

UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Besançon

***Modélisation du mécanisme de diffusion
d'une série de statines à travers la membrane
cellulaire : Approche biochromatographique et
thermodynamique***

THESE

Présentée à

l'UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques de l'Université de France Comté
par

SARR Fatimata Seydou

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Franche Comté en Sciences de la Vie et de la Santé

Soutenue le 30 Juin 2010

GUILLAUME Yves Claude	Université de Franche-Comté	Directeur de Thèse
SOUCHARD Jean-Pierre	Université de Toulouse	Rapporteur
BRIAND Loïc	Université de Bourgogne	Rapporteur
GHARBI Tijani	Université de Franche-Comté	

RESUME

La modélisation du passage membranaire des xénobiotiques tels que les statines est une nécessité afin d'évaluer leur biodisponibilité et leur pharmacocinétique. Elle se fait grâce à trois types de phases stationnaires remplissant une colonne chromatographique: une membrane artificielle immobilisée (MAI) pour étudier la diffusion passive, une phase stationnaire Oatp2 (Organic anion transporting polypeptide 2) et des phases stationnaires membranaires cellulaires (CMC) constituées d'extraits membranaires d'hépatocytes de rat surexprimés ou non en Oatp2 pour étudier la diffusion facilitée. Ces phases permettront d'analyser et de mieux comprendre les processus physico-chimiques impliqués dans le mécanisme de diffusion des xénobiotiques. Les résultats obtenus ont montré que les interactions gouvernant l'association des statines avec les biomembranes ou les transporteurs membranaires sont de type van der Waals, hydrogènes et électrostatiques. L'effet hydrophobe joue un rôle majeur sur cette association. Nous avons également montré que le magnésium augmente la diffusion passive des statines mais diminue par contre leur diffusion facilitée. La phase stationnaire Oatp2 modélise la diffusion des statines de manière optimale et similaire à la CMC. Cette nouvelle phase stationnaire Oatp2 plus simple à mettre au point expérimentalement, couplée à une colonne d'analyse séparative classique (type colonne C18) et à un spectre de masse (i.e., CLHP-Oatp2/CLHP-C18/SM) devrait permettre de faire des études de type « screening » pour trouver et développer des inhibiteurs nouveaux et spécifiques pour chaque membre de la sous-famille des Oatps.

Mots-clés : Statines, Membrane artificielle immobilisée (MAI), Organic anion transporting polypeptides (Oatps), Chromatographie membrane cellulaire (CMC), Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Modeling the statin diffusion mechanism across the cell membrane: biochromatography and thermodynamic approach

ABSTRACT

The xenobiotic cell membrane passage studies such as statins is needed to assess their bioavailability and pharmacokinetics. It is done through three types of stationary phases filling a chromatographic column: an Immobilized Artificial Membrane (IAM) to study passive diffusion, an Oatp2 stationary phase (Organic anion transporting polypeptide 2) and cell membrane stationary phases (CMSP) (i.e. constituted with extracts membrane of rat hepatocytes Oatp2 overexpressed or not to study facilitated diffusion). These studies will analyze and better understand the physical and chemical processes involved in the xenobiotic diffusion mechanism. The results showed that the interactions governing the statin association with biological membranes or transporters are van der Waals, hydrogen and electrostatic bonds. The hydrophobic effect plays a major role in this association. We have also shown that magnesium increases the station passive diffusion but decreases their facilitated diffusion. The Oatp2 stationary phase models the statin diffusion optimal and similar to the CMC. This new Oatp2 stationary phase easier to develop experimentally, coupled with an analytical column separate classic (type C18) and a mass spectrum (i.e., HPLC-Oatp2/HPLC-C18/SM) should serve to make studies such as "screening" to find and develop new and specific inhibitors for each member of the Oatp subfamily.

Keywords: Statins, Immobilized artificial membrane (IAM), Organic anion transporting polypeptides (Oatps), Cell membrane stationary phase (CMSP), High-performance liquid chromatography (HPLC)

Ce travail de recherche a été effectué au sein du Laboratoire de Chimie Analytique en collaboration avec le Laboratoire de Biologie Cellulaire (2SBP/EA 4267) sous la direction et la supervision de Monsieur Yves Guillaume, Professeur de Chimie Analytique à l'Université de Franche-Comté, de Madame Claire André, HDR et de madame Lysiane Richert, Professeur de Biologie Cellulaire à l'Université de Franche-Comté. Je tiens vivement à remercier mon directeur de Thèse, Monsieur Yves Guillaume mais aussi Madame Claire André qui n'ont ménagé aucun effort pour l'aboutissement de ce travail de par leur encadrement, leur disponibilité et leur encouragement. Ils ont la prouesse de faire sortir le mieux de moi-même. Grâce à eux, la chimie analytique et à la Biochromatographie ne seront plus un secret dans mon monde scientifique. Ces remerciements sont également destinés à Madame Lysiane Richert, Madame Hélène Martin et aux personnels du laboratoire de Biologie Cellulaire. Leurs conseils m'ont été précieux dans la correction de la partie biologique et dans l'élaboration de ce travail.

Dans mes remerciements, je ne pourrai jeter aux calendres grecques ceux que j'attribue à Monsieur Alain Berthelot, Professeur de Physiologie à l'Université de Franche-Comté. Je peux dire sans me tromper que c'est grâce à lui, et Monsieur Yves Guillaume, que je vais soutenir cette thèse pour le grade de docteur en Sciences de la Vie et de la Santé. Il a été d'un soutien moral très important dans l'avancement de ma thèse.

Je ne manquerai pas de remercier Anne Marie Winninger mais surtout Madame Mireille Thomassin pour sa gentillesse, sa disponibilité, son dévouement à la chromatographie, autant d'atouts qui m'ont été précieux tout au long de ma thèse. Le cadre exceptionnel du laboratoire et l'entente au sein de l'équipe ne sont pas en reste. Chaque esprit scientifique y converge apportant ainsi une aide précieuse à la recherche que j'ai menée et aux questions que je me suis posées.

Je ne saurai terminer sans remercier mes chers parents qui se sont tant sacrifiés pour ma réussite, mes frères et sœurs, mon mari, mes beaux-parents, la communauté sénégalaise de

Besançon et tous mes amis. Ils ont tous été là pour me souffler le vent du courage, de la persévérance, de l'abnégation, de la rigueur. Leur soutien a été indispensable pour affronter le très difficile monde de la recherche. Je tiens également à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette thèse, qui selon mon humble avis est ma contribution à la pierre de l'édifice scientifique. Un grand merci à toutes et à tous.

A ma maman, à mon papa,

A mon mari,

A toute ma famille

PRINCIPALES ABREVIATIONS

A : Surface membranaire traversée par le flux de diffusion

ADP : Adénosine diphosphate

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

Ala : Alanine

ALAT : Alanine Amino Transférase

Arg : Arginine

ARNm : Acide Ribonucléide messenger

ASCOT-LLA : Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm

Asp : Aspartate

ATP : Adénosine Triphosphate

AVC : Accidents Vasculaires Cardiaques

BCRP : Breast Cancer Resistance Protein ou protéine de résistance au cancer du sein

BSA : Sérum Albumine Bovine

BSEP : Bile Salt Export Pump ou pompe d'exportation des sels biliaires

c : concentration

CARE : Cholesterol and Recurrent Events

CEE : Compensation Enthalpie Entropie

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CMC : Chromatographie Membrane Cellulaire

CMC_{Oatp2+/-} : Extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2

CI50 : Concentrations inhibant 50% l'activité de l'enzyme HMGR

CYP : Cytochromes P450

Cys : Cystéine

C_{x_{ext}} : Concentration Extérieure du Xénobiotique

C_{x_{int}} : Concentration Intérieure du Xénobiotique

D : Coefficient de diffusion membranaire

DEX : Dexaméthasone

DREES : Direction de la Recherche des Etudes de l'Evaluation et des Statistiques

DSC : *N,N'*-Disuccinimidyl carbonate

e : Epaisseur de la membrane biologique

E_{Debye} : Energie de Debye : effets d'orientation

E_{Keesom} : Energie de Keesom : effets d'orientation

E_{London} : Energie de London : effets de dispersion

ϵ_0 : Constante diélectrique du vide

F_{ext} : Fluorescence à l'extérieur du liposome

F_{int} : Fluorescence à l'intérieur du liposome

FXR : Farnesoid X receptor ou récepteur farnésoïde X

ΔG^\bullet : Enthalpie libre standard ΔG° du processus de fixation du xénobiotique sur la phase stationnaire

$\Delta G^\bullet\beta$: Enthalpie libre standard ΔG° du processus de fixation du xénobiotique sur la phase stationnaire à la température β

Glu : Glutamate

GSH : Glutathion

HDL-C : High Density Lipoprotein Cholesterol ou cholestérol à lipoprotéine de haute densité

HMG-CoA : HydroxyMéthylGlutaryl-Coenzyme A

HMGR : HydroxyMéthylGlutaryl-CoA Réductase

HNF : Hepatocyte Nuclear Factor ou facteur nucléaire de l'hépatocyte

ΔH^\bullet : Enthalpie

J : Flux de diffusion du xénobiotique à travers la membrane biologique

k' : Facteur de rétention

K : Coefficient de partage membranaire

k ou *h* : Constante de Planck

k'_w : Facteur de rétention à 100% d'eau

LDL-C : Low Density Lipoprotein Cholesterol ou cholestérol à lipoprotéine de faible densité

Leu : Leucine

log P : Coefficient de partage octanol/eau

LST : Liver Specific Transporteur ou transporteur spécifique du foie

Lys : Lysine

MAI : Membrane Artificielle Immobilisée

MDR : Multiple Drug Resistance ou résistance aux xénobiotiques

MG : MéthylGlycolate

n_{Ca²⁺} : Nombre d'ion calcium impliqué dans l'association xénobiotique-phase membranaire

n_{Mg²⁺} : Nombre d'ion calcium impliqué dans l'association xénobiotique-phase membranaire

NTCP : Sodium-Taurocholate Co-transporting Polypeptide

OATs : Organic Anion Transporters ou transporteurs d'anions organiques

OATPs : Organic Anion Transporting Polypeptides ou transporteurs polypeptides d'anions organiques

OCTs : Organic Cation Transporters ou transporteurs de cations organiques

OMS : Organisation Mondiale du Santé

P : Coefficient de perméabilité mesurant la vitesse à laquelle la solution traverse la membrane

PBS : Phosphate Buffer Sodium ou tampon phosphate

PCN : Pregnenolone-16 α -carbonitrile

PC : Phosphatidylcholine

PPAR α : Peroxisome Proliferator Activated Receptor α

PCa²⁺ : - logarithme de la concentration en calcium

P-gp : Glycoprotéine P

PMg²⁺ : - logarithme de la concentration en magnésium

4 S : Scandinavian Simvastatin Survival Study

Ser : Sérine

SHP 1 : *Small Heterodimer Partner 1* ou *petit partenaire hétérodimère 1*

SLC : *Solute Carrier*

SNPs : *Single Nucleotide Polymorphisms* ou *polymorphisme d'un seul nucléotide*

STCOOH : *Statines*

T : *Température*

t₀ : *Temps mort ou temps que met un soluté n'ayant aucune affinité pour la phase stationnaire*

TMs : *Domaines Transmembranaires*

tr : *Temps de rétention ou temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué*

v : *Fréquence électronique d'absorption*

α : *Polarisabilités électriques*

μ : *Moments dipolaires des molécules considérées*

v : *Nombre de molécules d'eau ordonnées exclues de l'interface xénobiotique-phase stationnaire*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	13
A. BIBLIOGRAPHIE.....	17
A.1. Maladies cardiovasculaires.....	18
A.1.1. Généralités	18
A.1.2. Facteurs de risque	18
A.1.2.1. Hypercholestérolémie	19
A.1.2.1.1. Généralités	19
A.1.2.1.2. Traitement	20
A.2. Statines.....	20
A.2.1. Historique	20
A.2.2. Structure moléculaire	22
A.2.3. Mécanisme d'action	25
A.2.4. Données pharmacologiques et pharmacocinétiques	28
A.2.5. Effets indésirables	30
A.3. Membrane plasmique.....	31
A.3.1. Structure	31
A.3.1.1. Foie et hépatocyte	33
A.3.2. Fonction	35
A.3.2.1. Diffusion simple ou passive	37
A.3.2.1.1. Méthodes d'étude	39
A.3.2.1.1.1. Liposomes	40
A.3.2.1.1.2. Membranes Artificielles Immobilisées	42
A.3.2.2. Diffusion facilitée	42
A.3.2.2.1. Méthodes d'étude	43
A.3.2.3. Transport actif	44
A.4. Transporteurs polypeptides d'anions organiques ou Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs).....	45
A.4.1. Généralités	45
A.4.2. Structure	47
A.4.3. Fonction	50
A.4.4. Régulation de l'expression des OATPs	51

