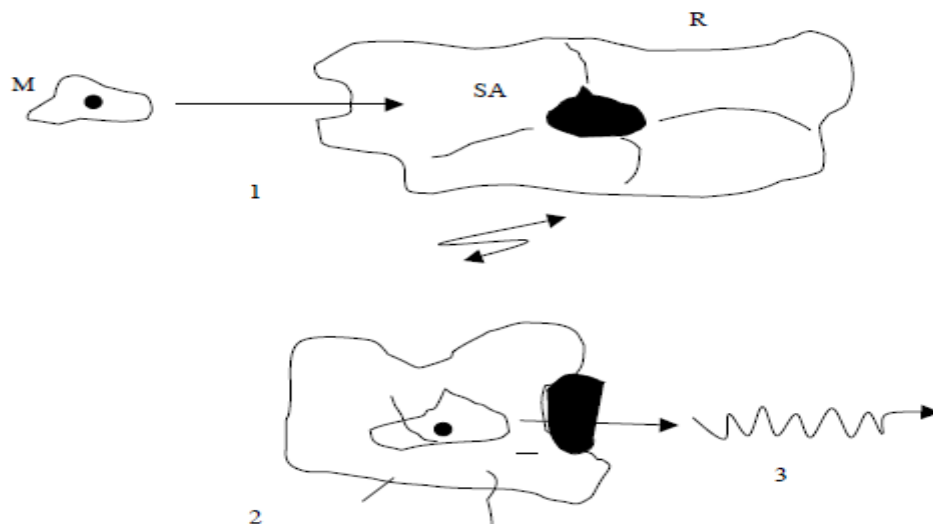


Figure 29. Stimulus - La fixation du principe actif sur le site actif (1) entraîne une modification conformationnelle du récepteur (2) qui rend celui-ci capable d'initier un processus biochimique, le couplage (3).

Remarque: la spécificité est souvent une notion relative. Si on augmente la concentration du médicament, il arrive qu'il se fixe aussi sur d'autres types de récepteurs.

2.3.4. Classification des récepteurs

Les récepteurs sont des macromolécules dont la fonction est de lier une molécule signal et de convertir cette interaction en un effet c'est-à-dire en une modification du fonctionnement cellulaire. Il existe des récepteurs de structures différentes, et la façon dont leur occupation sera transformée en un effet (transduction du signal) peut également être très diverse.

Les principaux types de récepteurs 4 grandes classes distinctes :

- Les récepteurs-canaux.
- Les récepteurs couplés aux protéines G.
- Les récepteurs - tyrosine kinase ou Récepteurs_Enzymes
- Les récepteurs intracellulaires ou Récepteurs nucléaires

2.3.4.1. Récepteurs à activité de canal ionique

Les canaux sont des protéines transmembranaires (figure 30) permettant le passage sélectif de certains ions (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Cl^-) suivant le gradient électrochimique. Ils peuvent être ouverts ou fermés. Leur ouverture peut être provoquée par un ligand (excitation) ou par un potentiel d'action. Les effets peuvent être la naissance d'un potentiel d'action, une contraction, une sécrétion ou inversement une inexcitabilité cellulaire.

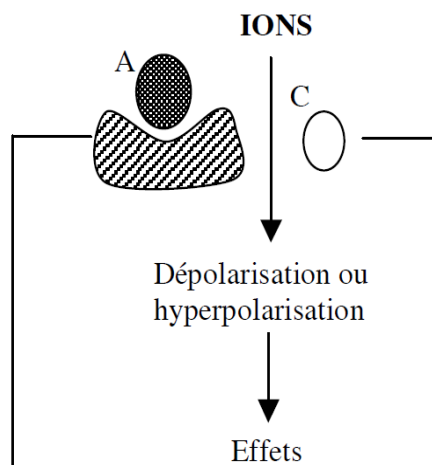


Figure 30. Les récepteurs-canaux - R récepteur, A agoniste, C canal.

