Résumé

Titre du travail: Mise en place d'un modèle cellulaire pour l'étude du métabolisme et des interactions médicamenteuses

L'étude du métabolisme et du transport des médicaments fait aujourd'hui partie intégrante du développement de nouveaux agents thérapeutiques. Il est en effet bien connu qu'un grand nombre d'interactions médicamenteuses pharmacocinétiques sont liées aux cytochromes P450 (CYP), et que ces interactions pouvaient avoir un impact clinique significatif. D'autre part, plusieurs enzymes de métabolisme de phase II, ainsi que certains transporteurs ont aussi été mis en lien avec la survenue d'interactions médicamenteuses.

Ainsi, il est utile de pouvoir prédire ce risque d'interaction avant l'administration d'un médicament chez le patient, ou encore pour expliquer un événement indésirable médicamenteux. Il existe aujourd'hui un grand nombre de modèles *in vitro* pour étudier le métabolisme, dont font partie les hépatocytes humains primaires, considérés comme « gold standard » pour l'étude du métabolisme. Cependant, ces différents modèles comportent tous certaines limites. Une lignée cellulaire prometteuse est récemment apparue sur le marché, il s'agit de la lignée HepaRG. Ces cellules sont issues d'une tumeur hépatique, et semblent exprimer les différents cytochromes, les enzymes de phase II et les transporteurs qui ont un impact sur les paramètres pharmacocinétiques des médicaments. Cette lignée est en outre pourvue d'un atout non négligeable sur les hépatocytes humains primaires, puisqu'elle est capable de proliférer rapidement et qu'elle est stable en culture. Ainsi, le but de ce travail a été d'optimiser le modèle cellulaire HepaRG pour permettre son utilisation dans le cadre d'études de métabolisme et d'interactions *in vitro*.

Il a tout d'abord été nécessaire de mettre au point une méthode d'évaluation de l'activité métabolique des cellules par une approche cocktail, et de valider une méthode de détection de la formation de métabolites par LC-MS-MS. Par la suite, divers milieux de culture ont été testés sur les HepaRG pour déceler les facteurs ayant un impact sur l'activité et l'expression des cytochromes. Ainsi, des milieux contenant des concentrations variables de DMSO (0, 0.5, 1, 1.5, 1.8 et 2%) et de facteurs de croissance (EGF et HGF) ont été testés, et une évaluation de l'activité et de l'expression des CYPs a été réalisée. Enfin, une fois le milieu de culture adéquat identifié, des essais d'inhibition et d'induction enzymatiques *in vitro* on été réalisés à l'aide de deux agents utilisés dans le cadre d'un traitement contre le HIV : le ritonavir et le cobicistat.

Un cocktail composé de 5 μM de midazolam (CYP3A4), 10 μM de phénacétine (CYP1A2), 50 μM de bupropion (CYP2B6), 2 μM de dextrométorphane (CYP2D6), 10 μM de flurbiprofène (2C9) et 50 μM de S-méphénytoïne (CYP2C19) a été choisi pour détecter l'activité de six

cytochromes d'intérêt. Une méthode analytique par LC-MS-MS destinée à mesurer la formation de métabolites de chacun des substrats a été developpée et a pu être validée.

Les différents milieux de culture testés ont permis de démontrer que le DMSO permettait d'augmenter de façon concentration-dépendante l'activité des différents CYPs, avec un impact marqué sur les CYP3A4 et 2B6. Le CYP2D6 n'a quant à lui pas été exprimé dans aucune des conditions testées. Les concentrations les plus élevées en DMSO testées ont par ailleurs montré une toxicité certaine sur les cellules, avec un déclin de la prolifération cellulaire. Les facteurs de croissance EGF et HGF n'ont quant à eux pas permis d'augmenter l'activité et l'expression des CYPs. En outre, la mesure de l'expression des CYPs, des enzymes de phase II et des transporteurs a montré un impact similaire de la composition du milieu sur leur expression. Ainsi, le milieu contenant 1.5% de DMSO sans supplémentation en facteurs de croissance spécifique a été choisi pour effectuer des essais d'inhibition ou d'induction des CYPs.

Les résultats obtenus pour les études d'inhibition des CYPs *in vitro* ont montré que le ritonavir et le cobicistat étaient pourvus d'un fort effet inhibiteur sur le CYP3A4, avec un effet moindre sur le CYP2B6. En outre, à concentration élevée, le cobicistat semblait aussi inhiber d'autres CYPs, contrairement aux données trouvées dans la littérature. Finalement, les essais d'induction enzymatique ont montré que le cobicistat n'était pas pourvu d'effet inducteur sur les CYPs.