B. MODELE D'ETUDE.....	54
B.1. Chromatographie membranaire.....	55
B.1.1. Membrane Artificielle Immobilisée (MAI)	56
B.1.2. Chromatographie Membrane Cellulaire (CMC)	60
B.2. Grandeurs chromatographiques.....	62
B.2.1. Facteur de rétention (k')	62
B.2.2. Courbes de van't Hoff	63
B.2.3. Compensation Enthalpie-Entropie (CEE)	64
B.2.4. Principales interactions gouvernant l'association xénobiotique-phase stationnaire	65
B.2.4.1. Interactions primaires	66
B.2.4.1.1. Interactions hydrophobes	66
B.2.4.1.2. Interactions coulombiennes	68
B.2.4.2. Interactions secondaires	69
B.2.4.2.1. Interactions de van der Waals	69
B.2.4.2.2. Interactions hydrogènes	70
B.2.4.2.3. Répulsions stériques	71
C. MATERIEL ET MODES OPERATOIRES.....	72
C.1. Matériel.....	73
C.1.1. Appareillage	73
C.1.2. Réactifs et molécules étudiées	73
C.2. Modes opératoires.....	74
C.2.1. Etude de la fixation des statines sur la MAI	75
C.2.1.1. Evaluation de la lipophilie : concept de $\log k'_{w-MAI}$	75
C.2.1.2. Effet du pH	76
C.2.1.3. Effet du magnésium et du calcium	76
C.2.2. Etude de la fixation des statines sur l'Oatp2	77
C.2.2.1. Immobilisation « <i>in-situ</i> » de l'Oatp2	77
C.2.2.2. Effet du magnésium	78
C.2.3. Etude de la fixation des statines sur un extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2	79
C.2.3.1. Réactifs et matériel	79

C.2.3.2. Culture <i>in vitro</i> et induction de l'Oatp2 hépatocytaire	80
C.2.3.3. Préparation de l'extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2	81
C.2.3.4. Immobilisation « <i>in-batch</i> » de l'extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2 sur des particules de silice	82
D. RESULTATS ET DISCUSSION.....	85
D.1 Analyse de l'association des statines avec la Membrane Artificielle Immobilisée (MAI).....	86
D.1.1. Etude de la diffusion passive des statines	87
D.1.2. Lipophilie moléculaire des statines	88
D.1.3. Etude de l'effet du pH sur la diffusion passive des statines	91
D.1.3.1. Analyse des données thermodynamiques	96
D.1.4. Etude de l'effet du magnésium et du calcium	96
D.1.4.1. Effet du magnésium sur la diffusion passive des statines	102
D.1.4.2. Effet du calcium sur la diffusion passive des statines	109
D.2. Analyse de l'association des statines avec l'Oatp2 : Effet du magnésium.....	114
D.3. Analyse de l'association des statines avec un extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2 : Modèle de la CMC... ..	120
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	129
REFERENCES.....	132
ANNEXE.....	148
LISTE DES FIGURES.....	152
LISTE DES TABLES.....	155

INTRODUCTION GENERALE

La membrane plasmique permet d'assurer la reconnaissance des signaux et des xénobiotiques provenant du milieu extracellulaire grâce aux protéines spécifiques qui la constituent. Elle protège également la cellule de son environnement tout en maintenant les échanges avec celui-ci. Cette membrane plasmique présente une perméabilité sélective. En effet, certains xénobiotiques la traversent plus facilement que d'autres. Le transport des xénobiotiques non-macromoléculaires se fait soit par (i) la diffusion simple ou passive, (ii) la diffusion facilitée ou (iii) le transport actif. L'étude de ces mécanismes de passage des xénobiotiques à travers la membrane cellulaire est extrêmement importante notamment pour évaluer leur biodisponibilité et leur pharmacocinétique. En effet, l'efficacité d'un médicament dépend de sa capacité à traverser la membrane cellulaire et à atteindre son site actif. Ces paramètres influencent aussi bien l'activité pharmacologique du médicament que sa toxicité au niveau de l'organisme.

Actuellement plusieurs techniques d'analyse *in vitro* du passage membranaire des xénobiotiques se sont développées. Parmi ces dernières, la biochromatographie est une nouvelle méthode de reconnaissance moléculaire. Elle consiste à mimer la perméabilité membranaire du xénobiotique à étudier à partir de phospholipides greffés sur un support en silice formant ainsi une Membrane Artificielle Immobilisée (MAI). Une MAI a ainsi été constituée par le greffage par liaison covalente d'un groupement de phosphatidylcholine (PC) sur des particules de silice propylamine constituant ainsi la phase stationnaire. Ce type de membrane permet d'analyser tout particulièrement le mécanisme de passage par diffusion passive des xénobiotiques ciblés.

Cependant l'utilisation de la MAI trouve ses limites dans le cas où le xénobiotique diffuse à travers la membrane cellulaire en se liant à des protéines membranaires (i.e. diffusion facilitée du xénobiotique). Ainsi l'influence de ces protéines sur le mécanisme de passage membranaire des xénobiotiques doit être visualisée.

Dans cette optique de recherche, les xénobiotiques cibles utilisés pour étudier les mécanismes de passage membranaire consistent en une série de statines (pravastatine, mévastatine,

atorvastatine, simvastatine et fluvastatine). Les statines sont une classe pharmaceutique utilisée dans le traitement de l'hypercholestérolémie. En effet, ces médicaments pénètrent dans les hépatocytes et inhibent la biosynthèse du cholestérol par inhibition de l'enzyme HMG-CoA (Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A) réductase. L'hypercholestérolémie est reconnue depuis la moitié du 20^{ème} siècle comme le facteur de risque majeur dans les maladies cardiaques, première cause de mortalité et de handicap dans la plupart des pays développés. En France et dans certains pays industrialisés, les modifications des habitudes alimentaires observées ces dernières années, alimentation de type « snack » au détriment de celle traditionnelle et variée riche en produits végétaux, sont à l'origine de l'augmentation des cas d'obésité et d'hypercholestérolémie.

L'entrée rapide des statines dans les hépatocytes est régulée par la diffusion passive mais également par des protéines membranaires telles que les OATPs (Organic anion transporting polypeptides). Ces transporteurs se trouvent dans la membrane plasmique des hépatocytes et constituent dans notre recherche les protéines membranaires étudiées pour analyser la diffusion facilitée des statines.

L'objectif principal de notre travail de recherche est :

- a) La mise au point de supports chromatographiques constitués de particules de silice sur lesquelles sont immobilisées des phospholipides ou des protéines membranaires OATPs impliquées dans le transport facilité des statines. Elle sera une étude préalable afin de mieux définir les contours du mécanisme de passage membranaire des statines.
- b) Les données obtenues par ces colonnes chromatographiques seront comparées à des données biologiques sur des extraits membranaires surexprimés ou non en OATPs immobilisés sur des particules de silice.

Ces nouvelles colonnes biochromatographiques permettront l'analyse phénoménologique de la perméabilité membranaire du xénobiotique à l'aide de descripteurs physico-chimiques tels que le pH, la température ou la force ionique.

Notre travail de recherche est subdivisé en quatre grandes parties :

- La première partie de cet exposé est consacrée à une analyse bibliographique sur les maladies cardiovasculaires, l'hypercholestérolémie, les statines, la membrane plasmique, le foie, les OATPs et les différentes méthodes d'étude de la perméabilité membranaire.
- La deuxième partie de ce travail présente les modèles biochromatographiques utilisés (la Membrane Artificielle Immobilisée, MAI et la Chromatographie Membrane Cellulaire, CMC). Les différentes grandeurs chromatographiques telles que les facteurs de rétention, les données thermodynamiques ainsi que les principales interactions impliquées dans l'association entre un xénobiotique et une phase stationnaire, sont également définies.
- La troisième partie est consacrée à la partie expérimentale de notre travail. Elle décrit le matériel, les réactifs utilisés et les conditions opératoires pour les analyses chromatographiques et biologiques. Cette partie décrit également la mise au point de nouvelles colonnes biochromatographiques telles que la colonne Oatp2 (un membre des OATPs) constituée d'une phase stationnaire silice propylamine greffée avec l'Oatp2 et des colonnes CMC constituées d'extraits membranaires surexprimés ou non en Oatp2 immobilisés sur des particules de silice.
- Dans la quatrième et dernière partie, les résultats expérimentaux sont analysés. Les principales associations impliquées dans le mécanisme d'association entre les statines et les différentes phases stationnaires (i.e. les diffusions passive et facilitée) sont déterminées. L'influence de différents paramètres physico-chimiques tels que le pH, la température, la force ionique est également analysée.

***A.* BIBLIOGRAPHIE**

A.1. Maladies Cardiovasculaires

A.1.1. Généralités

Les maladies cardiovasculaires restent la première cause de mortalité et de handicap dans la plupart des pays développés. Elles représentent en France (environ 32% des décès soit 180000 décès par an) et dans le monde entier, un enjeu majeur de santé publique (AFSSAPS, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé 2005). Selon l’OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 29,2% des décès globaux soit 16,7 millions de décès par an sont dus aux maladies cardiovasculaires et sous ses différentes formes. Si les tendances continuent ainsi ce nombre atteindra les 20 millions de décès en 2015 (décès causés principalement par les crises cardiaques). En effet, les maladies cardiovasculaires englobent aussi bien les maladies coronaires cardiaques (crises cardiaques), les maladies cérébrovasculaires, l’athérosclérose, les cardiopathies ischémiques, les thromboses veineuses profondes.

A.1.2. Facteurs de risque

Les maladies cardiovasculaires sont causées par des facteurs de risque bien identifiés et sur certains, il est possible d’intervenir efficacement. Parmi ces facteurs de risque, il y a ceux très connus tels que le tabagisme, l’hypertension artérielle, l’hypercholestérolémie, l’obésité, le diabète sucré.

A.1.2.1. Hypercholestérolémie

A.1.2.1.1. Généralités

Le cholestérol est un constituant essentiel des membranes plasmiques. Il est nécessaire dans la formation de certaines hormones et dans la croissance des cellules. C'est un composant vital dont l'organisme a besoin. En effet, il joue un rôle clé dans la formation de la mémoire et constitue ainsi la principale molécule organique du cerveau. Il existe plusieurs types de cholestérol :

➤ LDL-cholestérol ou cholestérol à lipoprotéine de faible densité (LDL-C): Il est souvent dénommé « mauvais cholestérol ». En effet, des niveaux élevés dans le sang peuvent provoquer des accumulations de dépôts adipeux dans les artères et vaisseaux sanguins et ainsi entraîner l'athérosclérose et des accidents vasculaires cardiaques (AVC).

➤ HDL-cholestérol ou cholestérol à lipoprotéine de haute densité (HDL-C): Souvent appelé le « bon cholestérol », il aide à diminuer les dépôts de LDL-cholestérol dans les artères. Ainsi des niveaux élevés de ce cholestérol peuvent aider à prévenir l'athérosclérose et les maladies cardiaques.

L'hypercholestérolémie est causée par des niveaux élevés de LDL-C dans le sang. Elle est, et restera un des risques cardiovasculaires les plus importants à combattre (BALLIGAND 2004). En effet, selon la Direction de la Recherche des Etudes de l'Evaluation et des Statistiques (DREES) la part des décès liés à l'hypercholestérolémie varie de 6,4% en France, 8,9% en Espagne, 11,1% en Italie, 13,3% au Royaume-Uni et 15,1% en Allemagne (DREES 2006). L'augmentation du taux de LDL-C dans le sang peut être génétique, on parle dans ce cas d'hypercholestérolémie familiale, ou provoquée par un surplus des apports extérieurs en cholestérol. En effet, les modifications des habitudes alimentaires en France et dans certains pays industrialisés, alimentation de type « snack » au détriment de celle traditionnelle et variée riche en produits végétaux, sont à l'origine de l'augmentation des cas d'obésité et

d'hypercholestérolémie. La prise en charge thérapeutique des patients présentant une hypercholestérolémie ou dyslipidémie est soumise à des recommandations (AFSSAPS 2005).

A.1.2.1.2. Traitement

Le traitement de l'hypercholestérolémie est en première intention un régime alimentaire pour diminuer les apports en cholestérol exogène. Cependant, si la rectification du profil lipidique est difficile avec un changement des habitudes alimentaires, des médicaments pour diminuer les taux de cholestérol dans le sang sont alors prescrits aux patients (AFSSAPS 2005). Parmi ces médicaments, appelés hypocholestérolémiants, on peut recenser les résines, les fibrates, la niacine ou acide nicotinique, les statines.

A.2. Statines

Les statines, prescrites pour 20 millions de patients, ont prouvé leur effet bénéfique dans le traitement de l'hypercholestérolémie, la prévention secondaire et même primaire des maladies cardiovasculaires. Cette classe de médicaments regroupe la cérvastatine, la pravastatine, la mévastatine, l'atorvastatine, la simvastatine, la fluvastatine, la lovastatine et la rosuvastatine.