2.3.4.2. Récepteurs couplés aux protéines G

Leur stimulation (fixation récepteur-ligand) induit une interaction du récepteur avec une protéine G (figure 31), ce qui induit ensuite une production de second messagers (AMPc, Ca^{++} ...). Parmi Les nombreux récepteurs qui appartiennent à cette famille, les récepteurs adrénergiques et dopaminergiques. Par exemple, la contraction musculaire : le récepteur β adrénergique est couplé à une protéine G la fixation du ligand provoque un changement de conformation de la protéine G, cela permet la transformation du AMP en AMPc. Une forte concentration en AMPc augmente la force de la contraction musculaire en provoquant l'ouverture du canal calcique.

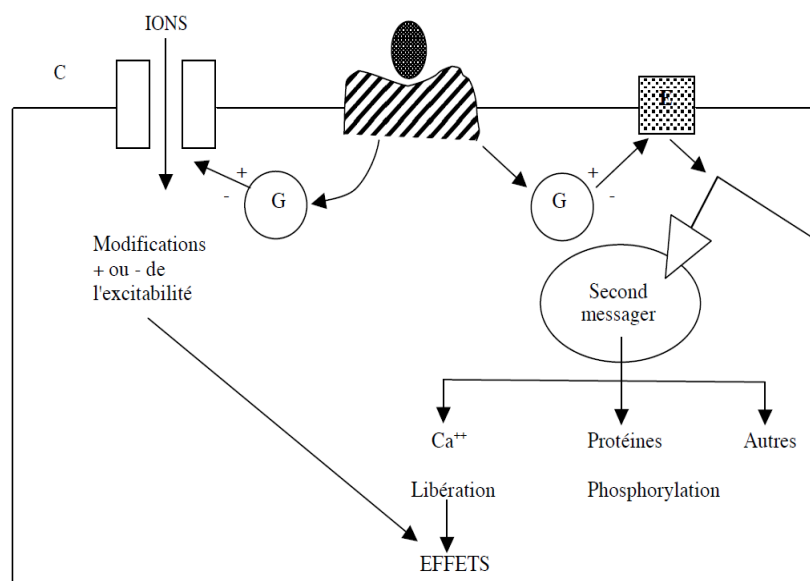


Figure 31. Récepteurs couplés aux protéines G- R récepteur, G protéines G, E enzyme, C canal.

2.3.4.3. Récepteur-enzymes

Ces récepteurs sont situés sur la face externe de la membrane cellulaire et sont associés à une enzyme intracellulaire à travers la membrane (figure 32). La fixation de l'agoniste entraîne une réaction enzymatique (récepteurs catalytiques).

Comme :

- Les **Récepteur à activité tyrosine kinase**, elle phosphoryle des protéines cibles sur des résidus tyrosine. Ces protéines peuvent être à leur tour des protéines de structure, des protéines de régulation, des enzymes, etc. Elles interviennent dans

la croissance et la différenciation cellulaire et aussi dans la régulation de la transcription des gènes. Exemples : insuline, facteurs de croissance.

- **Les Récepteur-enzymes à activité guanylylcyclase** qui synthétise un « second messenger », le GMP cyclique à partir du guanidyl triphosphate (GTP).