A.2.1. Historique

Le premier membre identifié de cette nouvelle classe de composés pharmaceutiques est la compactine ou mévastatine isolée d'une culture fermentaire fongique du *Penicillium citrinum*. Cette molécule a été découverte en 1976 par Akira Endo, un biochimiste et microbiologiste japonais. Elle fut la première molécule à être étudiée dans le début des années 1980. Par la

suite, d'autres molécules de la même famille ont été découvertes. La lovastatine ou mévilonin isolée à partir du champignon *Aspergillus terreus* devient ainsi la première statine à être commercialisée. La simvastatine et la pravastatine résultent de modifications chimiques de la molécule de lovastatine. En effet, la simvastatine possède un méthyle de plus en position α de l'ester que la lovastatine alors que la pravastatine possède un groupement hydroxyle de plus en position 9 par rapport à la molécule de lovastatine. La fluvastatine est la première statine entièrement synthétique et possède des caractéristiques physico-chimiques semblables avec celles de la lovastatine et de la simvastatine. Les statines ont été commercialisées à la fin des années 1980 pour leur activité hypocholestérolémiante reconnue. Depuis la découverte de cette classe pharmaceutique, d'autres types de statines ont été fabriqués, la dernière étant la rosuvastatine. Elle est la 6^{ème} statine découverte et commercialisée en France. Cependant, la cérvastatine introduite en 1998 a été retirée du marché 3 ans plus tard à cause de ses multiples effets secondaires. Plusieurs études cliniques ont été effectuées pour démontrer les effets bénéfiques des statines sur les diminutions du taux de cholestérol sanguin, de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaire. Parmi ces études, on peut citer :

➤ En prévention primaire, l'étude WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study) dont 6595 hommes et femmes étaient traités avec de la lovastatine

➤ En prévention secondaire, les études 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study) avec 4444 hommes et femmes traités avec de la simvastatine ; ASCOT-LLA (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm) 10305 personnes traitées avec de l'atorvastatine et CARE (Cholesterol and Recurrent Events) 4159 personnes traitées avec de la pravastatine

D'après une étude de la DREES, la France et le Royaume-Uni occupent la première place dans le marché européen des statines (DREES 2006). Les statines dominent le marché pharmaceutique français et en 2004, elles ont représenté la classe pharmaceutique la plus remboursée soit près d'un milliard d'euros. Ainsi la prescription de ces médicaments est soumise à des critères fins et stricts pour limiter leur consommation abusive et doit se faire

dans un cadre précis selon les recommandations de l'AFSSAPS. En effet, les statines sont prescrites à des centaines de millions de patients (LAW et *al.* 2006). Depuis leur découverte jusqu'à présent, les statines ne cessent de se faire découvrir de nouvelles vertus thérapeutiques dans d'autres maladies telles que l'Alzheimer, les rhumatismes, l'ostéoporose, le risque de cataracte et bien d'autres d'où leur nom de « l'aspirine » du 21^{ème} siècle.

A.2.2. Structure moléculaire

Les statines peuvent être subdivisées en deux groupes en fonction de leur structure moléculaire : les statines de type I et celles de type II (figure 1).

➤ Les statines de type I regroupent la pravastatine, la mévastatine, la simvastatine et la lovastatine.

➤ Les statines de type II regroupent la fluvastatine, l'atorvastatine, la cérovastatine, et la rosuvastatine.

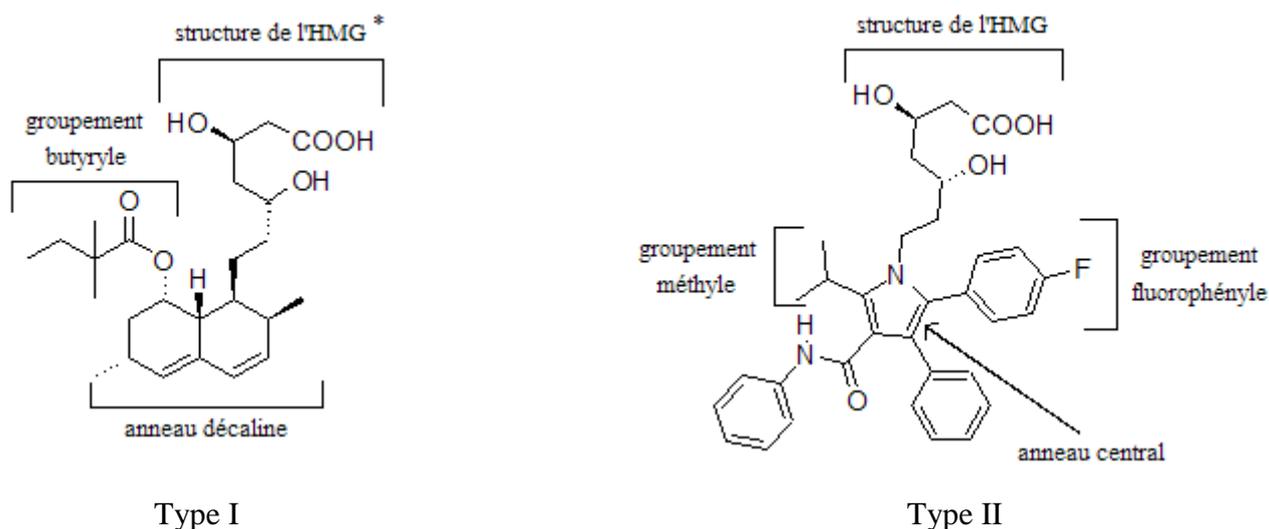


Figure 1 : Différence entre la structure chimique des statines de type I et II

*HMG = Hydroxyméthylglutaryl

Les statines de type I et II présentent une structure chimique commune constituée par un groupement acide dihydroxyheptanoïque. Ce groupement constitue le pharmacophore des statines. Ce dernier est ensuite modifié en acide hydroxyglutarique qui a une structure similaire avec celle du substrat endogène du foie l'HMG-CoA de l'enzyme Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMGR). Ainsi, au niveau des statines, le pharmacophore est lié de façon covalente à un groupement plus ou moins hydrophobe allant du plus hydrophobe, la cérivastatine, au moins hydrophobe, la rosuvastatine.

Il peut donc être déduit que les statines ne diffèrent que par la structure de l'anneau (groupement plus ou moins hydrophobe) lié au pharmacophore. En effet, les statines de type I et II diffèrent par un remplacement du groupement butyryle des statines de type I par un groupement fluorophényle pour les statines de type II (figure 1). Ce groupement fluorophényle est responsable des interactions polaires additionnelles provoquant une association plus forte entre les statines de type II et l'enzyme clé dans la biosynthèse de cholestérol, l'HMGR. Ces statines de type II diffèrent également des statines de type I par la présence d'un anneau central de différente structure et d'un groupement méthyléthyl. Par exemple pour la rosuvastatine, cet anneau est représenté par un groupement pyrimidinyle. Sachant que toutes les molécules de statines présentent un groupement carboxylique, le terme STCOOH désignera dans notre étude ces médicaments. La structure chimique de ces statines est présentée dans la figure 2.

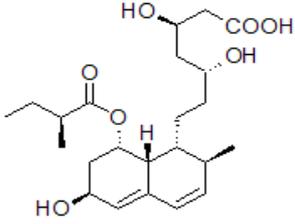
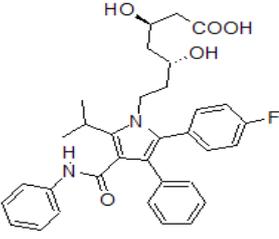
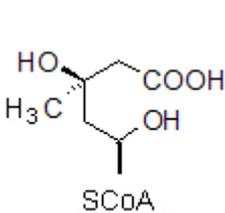
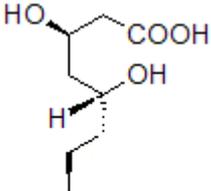
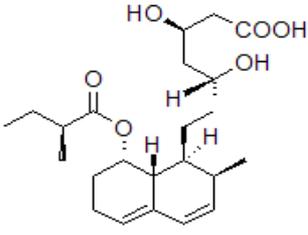
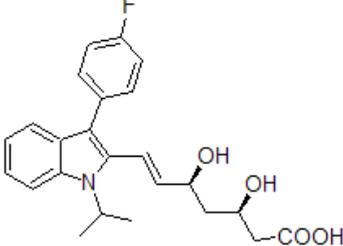
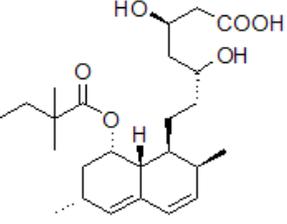
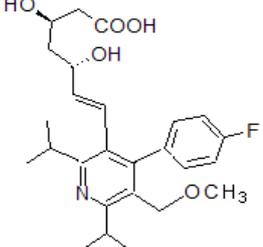
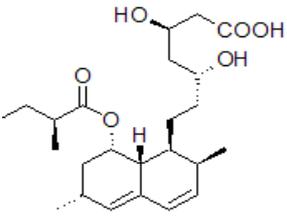
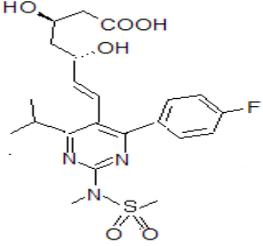
STATINES		HMG-CoA	Pharmacophore des statines
Type I	Type II		
 <p>Pravastatine</p>	 <p>Atorvastatine</p>	 <p>SCoA</p>  <p>anneau plus ou moins hydrophobe</p>	
 <p>Mévastatine</p>	 <p>Fluvastatine</p>		
 <p>Simvastatine</p>	 <p>Cérivastatine</p>		
 <p>Lovastatine</p>	 <p>Rosuvastatine</p>		

Figure 2 : Structures chimiques des statines (STCOOH), de leur pharmacophore et de l'HMG-CoA

Au cours de notre recherche, nous étudierons 5 de ces statines à savoir la pravastatine, la mévastatine, l'atorvastatine, la simvastatine et la fluvastatine. La rosuvastatine est une nouvelle statine très difficile à obtenir chez les fournisseurs.

A.2.3. Mécanisme d'action

Les statines agissent sur la biosynthèse de cholestérol dans le foie. Elles inhibent l'enzyme clé intervenant dans la synthèse *de novo* du cholestérol, l'Hydroxyméthylglucaryl-Coenzyme A réductase (HMGR) d'où leur nom formel d'« inhibiteurs de l'HMGR ». Les statines sont des inhibiteurs compétitifs puissants, réversibles et spécifiques de l'enzyme HMGR car elles présentent le même pharmacophore que la partie HMG du substrat HMG-CoA de l'enzyme. En effet, le pharmacophore des statines se lie sur le même site actif que le substrat HMG-CoA induisant ainsi une inhibition très efficace de l'HMGR de l'ordre du nanomolaire (ISTVAN 2003). L'inhibition de l'enzyme empêche la transformation de l'HMG-CoA en acide mévalonique (ou mévalonate), le précurseur de la synthèse de cholestérol selon le schéma suivant :

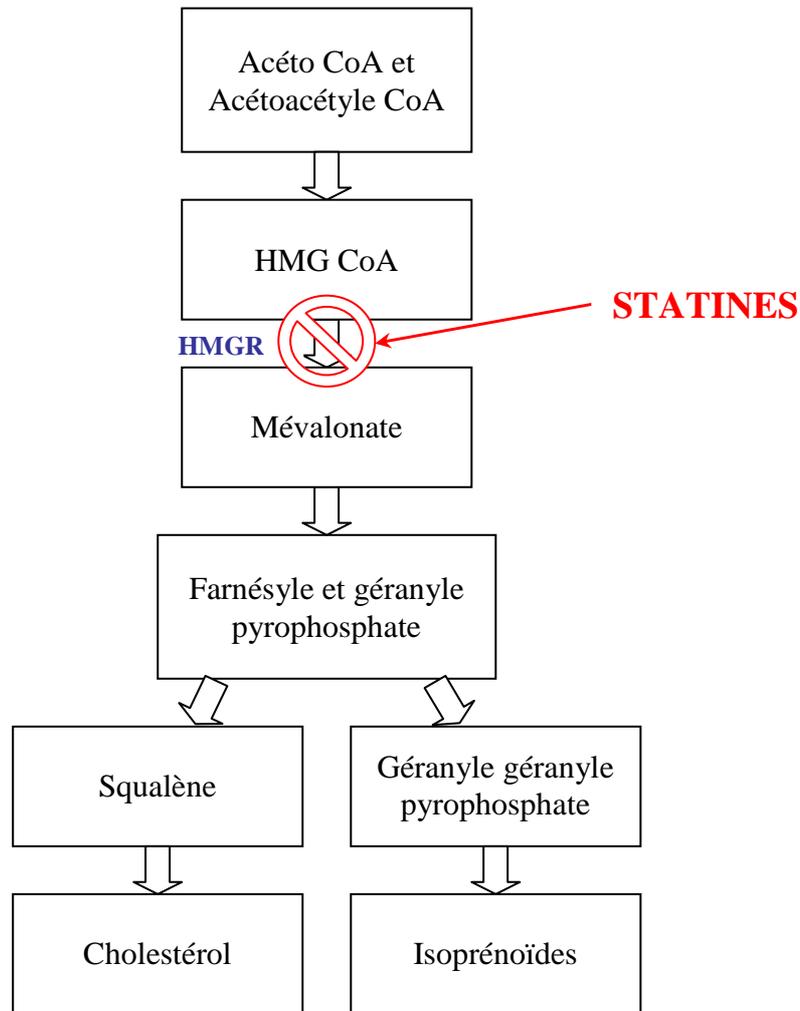


Figure 3 : Mécanisme d'action des statines sur la voie de synthèse du cholestérol et des isoprénoïdes (d'après LUDMAN et al. 2009)

Les associations entre le pharmacophore des statines et l'enzyme sont gouvernées par des liaisons polaires et ioniques et sont similaires pour toutes les molécules de statines. Les groupements hydrophobes des statines vont entrer dans le sillon hydrophobe peu profond de l'enzyme. En effet, l'enzyme HMGR présente une conformation très flexible qui provoque la création d'un sillon hydrophobe (ISTVAN 2003).

La figure 4 montre les associations intervenant dans la liaison d'une statine de type I, la simvastatine, et l'HMGR.