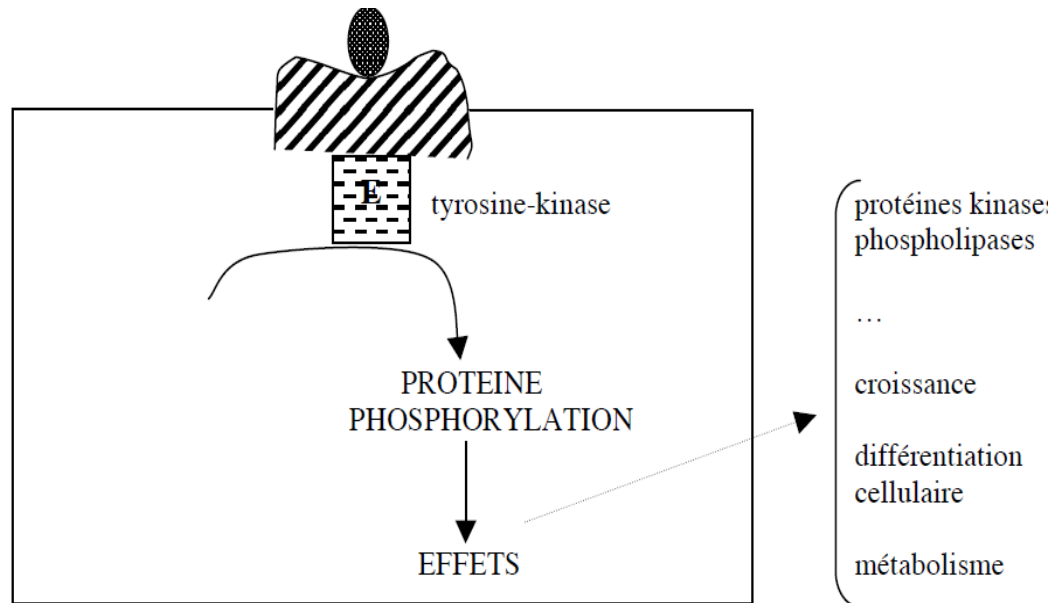


Figure 32. Récepteur-enzymes

2.3.4.3. Récepteurs nucléaires

Le récepteur est une protéine intranucléaire (le ligand doit donc pénétrer dans les cellules, puis dans les noyaux)(figure 33). Sa stimulation peut être suivie de la transcription de gènes, donc de la synthèse de protéines, de leur modulation ou de leur inhibition. L'effet est lent à se manifester, l'échelle des temps est celle des heures.

Exemple : hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, acide rétinoïque, vitamine D ; certains hypocholestérolémiants et antidiabétiques.

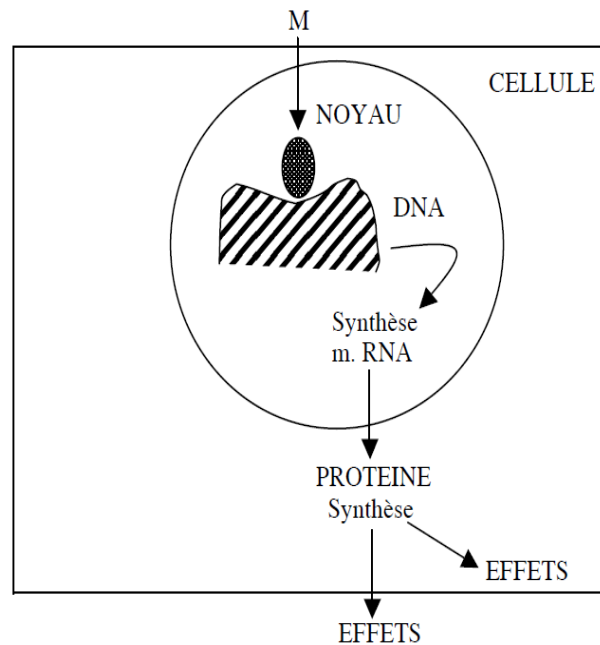


Figure 33. Récepteurs, type 4 - M médicament.

2.4. Relations doses-concentrations / récepteurs / effets

Un ligand lorsqu'il se fixe sur un récepteur peut l'activer (induction de l'effet) ou au contraire le bloquer. Lorsqu'il se fixe en le stimulant, on parle d'agoniste, lorsqu'il se fixe en le bloquant, on parle d'antagoniste.

La fixation d'un ligand sur son récepteur est par définition saturable, puisque limitée par le nombre des récepteurs sur lesquels il peut se fixer.

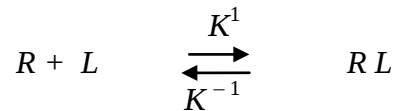
La fixation d'un agoniste sur un récepteur induit un effet spécifique de cette fixation. L'étude de cette action comporte deux aspects : la fixation sur le récepteur d'une part et l'induction de l'effet proprement dit d'autre part. L'interaction d'un ligand (et donc d'un médicament) avec son récepteur peut donc s'analyser d'une part en terme de caractéristiques de fixation sur le récepteur (relation ligand - récepteur) et d'autre part en terme de relation dose-effet (ou concentration - effet).

2.4.1. Etude des relations ligand - récepteur (Méthodes de liaison : Binding)

L'objectif principal en pratique de ces études de relations ligand-récepteur est la détermination de la capacité de fixation, appelée affinité, du ligand pour son récepteur. Elle est caractérisée par la concentration du ligand occupant 50 % des récepteurs (constante de dissociation : K_d) sur une préparation de membranes.

La constante de dissociation K_d peut être déterminée par deux types de méthodes d'étude de la liaison (binding) du ligand à son récepteur : les méthodes dites de saturation et les méthodes dites de déplacement.

Elles sont toutes les deux basées sur le fait que la fixation du ligand à son récepteur suit la loi d'action de masse :



L = ligand, R = récepteur libre, RL = complexe ligand- récepteur

K^1 = constance de vitesse d'association, K^{-1} = constance de vitesse de dissociation

A l'équilibre : selon la loi d'action de masse, les vitesses d'association et de dissociation sont égales :

$K^1 (L) (R) = (RL) K^{-1}$ () = concentrations

$$\frac{(L)(R)}{(RL)} = \frac{K^{-1}}{K^1} = K_d = \text{constance de dissociation}$$

K_d = concentration du ligand donnant une occupation de la moitié des récepteurs :

En effet dans ce cas $(R) = (RL)$ $(L) = K_d$

A- Méthodes de saturation

A partir d'un homogénat tissulaire ou d'une préparation cellulaire ou membranaire contenant le récepteur à étudier et une concentration connue d'un ligand radio-marqué (H^3 , C^{14} , I^{125} sont les isotopes radioactifs les plus utilisés), il est possible de définir une liaison dite totale qui correspond à la somme de la liaison du ligand à son récepteur (liaison spécifique à forte affinité) et à d'autres sites de liaison à faible affinité (liaison non spécifique).

La liaison non spécifique est mesurée en présence d'une quantité de ligand non radioactif (ligand froid) suffisante pour empêcher la fixation du ligand radioactif sur ses sites spécifiques. La liaison spécifique correspond à la différence entre liaison totale et liaison non spécifique et permet de définir l'affinité du ligand pour son récepteur.

A partir de cette expérience de saturation, il est possible de déterminer la constante de dissociation (K_d) qui traduit l'affinité du ligand pour ce récepteur et le nombre maximal de sites (B_{max}) de fixation. K_d et B_{max} sont obtenus à partir d'une transformation des données de la courbe de saturation, transformation dite de Scatchard, qui représente la

relation entre la quantité de ligand fixé de façon spécifique (au niveau du récepteur) et le rapport radioligand fixé / radioligand libre.

B-Méthode de déplacement

Les expériences de déplacement (ou de compétition) permettent de déterminer l'affinité d'un ligand non radioactif. Ceci permet d'étudier de nombreuses molécules non radio-marquées et de les comparer entre elles dans des conditions expérimentales strictement identiques. Les expériences de compétition sont réalisées en présence d'une concentration fixe de ligand radioactif et de concentrations croissantes du ligand non radioactif à étudier.

2.4.2. Etude de la relation dose (ou concentration) - effet des agonistes

La courbe dose-réponse (ou dose-action, dose-effet) est une donnée de base en pharmacologie : l'effet pharmacologique est mesuré pour des doses croissantes de la substance à étudier.

La recherche de la relation dose-réponse d'une molécule est indispensable pour obtenir une information quantitative sur l'importance de l'effet pharmacologique et pour comparer entre les différentes molécules.

L'effet pharmacologique est mesuré pour des doses croissantes de la substance à étudier, cet effet pharmacologique peut être mesuré sur des modèles in vivo (chez l'Homme ou chez l'animal) ou bien sur des organes isolés. L'effet mesuré peut être exprimé en valeur absolue ou en pourcentage de l'effet maximum.

La courbe dose (ou concentration)- effet est de nature hyperbolique (figure 34-35), (ou sigmoïde lorsque les concentrations ou les doses sont exprimées en coordonnées logarithmiques). Lorsque les doses (ou les concentrations au site d'action) sont infinies, on atteint l'effet maximal. La dose (ou la concentration) qui induit la moitié de l'effet maximal s'appelle la DE_{50} ou la CE_{50} .