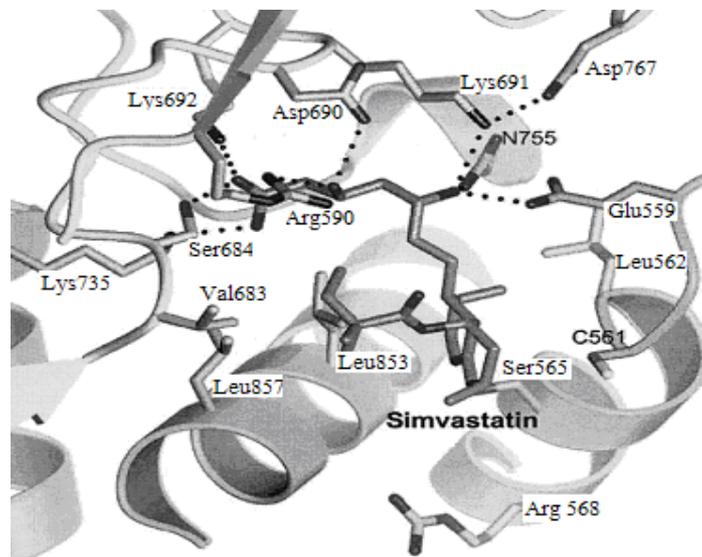


Figure 4 : Interactions entre la simvastatine (statine de type I) et les résidus acides aminés de l'HMGR. Structure de l'HMGR obtenue par cristallographie (d'après ISTVAN 2003)

Les liaisons polaires sont formées avec les résidus Ser⁶⁸⁴ (Sérine), Asp⁶⁹⁰ (Aspartate), Lys⁶⁹¹ (Lysine) et Lys⁶⁹². L'association entre les statines de type I et le site actif de l'enzyme fait intervenir de nombreuses liaisons hydrogènes entre le groupement hydroxyle de l'acide hydroxyglutarique des statines et les résidus Lys⁶⁹¹, Glu⁵⁵⁹ (Glutamate) et Asp⁷⁶⁷ (figure 4). Tandis que l'atorvastatine et la rosuvastatine, des statines de type II, forment des liaisons hydrogènes uniquement avec la Ser⁵⁶⁵.

Les statines de type II forment des interactions polaires entre leur groupement fluorophényle et le résidu Arg⁵⁹⁰ (Arginine). Ce groupement fluorophényle est responsable de la forte liaison entre l'enzyme et les statines de type II.

En plus de ces liaisons polaires et hydrogènes, il existe d'autres liaisons de type van der Waals intervenant avec les résidus Leu⁵⁶² (Leucine), Val⁶⁸³ (Valine), Leu⁸⁵³, Ala⁸⁵⁶ (Alanine) et Leu⁸⁵⁷ de la partie hydrophobe de l'enzyme (figure 4).

La différence dans la structure chimique des statines affecte leurs propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques telles que leur lipophilie, leur affinité avec le site actif de l'enzyme HMGR, leur biodisponibilité systémique, leur métabolisme et leur élimination.

A.2.4. Données pharmacologiques et pharmacocinétiques

L'activité de chaque statine dépend de sa structure chimique, de son affinité avec l'enzyme et sa durée de liaison avec celui-ci. Les données pharmacocinétiques des 5 statines étudiées sont consignées dans le tableau 1.

	Pravastatine	Mévastatine*	Atorvastatine	Simvastatine	Fluvastatine
Biodisponibilité (%)	18	-	12	5	19-29
Lipophilie	Hydrophile	Lipophile	Lipophile	Lipophile	Lipophile
CI50 (nM) ^a	44	23	10	9	18
Métabolisme	Sulfatation	-	CYP3A4 ^b	CYP3A4	CYP2C9 ^c
Diminution cholestérol total (%) ^d	16-25	-	25-45	19-36	16-27
Diminution LDL-C (%) ^e	22-34	-	26-60	26-47	22-36
Augmentation HDL-C (%) ^f	2-12	-	5-13	8-16	3-11

Tableau 1 : Les données pharmacologiques et la comparaison de l'efficacité des statines

* Mévastatine : En étude aux USA et données pas disponibles

^a CI50 : Concentration inhibant 50% de l'activité de l'enzyme HMGR (figure 3)

^{b, c} *Enzymes appartenant à la superfamille des cytochromes P450 (CYP) fortement impliqués dans la transformation et l'élimination des principes actifs chez l'homme*

^d *Cholestérol sanguin total dont la valeur normale (v.n.) doit être < 2 g/l*

^e *Diminution du taux de LDL-C dans le sang (v.n. < 1,60 g/l) : lipoprotéine transportant le cholestérol vers les tissus. Cette réduction est le meilleur indicateur de la prévention cardiovasculaire (AFSSAPS 2005)*

^f *Augmentation du taux de HDL-C dans le sang (v.n. > 0,40 g/l) : lipoprotéine transportant l'excès de cholestérol vers le foie d'où son élimination*

Les statines présentent des caractéristiques pharmacocinétiques variables, conditionnées en partie par leurs propriétés physico-chimiques. La lipophilie des statines est un paramètre très important car elle détermine leur hépatosélectivité. Elle varie selon les molécules de statines. En effet, la simvastatine et l'atorvastatine sont lipophiles alors que la pravastatine et la rosuvastatine sont hydrophiles. La fluvastatine est moins lipophile que la simvastatine et l'atorvastatine mais plus lipophile que les statines hydrophiles. Cependant le caractère amphiphile de cette statine lui permet de former de nombreuses liaisons hydrogènes intramoléculaires lui conférant un caractère lipophile plus élevé et une forte perméabilité membranaire (HAMELIN et TURGEON 1998). Cette hépatosélectivité permet aux statines d'atteindre leur site actif et d'inhiber de façon compétitive l'enzyme HMGR. Les concentrations inhibant 50% de l'activité de l'enzyme (CI50) sont consignées dans le tableau 1 et sont de l'ordre du nanomolaire. En effet, les statines sont de puissants inhibiteurs de l'enzyme. L'inhibition de l'enzyme HMGR entraîne une réduction de la synthèse du cholestérol dans le foie. Elle permet de réduire les taux du « mauvais cholestérol », le LDL-C tout en augmentant les taux du « bon cholestérol », le HDL-C. La différence des effets obtenus est liée à la structure chimique des statines, à leur affinité pour l'enzyme ainsi qu'à leur degré de lipophilie.

Les statines sont métabolisées dans le foie ce qui leur confère une faible biodisponibilité systémique (CORSINI et al. 1999). Ce métabolisme, assuré par les cytochromes P450 (CYP), est oxydatif. La simvastatine et l'atorvastatine sont majoritairement métabolisées par les CYP 3A4 hépatiques en métabolites actifs alors que la fluvastatine est essentiellement métabolisée

par le CYP 2C9 en métabolite inactif. La pravastatine, qui est hydrophile, n'est pas significativement métabolisée par le CYP 3A4 mais subit une sulfatation. Le CYP 3A4 étant impliqué dans le métabolisme de la plupart des médicaments, le risque d'effets indésirables suite à des interactions médicamenteuses lors d'un traitement par une statine, ne doit pas être négligé. En effet, l'inhibition de ces enzymes ralentit l'élimination des statines et provoque ainsi une augmentation de leur concentration plasmatique. Cette augmentation de la concentration plasmique favorise la survenue d'effets indésirables musculaires.

A.2.5. Effets indésirables

Les statines sont bien tolérées et présentent quelques rares cas d'effets indésirables. En effet, plusieurs études ont démontré que les statines ont un excellent profil de sécurité (TALBERT et *al.* 2006). Les effets indésirables notés portent soit sur le foie, le principal organe cible des statines, soit sur le muscle.

➤ L'hépatotoxicité des statines repose sur l'élévation asymptomatique fréquente des transaminases ALAT (Alanine Amino Transférase) sachant que l'atteinte hépatique cliniquement significative est très rare (0,2/100000 personnes traitées) (PARRA et *al.* 2003, CADRANEL et *al.* 2009).

➤ Les atteintes du muscle telles que la myopathie et la rhabdomyolyse sont causées par la présence des statines dans la circulation sanguine et qui ont ainsi tendance à pénétrer dans les muscles. Cependant, les statines étant normalement hépatosélectives, ces cas surviennent chez certaines personnes qui n'arrivent plus à métaboliser correctement la dose ingérée ou par un engorgement des transporteurs hépatiques ou des cytochromes P450 (LEWIN et *al.* 2002, CHITTURI et GEORGE 2002). Ainsi le risque de rhabdomyolyse est peu fréquent, pour observer un cas il faudrait traiter 22727 patients en une année. La rhabdomyolyse est

essentiellement causée par des interactions médicamenteuses avec une fibrate, la gemfibrozil, et/ou par des fortes doses prescrites (AFSSAPS 2005).

A.3. Membrane plasmique

A.3.1. Structure

La membrane plasmique appelée aussi plasmalemme est une couche de cellules d'une épaisseur de 7 à 8 nm constituée principalement de phospholipides et dans laquelle sont insérées des molécules de cholestérol. Elle présente à sa surface des protéines et des glucides. Les phospholipides sont à la base de la structure principale des biomembranes. Les molécules de phospholipides sont constituées d'une tête hydrophile (le groupement phosphocholine attaché au groupement du glycérol) et d'une queue hydrophobe (les deux chaînes d'acides gras saturés et insaturés). Les phospholipides les plus fréquents et constituant la majeure partie de la membrane plasmique sont des phosphatidylcholines (PCs). La figure 5 ci-dessous représente un schéma de ce lipide.

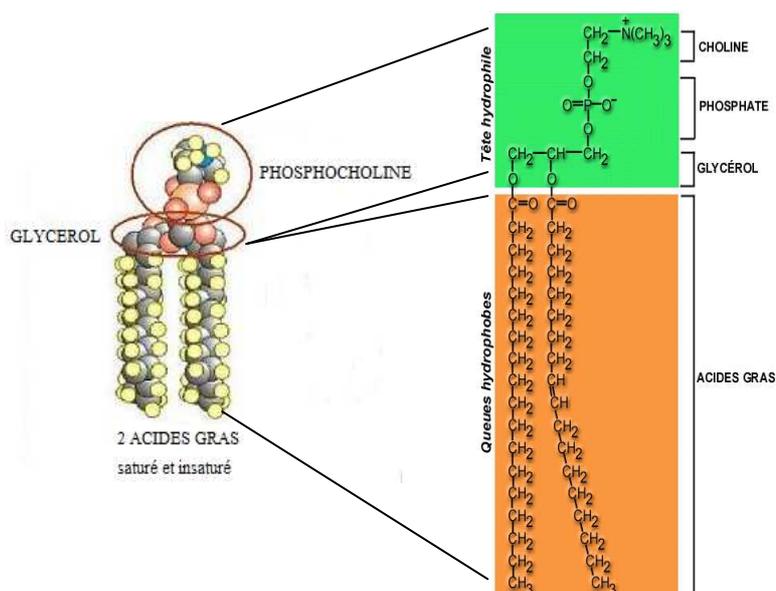


Figure 5 : Structure d'un phospholipide membranaire (d'après CAMPBELL et al. 2004)

Les molécules de phospholipides constituant la bicouche de la membrane plasmique sont liées entre elles non pas par des liaisons covalentes mais par des interactions de van der Waals et hydrophobes. En effet les phospholipides, le cholestérol et plusieurs protéines constituant la membrane plasmique sont des molécules amphiphiles. Ainsi à partir de ces données d'analyse chimique (DE ROBERTIS et *al.* 1983), plusieurs modèles de la structure de la membrane plasmique ont été proposés :

➤ Le modèle DAVSON et DANIELLI est le premier modèle élémentaire proposé en 1935 par DAVSON et DANIELLI. Ce modèle suggérait l'existence d'une couche de protéines tapissant les deux côtés d'une bicouche lipidique et traversant la membrane pour former des pores ouverts de protéines (DAVSON et DANIELLI 1935).

➤ Le modèle de ROBERTSON fut proposé en 1950. Il est constitué de deux couches de lipides asymétriques entre une couche extérieure de glycoprotéines et une couche intérieure de protéines. C'est le modèle de la membrane unitaire (ROBERTSON 1959).

➤ Le dernier modèle a été mis au point par SINGER et NICOLSON en 1972. Il est communément appelé le modèle de la « mosaïque fluide ». Ils ont montré que la membrane était constituée d'une bicouche fluide de phospholipides disposée en mosaïque dans lesquelles flottent des protéines. Ce concept de fluidité implique des liaisons non covalentes entre les différents constituants de la membrane (SINGER et NICOLSON 1972).

Une représentation schématique du modèle de la mosaïque fluide est présentée dans la figure 6.