Le modèle mathématique qui caractérise la relation dose (concentration) effet (E) est ainsi du type :

$$E = (\alpha E_{\max} \times D) / (D + DE_{50})$$

L'**efficacité** d'une substance est caractérisée par l' $E_{\max}$ qu'elle induit. Le coefficient α caractérise l'activité intrinsèque de l'agoniste, c'est à dire sa capacité à entraîner le couplage du récepteur à son effecteur.

- Lorsque α est égal à 1, l'activité intrinsèque est maximale, on parle d'agoniste entier.
- Lorsqu' α est inférieur à 1, on parle d'agoniste partiel.
- Plus grand sera l'effet maximal, plus efficace sera la substance.
- Ainsi, sur la figure, le médicament B est il moins efficace que le médicament A.

La DE_{50} ou la CE_{50} caractérisent la **puissance** d'une substance. Plus elle est faible, plus la puissance de la substance est grande. Ainsi, sur la figure 35, les substances C et D sont moins puissantes que les substances A et B.

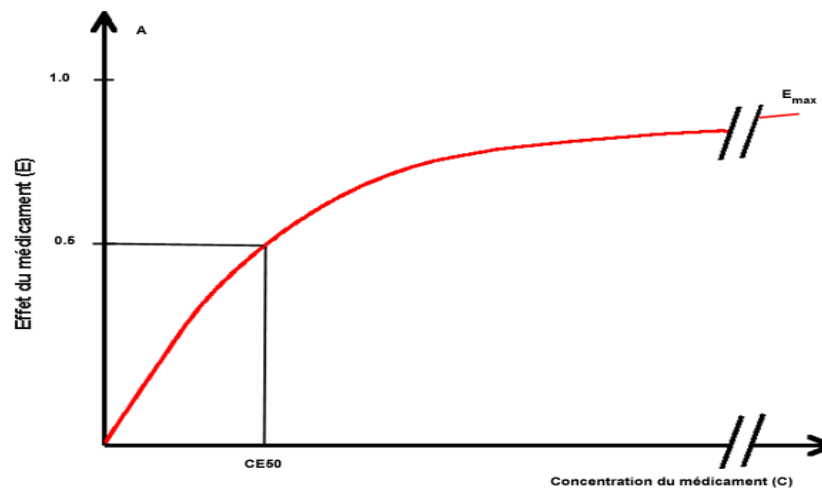


Figure 34. Courbe doses/effets, hyperbole de LANGMUIR.

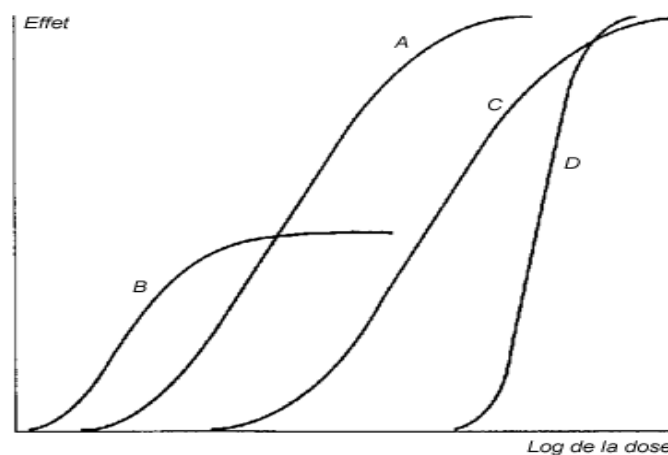


Figure 35. Courbes doses/effets de quatre principes actifs A,B, C, et D.

2.4.3. Etudes des antagonistes

Un antagoniste est une substance qui bloque le récepteur en se fixant soit au niveau du site d'action de la substance endogène (antagoniste compétitif), soit au niveau d'un site différent (antagoniste non compétitif). Un antagoniste déplace parallèlement vers la droite la relation dose effet d'un agoniste (c'est l'effet d'un antagoniste).

✓ antagoniste compétitif

Lorsque l'antagoniste se lie au niveau du récepteur sur le même site que l'agoniste, il y a compétition entre l'agoniste et l'antagoniste vis à vis du même site d'action. En présence de l'antagoniste, il est nécessaire d'augmenter la dose d'agoniste pour obtenir la même réponse qu'en son absence : les courbes dose-réponse sont déplacées (vers la droite) vers des concentrations d'agoniste plus élevées.

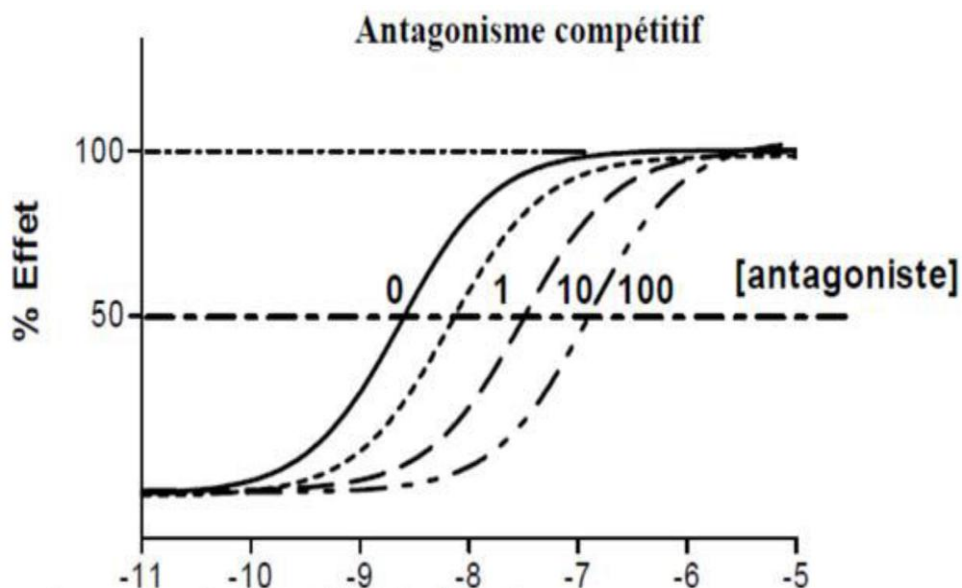


Figure 36. Courbes doses/effets en absence et en présences de différents concentrats d'antagoniste compétitif.

✓ antagoniste non compétitif

L'antagoniste se lie au niveau du récepteur sur un site distinct du site de liaison de l'agoniste (site allostérique) et entraîne des modifications conformationnelles du récepteur avec diminution de l'affinité du récepteur pour son agoniste ; l'association de l'antagoniste au récepteur est pratiquement irréversible. Dans ce cas on observe une diminution de l'efficacité de l'agoniste : l'antagonisme est insurmontable.

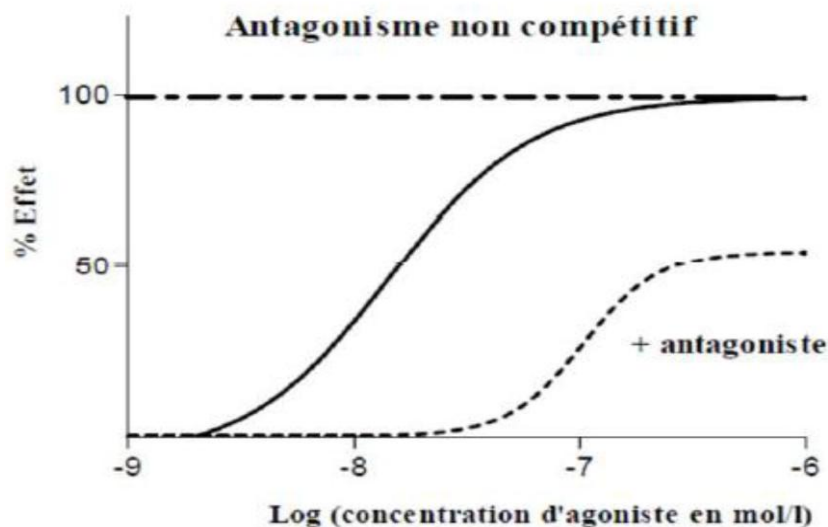


Figure 37. Courbes doses/effets en absence et en présence d'antagoniste non compétitif.