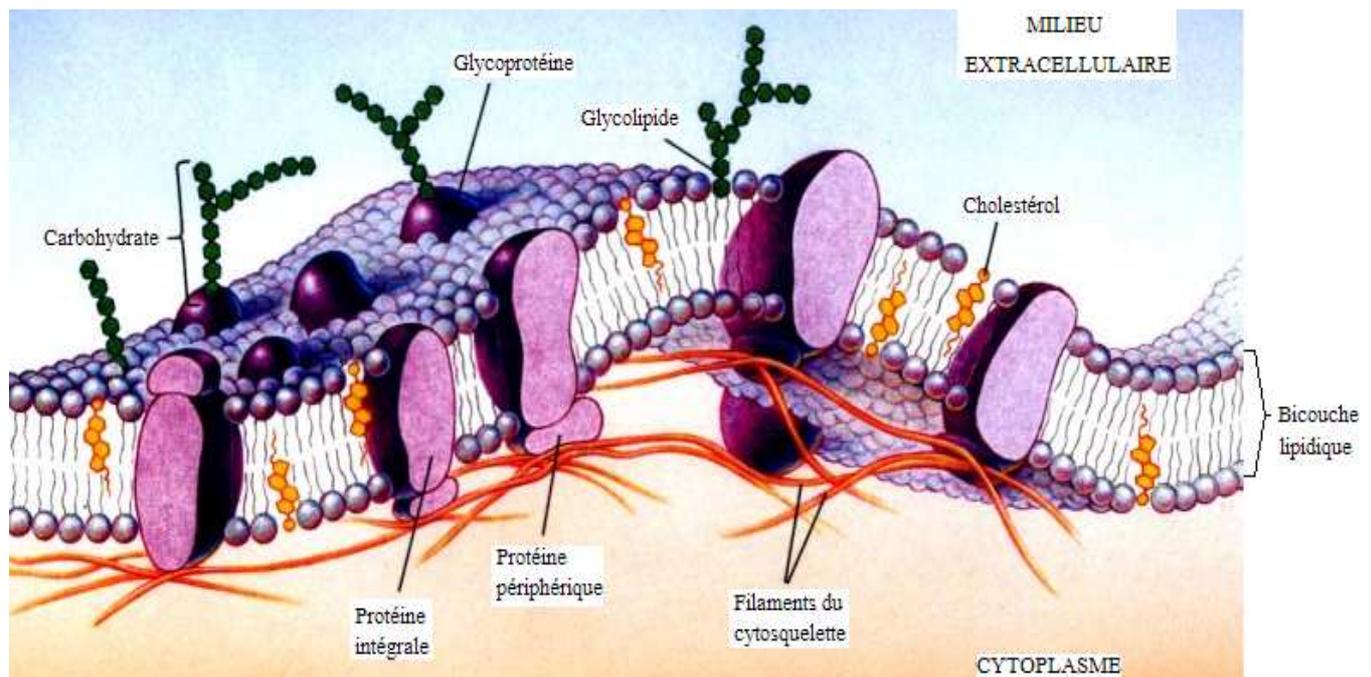


Figure 6 : Représentation de la membrane plasmique avec sa mosaïque fluide (d'après <http://med.tn.tudelft.nl/~hadley/nanoscience/week4/4.html>)

Les statines sont des médicaments hépatosélectifs et le foie constitue leur organe cible. Nous nous intéresserons donc à la structure de la membrane plasmique de la cellule principale du foie, l'hépatocyte.

A.3.1.1. Foie et hépatocyte

Le foie est l'organe le plus volumineux chez l'adulte. Il joue un rôle fondamental dans le métabolisme de la plupart des xénobiotiques. Ces derniers sont transformés dans les hépatocytes, principalement par le système enzymatique des cytochromes P450, en métabolites actifs ou inactifs qui seront éliminés dans la bile ou dans les urines.

Le foie est constitué majoritairement d'hépatocytes (figure 7). Leur membrane plasmique présente deux domaines principaux constitués par un pôle apical (ou pôle biliaire) dirigé vers

le milieu extérieur et un pôle basolatéral dirigé vers le sang en relation avec le milieu intérieur. Cette membrane plasmique présente des caractéristiques différentes au pôle apical et au pôle basolatéral. Les jonctions serrées qui entourent les canalicules biliaires limitent ces deux domaines principaux. Néanmoins, le domaine basolatéral de la membrane plasmique de l'hépatocyte peut être subdivisé en un domaine basal (ou domaine sinusoidal de part la présence des sinusoides) et en un domaine latéral faisant face à l'hépatocyte voisin. Ce domaine sinusoidal représente 70% de la membrane plasmique, tandis que les deux autres domaines se partagent de façon presque équitable les 30% restants (FELDMANN 1997).

En dehors du système enzymatique du métabolisme des xénobiotiques, l'hépatocyte exprime différents transporteurs membranaires. Par son pôle sinusoidal, la cellule est en contact avec le milieu sanguin où transitent les xénobiotiques apportés par la veine porte. Le passage membranaire de ces xénobiotiques dans l'hépatocyte est réalisé par des transporteurs spécifiques appartenant principalement à la famille des SLC (Solute carrier), regroupant les transporteurs OATPs (Organic anion transporting polypeptides) (KÖNIG et *al.* 2000). Au niveau du pôle apical, on trouve des transporteurs membranaires appartenant à la famille des ABC (Adénosine triphosphate (ATP) binding cassette). Cette famille regroupe les transporteurs MDR (Multi-drug resistance) avec entre autres la glycoprotéine *P* (*P*-gp) ou MDR1 (DIAZ 2000). Ces transporteurs permettent l'excrétion des xénobiotiques dans la bile via le canal biliaire et ensuite dans la lumière intestinale.

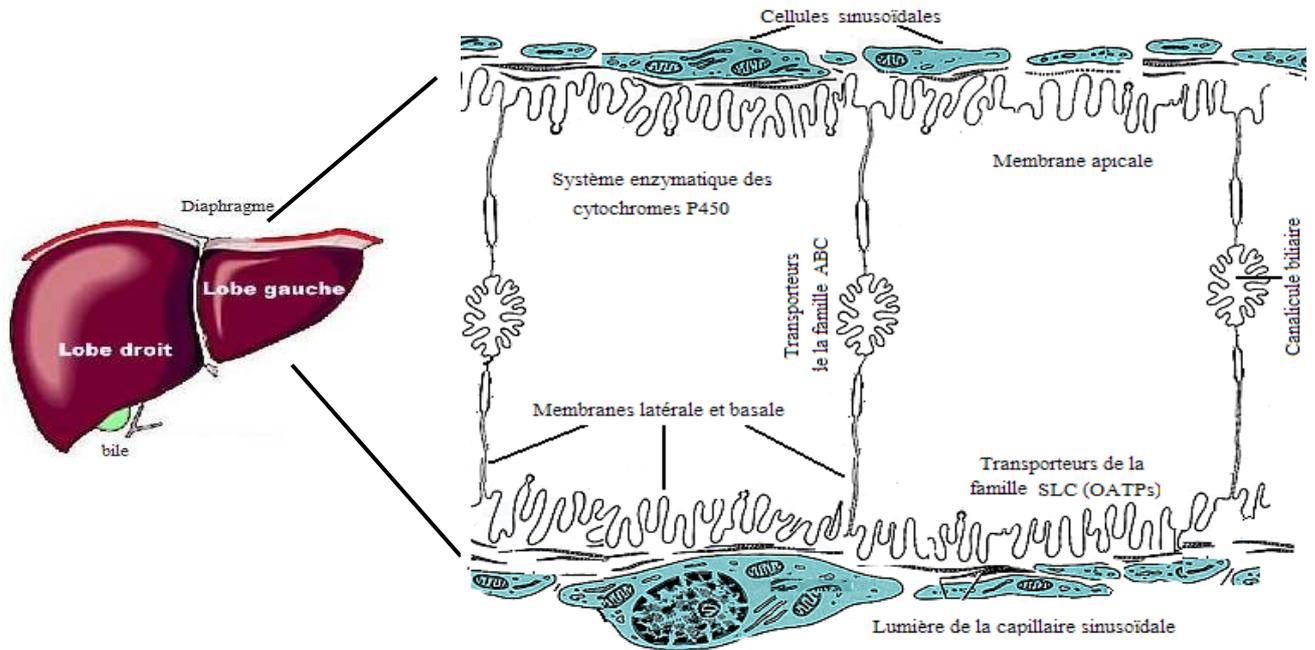


Figure 7 : Vue antérieure du foie et structure des hépatocytes avec leurs différents domaines (KELLER 2004)

A.3.2. Fonction

Les biomembranes constituent une barrière entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule ou d'un organe. Le passage des différentes molécules et ions entre ces deux milieux est contrôlé par la perméabilité membranaire. Ainsi la membrane plasmique laisse passer certaines substances plus facilement que d'autres. En plus de cette perméabilité sélective, la membrane plasmique joue trois rôles importants :

- Elle permet une communication intercellulaire à travers des signaux chimiques soit par l'intermédiaire d'un récepteur (les signaux hydrosolubles) ou en traversant la membrane (les signaux liposolubles).

➤ Elle sert aussi à l'adhérence des cellules entre elles et le milieu extracellulaire grâce aux jonctions intracellulaires étroitement liés au cytosquelette. Ces jonctions permettent la communication entre les cellules (jonction lacunaire ou gap-jonction), le maintien de l'homéostasie cellulaire, la compartimentation cellulaire...

➤ Le grand rôle de la membrane plasmique est le transport des molécules. Il existe plusieurs types de transport. Les molécules lipophiles traversent la membrane plasmique par diffusion simple ou passive. C'est un transport passif qui suit le gradient de concentration et qui ne consomme pas d'énergie. Par contre les molécules hydrophiles ou ionisées traversent cette membrane par diffusion facilitée ou par transport actif qui nécessitent tous les deux l'intervention d'une protéine de transport. Cependant, le transport actif nécessite une consommation d'énergie sous forme d'ATP car il se fait contre le gradient de concentration.

Ces différents types de transport sont représentés dans la figure 8 ci-dessous.

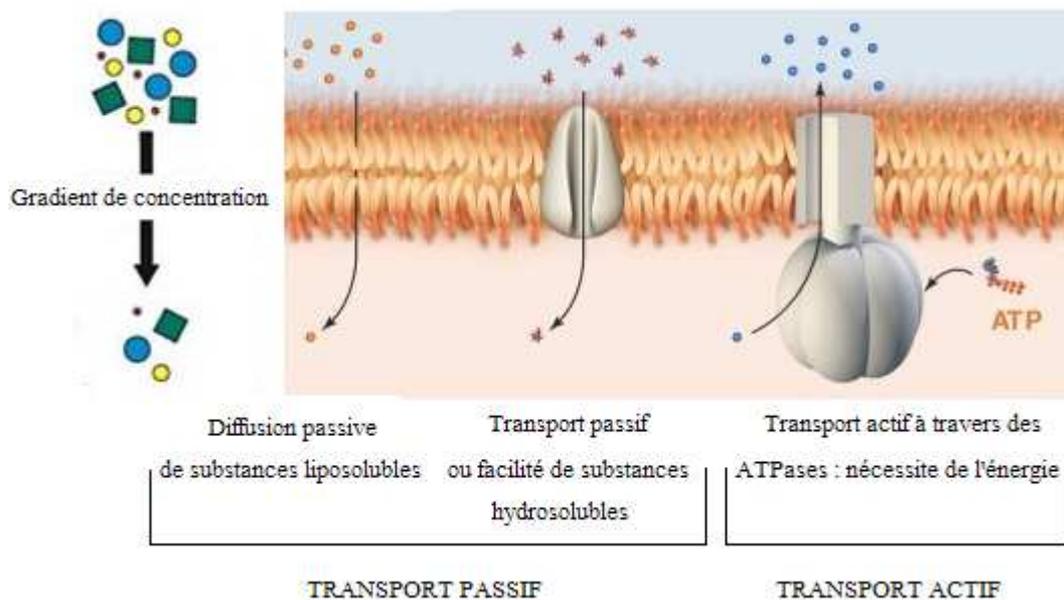


Figure 8 : Représentation des différents modes de transport des substances à travers la membrane plasmique

Ces types de transport concernent des molécules de petites tailles telles que les ions, l'éthanol... Le transport des macromolécules se fait par des mécanismes qui font intervenir le cytosquelette soit par endocytose ou par exocytose. Ces deux types de transport interviennent

également dans les mécanismes de renouvellement des membranes plasmiques. En effet, toutes les cellules eucaryotes ingèrent continuellement sous forme de vésicules des parties de leurs membranes plasmiques par endocytose. Les membranes sont remplacées par le mécanisme inverse d'exocytose, ou recyclées aussi rapidement qu'elles sont ingérées par endocytose. Ainsi l'exocytose permet aux cellules de libérer des macromolécules à l'extérieur, mais aussi de remodeler les membranes plasmiques tandis que l'endocytose fait pénétrer ces macromolécules à l'intérieur de la cellule dans le cytoplasme.

A.3.2.1. Diffusion simple ou passive

La diffusion simple est un mode d'échange transmembranaire qui se fait sans consommation d'énergie suivant un gradient de concentration. C'est un mécanisme non saturable qui intéresse plus la forme moléculaire non ionisée et la forme libre non liée. Elle se fait spontanément. La diffusion simple est considérée comme une diffusion passive car elle ne fait pas intervenir de perméases dans le transport des molécules. C'est le mode de transport le plus fréquent. Cependant cette diffusion n'est possible que si la molécule peut traverser directement la bicouche lipidique c'est-à-dire si elle est hydrophobe. Par contre si la molécule est hydrophile, il faut qu'elle soit de taille suffisamment petite telle que l'éthanol, l'eau ou l'urée pour utiliser ce type de transport. La diffusion passive d'un xénobiotique est influencée par son pH, son pKa c'est-à-dire son degré d'ionisation, sa lipophilie ainsi que sa solubilité.

La diffusion passive répond aux lois de la physique. Le transport se faisant selon un gradient de concentration, la 1^{ère} loi de Fick peut être utilisée pour quantifier ce type de transport. En effet selon cette loi, la vitesse des molécules diffusant d'une région à une autre est une fonction de la différence de leur concentration. Ainsi pour une cellule délimitée par une membrane, la loi de Fick peut s'écrire sous la forme (HOPKINS 1995) :

$$J = PA (C_1 - C_2) \quad (1)$$

J représente le flux de diffusion c'est-à-dire la quantité de soluté traversant la membrane par unité de temps en mol/m²/s, C_1 et C_2 sont les concentrations de la molécule concernée de part et d'autre de la membrane biologique en mol/m³, A est la surface traversée par le flux de diffusion ou la surface membranaire en m². P est le coefficient de perméabilité qui mesure la vitesse à laquelle le soluté traverse cette membrane en m/s.

Pour les molécules absorbées par la diffusion passive, le coefficient de partage P est directement proportionnel aux coefficients de partage membranaire K et de diffusion D et il est inversement proportionnel à l'épaisseur de la membrane e (LODISH et al. 1995). Ainsi l'équation du flux de diffusion à travers les membranes biologiques peut s'écrire sous la forme :

$$J = [(DK)/e] A (C_1 - C_2) \quad (2)$$

$$\text{Avec } P = (DK)/e \quad (3)$$

D représente le coefficient de diffusion en m²/s, K le coefficient de partage membranaire sans unité et e l'épaisseur de la membrane traversée par le flux de diffusion en m².

La barrière membranaire est constituée d'une bicouche lipidique, les molécules apolaires ont tendance à la traverser plus facilement. Par conséquent P reflète la solubilité des molécules diffusant dans les lipides membranaires (HOPKINS 1995).

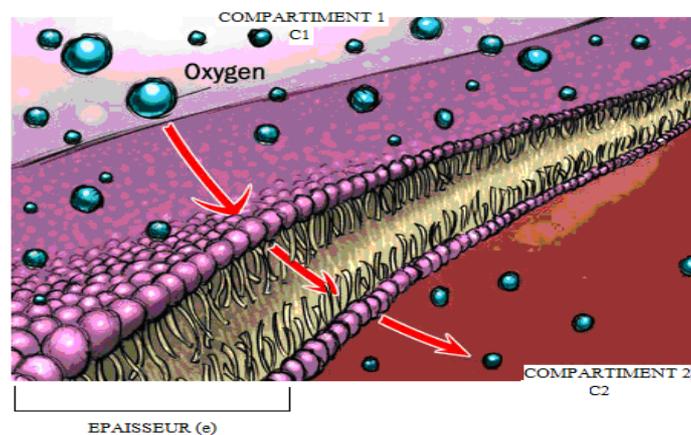


Figure 9 : Représentation schématique de la diffusion simple

A.3.2.1.1. Méthodes d'étude

Ces dernières années, l'intérêt des recherches s'est focalisé sur l'aspect important de l'association des xénobiotiques avec les membranes biologiques. L'étude de la diffusion des médicaments à travers les bicouches lipidiques est très importante car elle conditionne leur comportement pharmacocinétique et leur activité pharmacologique. En effet pour atteindre son site actif, le xénobiotique doit franchir la barrière de la membrane cellulaire de nature lipidique séparant les compartiments aqueux. Ainsi la capacité d'un xénobiotique à traverser la membrane cellulaire par diffusion passive repose sur sa lipophilie. Elle représente un paramètre physico-chimique clé qui permet de prédire les phénomènes de transport des xénobiotiques à travers les biomembranes. Il est déterminé par le partage du xénobiotique entre deux phases, le plus souvent l'une organique et l'autre aqueuse. Elle est quantifiée par le logarithme décimal du coefficient de partage P ($\log P$) entre un système biphasique constitué de deux solvants non miscibles, le système *n*-octanol/eau (LEO et al. 1971, PIDGEON et al. 1995). Pour étudier cette lipophilie et mieux comprendre les paramètres physico-chimiques qui gouvernent la diffusion passive des xénobiotiques, plusieurs systèmes mimant les membranes biologiques ont été développés tels que les modèles des liposomes ou de la membrane artificielle immobilisée (MAI).

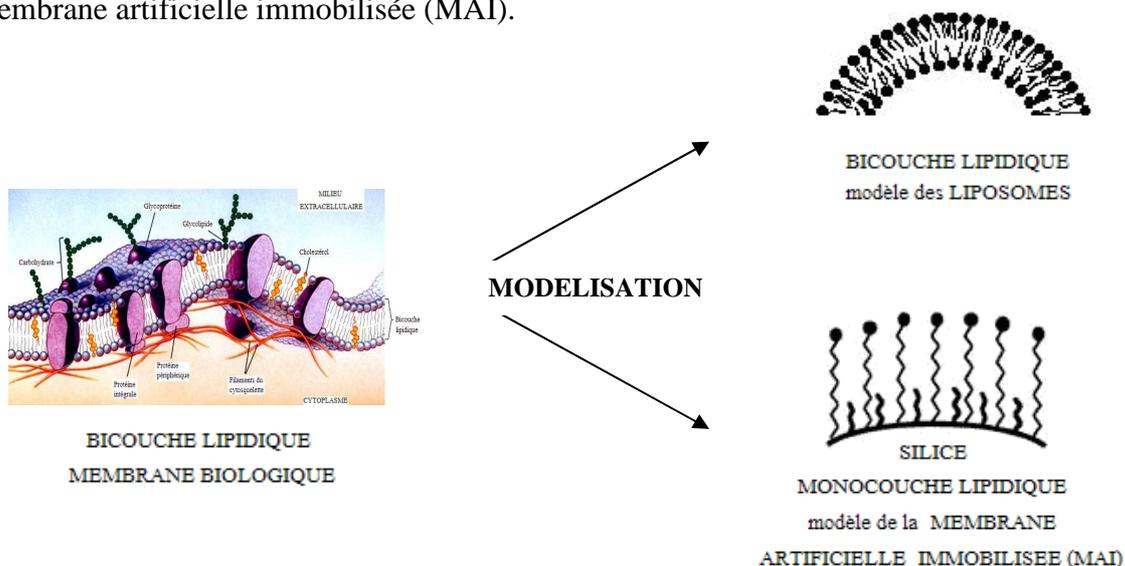


Figure 10 : Modélisation de la membrane biologique

A.3.2.1.1.1. Liposomes

Les liposomes ont été fabriqués pour la première fois par BANGHAM en 1965 (BANGHAM et *al.* 1965). Ils constituent un modèle membranaire et sont largement employés pour mieux comprendre les mécanismes intervenant au niveau de la membrane comme la perméabilité, la fluidité, l'ancrage de protéines ou encore la fusion de deux membranes (LORIN et *al.* 2004). Ce sont des sphères creuses, de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètre (nm) de diamètre, dont la paroi est formée d'une bicouche de phospholipides. Leur préparation est très simple. D'après la méthode de BANGHAM, les phospholipides sont dissous dans un mélange chloroforme/méthanol (4:1, v/v) et qui est parfaitement dispersé par sonication. Sous un courant d'azote gazeux, le chloroforme et le méthanol sont évaporés à sec. Les liposomes obtenus sont ensuite hydratés pendant 20 minutes dans un bain d'eau à 75°C avec 10 ml de saccharose à 9% dans du tampon phosphate 10 mM à pH = 7,0. De façon plus simple, les liposomes sont obtenus spontanément quand les phospholipides sont dispersés dans un milieu aqueux. Un modèle de liposome est représenté sur la figure 11 ci-dessous.

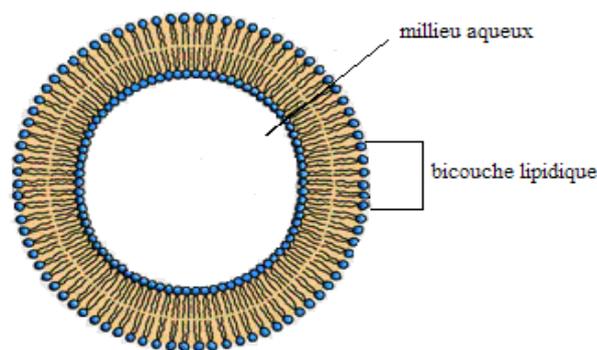


Figure 11 : Représentation d'un liposome

Les liposomes sont utilisés dans de nombreux domaines allant de la cosmétique à la thérapie génique. Cependant pour étudier la diffusion passive des xénobiotiques, ils sont couplés avec

une technique de fluorescence. Ainsi on les nomme des fluorosomes (FIX et MELCHIOR 2002, DENG et *al.* 2007, PRZYBYLO et *al.* 2007). Le processus du transport passif des xénobiotiques dans les liposomes est décrit comme suit (PRZYBYLO et *al.* 2007, figure 12):

➤ La suspension de liposomes est mélangée avec la solution isotonique du xénobiotique X qui va s'adsorber sur la surface extérieure du liposome ce qui correspond à la concentration extérieure du xénobiotique $C_{X_{ext}}$.

➤ Ensuite, le composé traverse la bicouche lipidique et apparaît à la surface intérieure du liposome correspondant ainsi à la concentration intérieure du xénobiotique $C_{X_{int}}$.

Chacun de ces processus se traduit par des changements dans l'intensité de la fluorescence (F_{ext} et F_{int}). En effet, la diminution de la fluorescence qui est induite par la présence du xénobiotique dans la bicouche du liposome est utilisée pour déterminer la diffusion passive.

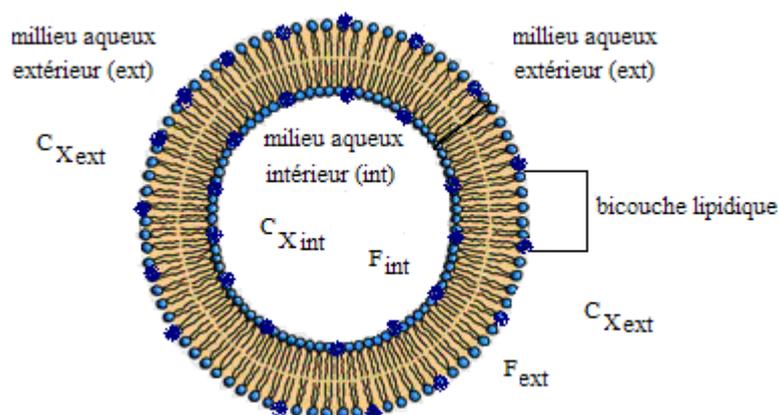


Figure 12 : Etude du transport passif d'un xénobiotique à travers un fluorosome

En plus des liposomes, il existe d'autres modèles d'étude de la diffusion passive des xénobiotiques tels que le modèle des membranes artificielles immobilisées.

A.3.2.1.1.2. Membranes Artificielles Immobilisées

Les Membranes Artificielles Immobilisées (MAIs) ont été introduites en 1989 par PIDGEON et VENKATARAM (PIDGEON et VENKATARAM 1989). Elles sont constituées de monocouche de phosphatidylcholines (PCs) greffée sur des particules de silice. Les phosphatidylcholines représentent les lipides les plus importants dans la membrane plasmique. Cette méthode biochromatographique, disponible dans le commerce, va constituer notre modèle d'étude pour déterminer la diffusion passive des statines. Elle est simple, fiable et rapide à mettre en place par rapport au modèle des liposomes. Elle sera plus développée dans le chapitre **B.1.1.**

A.3.2.2. Diffusion facilitée

Certains xénobiotiques ne peuvent traverser la bicouche lipidique à cause de leur polarité. En effet, les bicouches lipidiques sont imperméables aux solutés chargés ou aux ions ce qui les rend insolubles dans les lipides. Ainsi ces molécules refoulées telles que le glucose, les acides aminés se lient à des protéines de transport disséminées dans la membrane plasmique et diffusent selon leur gradient de concentration. Ce type de transport assisté des xénobiotiques à travers les biomembranes est appelée la diffusion facilitée. Une protéine de transport possède un site de conformation qui est fait sur mesure pour la molécule qu'elle transporte. Ainsi ces protéines de transport peuvent être inhibées de façon compétitive par des molécules ressemblant à leurs substrats normaux. Le transport de ces xénobiotiques se fait par un changement de conformation de la protéine membranaire qui transfère ainsi son site de liaison d'un côté à l'autre de la membrane plasmique. Ce changement de conformation ne nécessite aucun apport énergétique ce qui fait de la diffusion facilitée un transport passif.

A.3.2.2.1. Méthodes d'étude

Les méthodes d'étude de la diffusion facilitée des xénobiotiques sont calquées sur celles utilisées pour l'étude de la diffusion passive. En effet sachant que la diffusion facilitée nécessite la présence d'un transporteur membranaire, les modèles des liposomes et de la membrane artificielle immobilisée ont été améliorés. Des transporteurs membranaires sont donc insérés par différents processus dans la bicouche lipidique des liposomes ou dans la monocouche lipidique des MAIs. L'immobilisation de ces transporteurs sur les MAIs se fait « *in-batch* » c'est-à-dire que les protéines membranaires ciblées sont directement mis en contact avec les chaînes de phospholipides greffées sur les particules de silice. Ce mélange constituera la phase stationnaire remplissant une colonne chromatographique. LUNDAHL *et al.* ont mis au point une méthode pour immobiliser le transporteur du glucose des globules rouges dans des liposomes (LUNDAHL *et al.* 1999). Les MAIs ont aussi été utilisées pour greffer des transporteurs tels que le récepteur nicotinique, la glycoprotéine *P* ou *P-gp*, le sérum albumine humain (SAH), le transporteur d'anion organique (OAT) par une insertion hydrophobe dans les espaces interstitielles de la monocouche lipidique (LU *et al.* 2001, MOADDEL *et al.* 2002, TRUJILLO *et al.* 2007, KIMURA *et al.* 2007, MOADDEL *et* WAINER 2009).