3. Développement d'un médicament

3.1. Synthèse de nouvelles structures chimiques

Le développement d'un médicament débute par la synthèse de nouvelles structures chimiques. Les substances aux structures plus complexes peuvent être extraites de plantes (glycosides cardiaques), de tissus animaux (héparine), de cultures de micro-organismes (pénicilline) ou de cellules humaines (urokinase) ou encore obtenues par recombinaison génétique (insuline humaine). Par ailleurs, il est d'autant plus facile de trouver une molécule nouvelle que l'on connaît la relation entre structure et activité.

3.2. Investigation préclinique

Le candidat médicament traverse tout d'abord une série de tests dits «précliniques». Ces essais sont des passages obligés avant toute étape de test sur l'homme.

3.2.1. Pharmacologie expérimentale

Le premier tri peut être effectué à l'aide des études pharmacologiques et biochimiques ou encore des expériences réalisées sur des cellules en culture, des tissus ou des organes isolés. Comme ces modèles ne peuvent jamais reproduire les événements complexes qui se déroulent dans un organisme vivant, les médicaments potentiels devront

être testés chez l'animal. L'étude chez l'animal indique d'abord si l'effet recherché a bien lieu.

3.2.2 Toxicologie

Les études de toxicité permettent de mettre en évidence la toxicité aiguë ou à long terme, les effets mutagènes, cancérogènes et les éventuelles anomalies du développement (effet tératogène).

3.2.3. Pharmacocinétique et métabolisme du médicament

Ces études portent sur des propriétés pharmaceutiques de la molécule telles que l'absorption, le métabolisme, la distribution et l'élimination. Mais elles ont aussi pour but de prouver les propriétés pharmacologiques. Si les résultats de ces études sont positifs, le médicament entre en phase d'essai clinique sur l'homme.

3.3. Les essais cliniques

Seul 1 médicament sur 10 candidats atteindra ce stade. Ces études se font en trois phases principales, qui doivent se dérouler selon les bonnes pratiques cliniques. Elles sont réalisées en milieu hospitalier ou en cabinet médical, sous la responsabilité de médecins experts : les investigateurs.

3.3.1. Phase 1 : tolérance ou innocuité

A ce stade, les essais sont menés principalement sur un nombre limité de sujets sains (10 à 40), sous strict contrôle médical. Ces volontaires peuvent être indemnisés. La molécule est testée sur une courte période.

L'objectif est :

- ✓ d'évaluer la sécurité d'emploi du produit, son devenir dans l'organisme, son seuil de tolérance ainsi que les effets indésirables
- ✓ de définir la dose et la fréquence d'administration qui seront recommandées pour les études suivantes.

3.3.2. Phase 2 : efficacité du produit sur de petites populations et recherche de dose

Le médicament éventuel est, pour la première fois, testé contre la maladie pour laquelle il est prévu chez un groupe de patients hospitalisés. Si la substance montre une efficacité réelle et peu d'effets secondaires, on passe alors aux études de phase 3.

3.3.3. Phase 3 : études « pivots »

L'action thérapeutique de la nouvelle substance est comparée chez un groupe de patients plus important, à celle du médicament de référence. Ces essais permettent de comparer l'efficacité thérapeutique de la molécule au traitement de référence (lorsque celui-ci existe) ou bien à un placebo (lorsqu' aucune thérapie n'existe).

Durant ces études cliniques, la majorité des molécules testées s'avère inutilisable. Sur 10 000 molécules synthétisées, seule une aboutira à un médicament. Ces trois étapes, quand elles sont franchies avec succès, vont être intégrées dans le dossier qui sera présenté aux autorités sanitaires pour recevoir, avec l'approbation officielle, l'autorisation de mise sur le marché.