Une autre technique biochromatographique beaucoup plus récente a été développée et introduite par HE *et al.* en 1996 (HE *et al.* 1996, HE *et al.* 2001, HE *et al.* 2007). Cette technique, appelée Chromatographie Membrane Cellulaire (CMC), permet d'observer l'affinité des médicaments avec le récepteur ou le transporteur de façon simple et commode sans dénaturer ces derniers. Ce modèle d'étude de la diffusion facilitée consiste à immobiliser un extrait membranaire surexprimant les transporteurs spécifiques des xénobiotiques à étudier sur des particules de silice. La CMC constituera, dans notre recherche, le modèle d'étude de la diffusion facilitée des statines à travers les hépatocytes et sera plus largement développée dans le chapitre **B.1.2.**

Le transport facilité des statines se fait par l'intermédiaire des protéines transmembranaires des hépatocytes connus sous le nom d'OATPs (Organic Anion Transporting Polypeptides). Ainsi nous travaillerons avec ce type de transporteur hépatique et nous utiliserons en complément du modèle CMC, une autre technique d'étude de la diffusion facilitée des statines. Ce modèle consiste à greffer les Oatps directement sur des particules de silice propylamine (CALLERI *et al.* 2003, GIRELLI et MATTEI 2005). Elle sera plus développée dans le chapitre **B.1.1.**

A.3.2.3. Transport actif

Le transport actif ressemble à la diffusion facilitée avec l'intervention d'un transporteur membranaire mais il se fait contre le gradient de concentration et a besoin d'une source d'énergie métabolique fournie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP est un intermédiaire énergétique pour la cellule. Elle libère de l'énergie nécessaire au transport des xénobiotiques contre leur gradient de concentration en cédant son dernier groupement phosphate pour devenir l'adénosine diphosphate (ADP) selon la réaction $ATP \longrightarrow ADP + P$. Le transport du glucose et de certains sucres peut être ainsi schématisé :

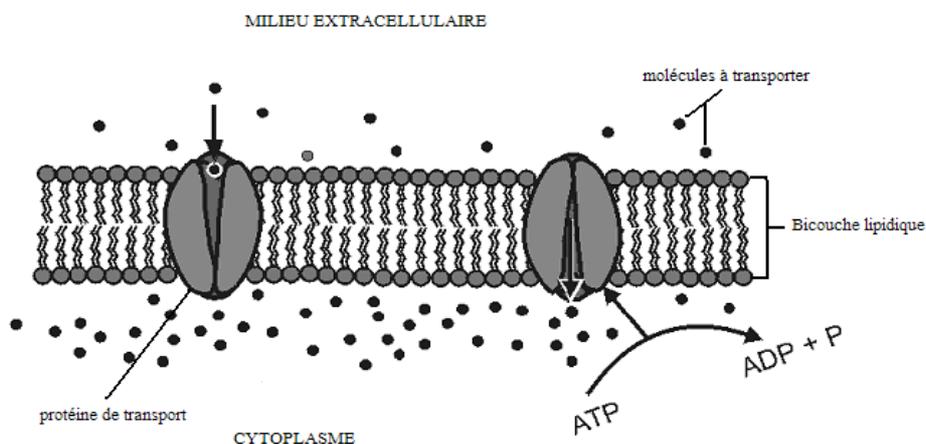


Figure 13 : Représentation schématique du transport actif

Ce transport actif joue un rôle clé et permet aux cellules de conserver un milieu intérieur différent du milieu extérieur. En effet en plus d'être spécifique et très rapide, le transport actif des xénobiotiques aboutit à leur accumulation à l'intérieur de la cellule. A la différence de la diffusion spontanée, le transport actif est unidirectionnel soit entrant soit sortant et son mécanisme provoque le déplacement des molécules contre leur gradient de concentration. C'est pour cette raison qu'ils sont souvent décrits sous le terme de pompes. Ce type de transport transmembranaire fait intervenir des transporteurs de types protéiques qui se combinent spécifiquement et réversiblement avec les molécules à transporter. Parmi les transports actifs, on peut citer les pompes à sodium et à potassium faisant intervenir une enzyme appelée ATPase sodium/potassium.

A.4. Transporteurs polypeptides d'anions organiques ou Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs)

A.4.1. Généralités

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre **A.3.1.1.**, le foie est le site de la métabolisation des xénobiotiques. Les hépatocytes sont constituées de différents pôles, chacun constitué d'un certain nombre de transporteurs transmembranaires très spécifiques appartenant à deux grandes familles de transporteurs les ABC (ATP binding cassette) et les SLC (Solute carrier) (HAGENBUCH et MEIER 2004, KÖNIG et *al.* 2000, HOFFMANN et KROEMER 2004). La figure 14 ci-dessous récapitule les transporteurs hépatiques existants chez l'Homme et chez le rat et appartenant à ces deux grandes familles. Il faut noter que les transporteurs d'origine humaine sont écrits en lettre capitale (par exemple OATPs) alors que ceux des rongeurs sont écrits en

minuscule (par exemple Oatps). Ces transporteurs jouent un rôle important dans l'absorption et l'élimination des substances endogènes et des xénobiotiques.

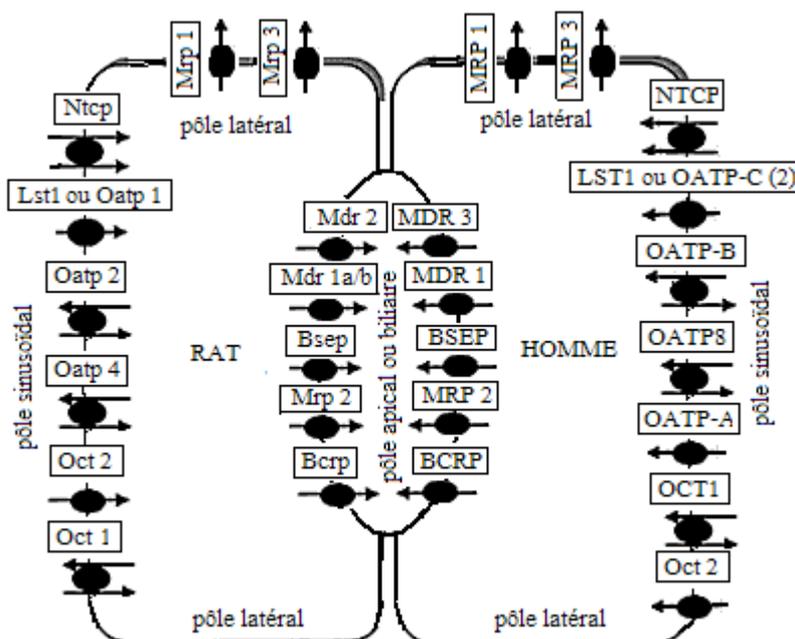


Figure 14 : Représentation schématique de la répartition des transporteurs hépatiques chez l'Homme et chez le rongeur (d'après LE VEE 2006)

La sécrétion des métabolites produits par les hépatocytes vers la circulation générale est assurée par les transporteurs situés sur le pôle latéral et appartenant à la superfamille des ABC. Certains de ces transporteurs ont des fonctions physiologiques essentielles comme l'excrétion de toxines du foie ou limitent la pénétration de molécules toxiques dans des organes vitaux comme le cerveau (GARRIDO et al. 2006). Elle regroupe les transporteurs MRP (Multi-drug resistance protein ou la protéine de résistance aux xénobiotiques) (figure 14).

Le pôle apical (ou pôle biliaire) est constitué de transporteurs qui permettent l'élimination des xénobiotiques dans la bile. Ces transporteurs appartiennent également à la famille des ABC regroupant d'autres transporteurs les MDR (Multi-drug resistance ou résistance aux xénobiotiques), les BSEP (Bile salt export pump ou pompe d'exportation des sels biliaires) et

les BCRP (Breast cancer resistance protein ou protéine de résistance au cancer du sein) (figure 14).

Le pôle basal (ou pôle sinusoidal) représente la partie la plus importante de la membrane plasmique des hépatocytes, soit environ 70%. Il est en relation avec le milieu sanguin et permet le transport des xénobiotiques dans l'hépatocyte. Ces derniers peuvent traverser les hépatocytes à partir de la membrane sinusoidale soit par diffusion passive soit par des systèmes de transport facilité ou actif. Le transport facilité ou actif de ces xénobiotiques est assuré par des transporteurs spécifiques de la famille des SLC. La famille des SLC compte 43 sous-familles dont 3 sous-familles spécifiques au foie représentées par les sous-familles des SLC10, SLC21 ou SLCO et SLC22. Les transporteurs polypeptides d'anions organiques OATPs (Organic anion transporting polypeptides) appartiennent à la sous-famille des SLC21 ou SLCO (O pour la 1^{ère} lettre des OATPs). Le co-transporteur polypeptide du sodium et du taurocholate NTCP (sodium-taurocholate co-transporting polypeptide) fait parti de la sous-famille des SLC10. Les transporteurs de cations organiques OCTs (Organic cation transporters) appartiennent à la sous-famille des SLC22 (MIKKAICHI et *al.* 2004, HAGENBUCH et MEIER 2004). Ces sous-familles sont classées en regard de leur structure et de leur fonction.

Dans notre recherche nous nous focaliserons davantage sur les transporteurs de la famille des SLC et plus particulièrement ceux impliqués dans la diffusion facilitée des statines à travers les hépatocytes, à savoir les OATPs.

A.4.2. Structure

Les transporteurs polypeptides d'anions organiques sont des transporteurs transmembranaires ubiquistes exprimés dans la barrière hématoencéphalique, l'intestin, le rein, le cœur, les poumons, le foie... La sous-famille des OATPs hépatiques regroupent plusieurs membres.

Chez l'Homme ils sont au nombre de 3 : OATP1, OATP8, OATP-C et chez le rat ils sont représentés par l'Oatp1, l'Oatp2 et l'Oatp4. Cependant la nomenclature des transporteurs hépatiques est très diverse et peut être source de confusion. En effet, le nom des membres de la sous-famille des OATPs est donné par l'équipe de recherche qui l'a isolé (MIKKAICHI et *al.* 2004). Par exemple l'OATP1 correspond à OATP-A, l'OATP-C correspond à l'OATP2 ou LST-1 (Liver specific transporter ou transporteur spécifique du foie) et l'Oatp4 s'appelle aussi Lst-1. Pour éviter ces confusions, une nouvelle nomenclature a été adoptée (HAGENBUCH et MEIER 2004). Par exemple LST-1/OATP2 sera nommé OATP1B1 et l'Oatp2, Oatp1a4. Cependant dans notre recherche, on utilisera l'ancienne dénomination de ces protéines beaucoup plus simple.

Les OATPs possèdent une structure commune à tous ses membres. Cette structure est constituée (1) de protéines avec 12 domaines transmembranaires (TMs) avec une large boucle extracellulaire émergeant entre les TMs 9 et 10 contenant environ 11 résidus cystéine conservés, et (2) de nombreux sites de N-glycosylation et de phosphorylation présents au niveau des boucles extracellulaires 2 et 5 (TIRONA et *al.* 2001, HAGENBUCH et MEIER 2004, MIKKAICHI et *al.* 2004). La signature de cette sous-famille est constituée de 13 acides aminés bien conservés et qu'on retrouve aussi bien chez l'Homme, le rat et la souris. Cette signature est localisée à la frontière entre la boucle extracellulaire 3 et le TM 6 (HAGENBUCH et MEIER 2004, MEIER-ABT et *al.* 2005). Un exemple de la structure de l'Oatp1 est représenté sur la figure 15.