3.4. Décision de mise sur le marché

La décision de mise sur le marché est prise après une demande officielle du laboratoire, par un organisme public (en Allemagne, la commission pour la santé). Le demandeur doit justifier, à l'aide de ses résultats expérimentaux, que les critères d'efficacité et d'innocuité sont remplis et quelles formes galéniques répondent aux normes de qualité. Après mise sur le marché, la nouvelle substance reçoit un nom commercial et il reste aux médecins à la prescrire et aux pharmaciens à la délivrer à leurs malades. Seuls les médicaments « originaux » traversent ces longues étapes. La version « générique » d'un médicament est une copie de la molécule d'origine. Elle ne repasse pas ce long cycle d'essais.

3.5. Pharmacovigilance

La sécurité du médicament est une préoccupation permanente des entreprises du médicament. Une fois le médicament dispensé aux malades, la pharmacovigilance l'accompagne pendant toute son existence et sera aussi l'objet de procédures rigoureuses.

Tout accident de santé lié à la prise de médicaments est signalé dans un délai obligatoire aux instances réglementaires. Les entreprises remettent également un rapport sur le suivi du médicament tous les six mois, pendant les deux premières années de la vie du médicament, puis tous les ans, pendant les trois années suivantes, et enfin tous les cinq ans, tant que le médicament est commercialisé.

Références

- Beaune, P. H., & Lorient, M. A. (2000). Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques: aspects métaboliques.
- Dangoumau, J. (2006). Pharmacologie Générale. Edition 2006. Département de pharmacologie-Université Victor Segalen Bordeaux 2, France.
- Fisher, M. B., Paine, M. F., Strelevitz, T. J., & Wrighton, S. A. (2001). The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug metabolism reviews*, 33(3-4), 273-297.
- Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J. M. A., Batt, A. M., ... & Souidi, M. (2006, November). Les cytochromes P450: métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 64, No. 6, pp. 535-548).
- Jeannesson, E. (2008). Analyse génétique et transcriptomique du transporteur ABCB1 en physiopathologie cardiovasculaire. Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré-Nancy 1, France.
- Kilford PJ, Stringer R, Sohal B, Houston J B and Galetin A (2009) Prediction of Drug Clearance by Glucuronidation From in Vitro Data: Use of Combined Cytochrome P450 and UDP-Glucuronosyltransferase Cofactors in Alamethicin-Activated Human Liver Microsomes. *Drug Metab Dispos*, 37:82-89.
- Lamotte, G. (2002). Interactions médicamenteuses: le rôle des cytochromes P450 (CYP). Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, France.
- Lechat, P. (2006). Pharmacologie. Université Pierre et Marie Curie, 139.
- Le Fol, V. (2015). Approche in vivo/in vitro du métabolisme de perturbateurs endocriniens chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France.
- Le Guellec, C., & Benz, I. (2011). Rôle des transporteurs dans l'élimination des médicaments et leurs effets indésirables. *La Lettre du pharmacologue* (Boulogne), 25(4), 130-137.
- Mathis, A. (2012). Le rôle des cytochromes P450 dans les interactions médicamenteuses et environnementales rencontrées à l'officine, Thèse de doctorat, Université de Lorraine, France.

- Micallef, S., & Bois, F. Y. (2004). Applications des modèles physiologiques à l'analyse de données de toxicocinétique. *Journal de la société française de statistique*, 145(3), 15-32.
- Picard, N. (2005). Etudes in vitro et in vivo du métabolisme du mycophénolate et des interactions métaboliques entre médicaments immunosuppresseurs, Thèse de doctorat, Université de Limoges, France.
- Proctor NJ, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. 2004. Predicting drug clearance from recombinantly expressed CYPs: Intersystem extrapolation factors. *Xenobiotica* 34:151–178.
- Rouguieg-Malki, K. (2010). Etudes des relations génotype-phénotype des enzymes du métabolisme et des transporteurs d'efflux des xénobiotiques, Thèse de doctorat, Université de Limoges, France.
- Rughoo, L. (2012). Etude de la relation entre le volume de distribution et le poids corporel chez les patients traités par amikacine, Thèse de doctorat, Université de Lorraine, France.