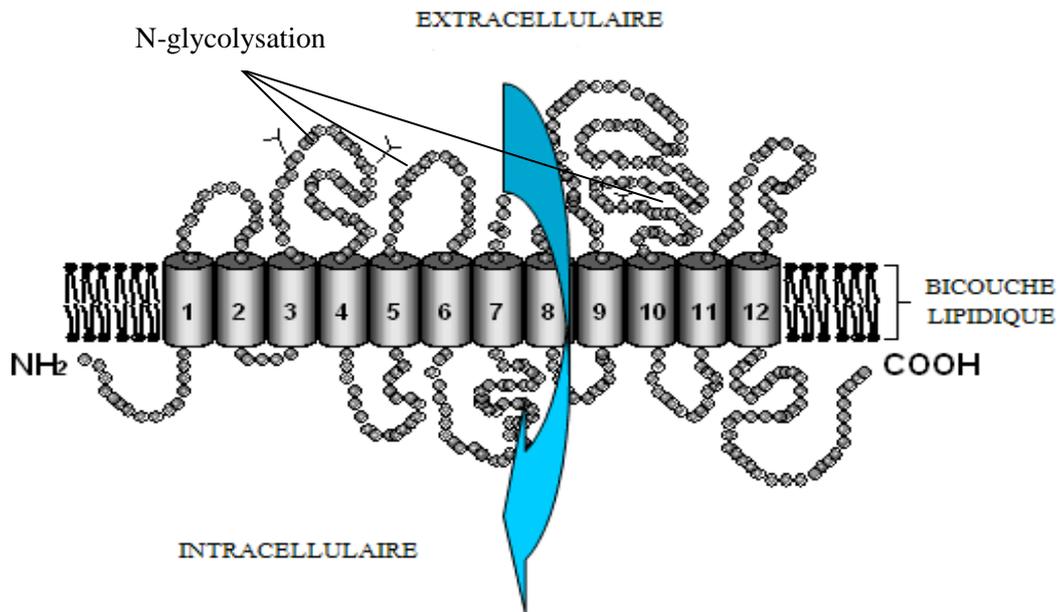


Figure 15 : Structure de l'Oatp1 avec ses 12 domaines transmembranaires (TMs)

Le mécanisme d'action des membres de la sous-famille OATPs est mal connu. Le mode de transport est indépendant du sodium, des gradients de potassium, du potentiel membranaire et des niveaux d'ATP (MAHAGITA et *al.* 2007, EVERS et CHU 2008). Cependant un modèle général du mécanisme d'action a été proposé pour tous les membres de cette sous-famille selon lequel les substrats seraient transportés à travers un pore central chargé positivement (MEIER-ABT et *al.* 2005). Ce transport se ferait grâce à un mécanisme de type rocker-switch c'est-à-dire un mécanisme de basculement de la protéine contenant le xénobiotique du milieu extracellulaire vers le cytoplasme selon le schéma suivant :

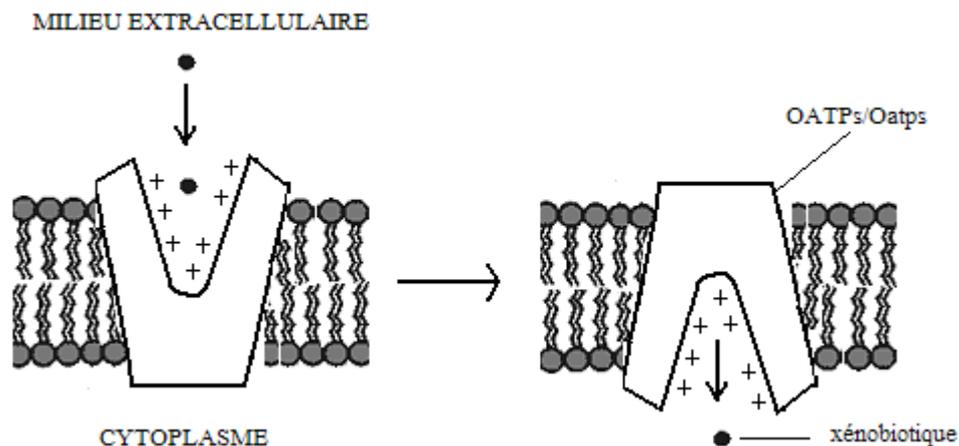


Figure 16 : Représentation schématique du mécanisme de type rocker-switch

Cependant les analyses de ce modèle de transport ne disent pas si c'est un mécanisme de co-transport avec une autre molécule ou si c'est simplement une diffusion facilitée des xénobiotiques à travers le pore central chargé positivement (MAHAGITA *et al.* 2007). Certains travaux ont démontré que le mécanisme de transport par les OATPs se fait par un échange d'anion couplé à la prise en charge des composés organiques (LEUTHOLD *et al.* 2009).

A.4.3. Fonction

Les OATPs sont des protéines de transport membranaire très importantes qui modulent le transport d'une grande variété de substances endogènes telles que les sels biliaires, les conjugués du glutathion (GSH), les hormones thyroïdiennes mais aussi de xénobiotiques tels que les statines, la digoxine, la rifampicine, les anions organiques.... (TIRONA et KIM 2002, HAGENBUCH et MEIER 2004, KÖNIG *et al.* 2006). En effet, les OATPs hépatiques tels que l'OATP-C et l'Oatp2 sont responsables de l'entrée rapide des statines dans les hépatocytes (NAKAI *et al.* 2001, KÖNIG *et al.* 2006). L'inhibition de ces transporteurs et les différences interindividuelles dues aux polymorphismes génétiques sont responsables des concentrations plasmatiques systémiques de la pravastatine ainsi que de la biodisponibilité de toutes les

statines provoquant ainsi une augmentation des risques de rhabdomyolyse (NISHIZATO et *al.* 2003, NIEMI et *al.* 2004). La mutation d'un des résidus cystéines des domaines extracellulaires 9 et 10 est suffisante pour provoquer une altération du mécanisme de transport des OATPs. Ceci prouve le rôle central de cette large boucle extracellulaire 5 dans le transport des molécules à travers la membrane plasmique des hépatocytes (MEIER-ABT et *al.* 2005, HÄNGGI et *al.* 2006). Selon l'étude de HÄNGGI et *al.*, le transport de la prostaglandine A1 était altéré et diminué chez tous les OATP-B présentant des mutations de ces cystéines (HÄNGGI et *al.* 2006). Cette mutation est une substitution des résidus cystéines par des résidus alanines (Cys en Ala).

D'autres études ont démontré également que la substitution d'un des acides aminés Gly⁴⁸⁸ en Ala associée à deux autres substitutions Asn⁴³² (Asparagine, site de N-glycolysation) en Aspartate (Asp) et Asp⁴⁶² en glycine (Gly), localisés dans la même boucle extracellulaire 5, étaient associées à l'augmentation de la constante d'association K entre le substrat et les OATPs (TIRONA et *al.* 2001, HAGENBUCH et MEIER 2004, MEIER-ABT et *al.* 2005). Cette large boucle extracellulaire 5 a un motif structural commun à tous les OATPs. Ainsi les polymorphismes ou modifications de cette boucle peuvent occasionner une altération de la fonction chez tous les membres de cette sous-famille (TIRONA et *al.* 2001). Ces mutations sont des polymorphismes d'un seul nucléotide ou SNPs (Single nucleotide polymorphisms) qui altèrent la fonction des OATPs donc le transport des xénobiotiques et peuvent provoquer des variabilités interindividuelles dans l'activité de ces xénobiotiques.

A.4.4. Régulation de l'expression des OATPs

L'étude de l'expression des OATPs est importante dans notre travail de recherche. En effet pour pouvoir étudier la diffusion des statines à travers ces transporteurs par le modèle de la

chromatographie membrane cellulaire, il est nécessaire de les surexprimer dans les hépatocytes.

Les mécanismes qui gouvernent la régulation de l'expression de cette sous-famille restent à ce jour peu connus. Cependant cette expression serait contrôlée par le récepteur intranucléaire FXR (Farnesoid X receptor ou récepteur farnésoïde X) en présence d'acides biliaires (SIMON *et al.* 1996, MIKKAICHI *et al.* 2004). En effet, l'activation du FXR diminue l'expression de l'OATP-C et l'Oatp4 via le SHP1 (Small heterodimer partner 1 ou petit partenaire hétérodimère 1) qui induit une inhibition de la fonction de HNF (hepatocyte nuclear factor ou facteur nucléaire de l'hépatocyte). Le HNF fait également parti des récepteurs nucléaires et joue un rôle dans l'expression des OATPs. En effet, chez des souris déficientes en HNF1 α , l'expression de l'ARNm (Acide ribonucléique messenger) des Oatps1, 2 et 4, des OATPs-C et 8 est diminuée ou absente (JUNG *et al.* 2001, JUNG et KULLAK-UBLICK 2003, VAVRICKA *et al.* 2004, LI et KLAASSEN 2004). La diminution de l'expression de ce facteur nucléaire est également impliquée dans la diminution de l'expression des Oatps1 et 2 observée lors de certaines maladies du foie telles que les cholestases (HARTMANN *et al.* 2002). Ceci peut être expliqué par le fait que les OATPs présentent des sites de liaison du HNF1 dans leur région promoteur ou amplificateur. Cependant le rôle direct de ce facteur nucléaire dans la régulation de l'expression des OATPs n'a pas encore été élucidé.

En plus de ces récepteurs nucléaires FXR et HNF, il existe deux autres récepteurs appartenant à cette même famille qui sont impliqués dans l'expression de la sous-famille des OATPs. Ce sont le récepteur pregnane X (PXR ou Pregnane X receptor) et le récepteur activé de la prolifération des peroxyosomes (PPAR α ou Peroxisome proliferator activated receptor α). En effet plusieurs études ont démontré que l'expression de l'Oatp2 est augmentée par des substrats du PXR qui sont la pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN), le spironolactone et la dexaméthasone (DEX) (LUTTRINGER *et al.* 2002, TURNCLIFF *et al.* 2004, CHENG *et al.* 2005). Cette expression serait régulée par l'activation du PXR via l'élément de réponse DR3 qui induirait une transcription du gène de l'Oatp2 (GUO *et al.* 2002, LUTTRINGER *et al.* 2002).

Cet élément de réponse DR3 est un nucléotide et serait présent au niveau du promoteur de l'Oatp2 qui contient un autre site de liaison pour le récepteur nucléaire PPAR α . Ce dernier peut également jouer un rôle dans l'expression de cette sous-famille. Cependant une étude récente de NAKAJIMA et *al.* a démontré que le b \acute{e} zafibrate, un substrat du PPAR α , n'avait pas d'effet sur l'expression de l'ARNm des Oatps1 et 2 (NAKAJIMA et *al.* 2008).

***B.* MODELE D'ETUDE**

B.1. Chromatographie membranaire

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est un outil puissant, simple et rapide pour l'étude de la reconnaissance moléculaire telle que le mécanisme d'association entre un xénobiotique et une molécule cible avec des applications biopharmaceutiques et médicales. Elle permet une approche plus complète et plus rapide pour étudier ce mécanisme d'association par rapport aux autres techniques que sont la dialyse, la spectrofluorimétrie, les titrages calorimétriques... En plus au niveau expérimental elle palie à certains problèmes rencontrés dans les techniques tels que l'absorption du ligand sur la membrane de dialyse ou les effets de quenching en spectrofluorimétrie. Avec la CLHP, plusieurs paramètres physico-chimiques du mécanisme d'association d'un xénobiotique avec une molécule cible tels que le pH, la force ionique, la température peuvent être analysés. Elle permet grâce à l'étude de la température d'accéder aux données thermodynamiques qui gouvernent ce mécanisme d'association.

Un schéma d'une chaîne CLHP est représenté par la figure 17 ci-dessous :

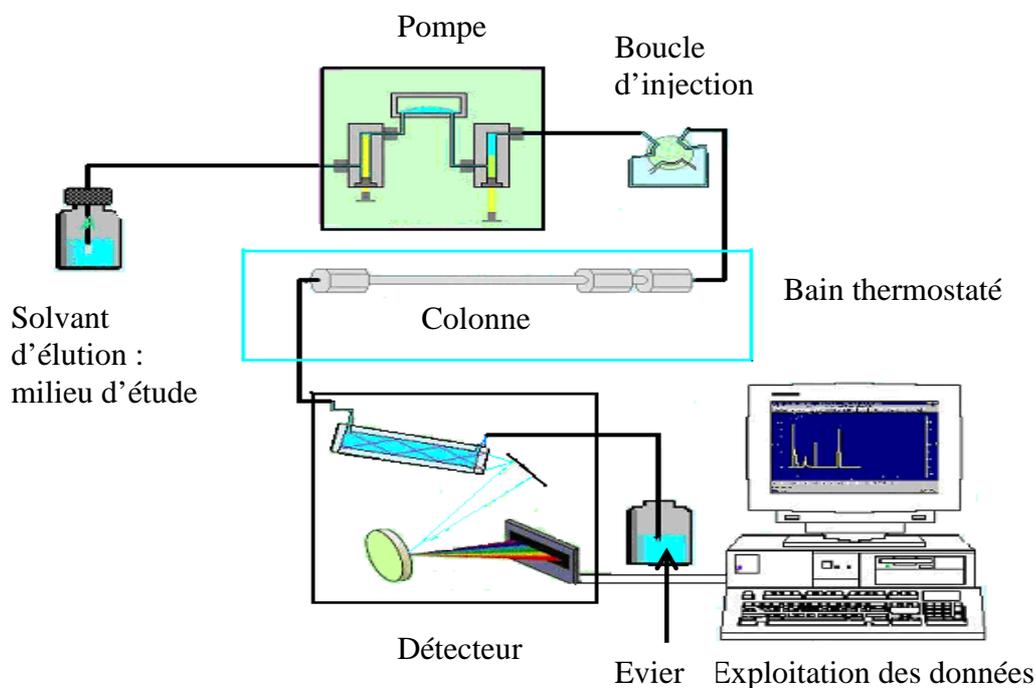


Figure 17 : Représentation schématique d'une Chromatographie Liquide Haute Performance

La phase mobile qui constitue le milieu d'étude circule continuellement dans le système chromatographique (figure 17). Lorsque la statine est injectée, elle est drainée par la phase mobile dans la colonne remplie de phase stationnaire. Elle traverse cette colonne et sort au bout d'un temps plus ou moins long selon son affinité avec la phase stationnaire. Si la statine présente une forte affinité avec la phase stationnaire alors son temps de rétention ou de sortie de la colonne sera plus grand. La fixation de la statine sur la phase stationnaire est caractérisée par le facteur de rétention k' . Un détecteur, couplé à un enregistreur placé à la sortie de la colonne, permet d'obtenir un chromatogramme. Ce tracé chromatographique permet de déterminer k' grâce au temps qui sépare le sommet du pic d'élution de la statine de son injection. Dans le cas où la phase stationnaire est constituée par la MAI, k' représentera la diffusion passive de la statine et qui est une grandeur chromatographique proportionnelle à la constante d'association K entre la molécule de statine et la phase stationnaire (MAHUZIER et *al.* 1999, HAGE et *al.* 1999).

La CLHP présente un champ d'application très vaste en raison d'un choix important de phases stationnaires. En effet en immobilisant différentes molécules sur le support chromatographique, on peut créer de nouvelles colonnes chromatographiques telles que les membranes artificielles immobilisées (MAIs), la chromatographie membrane cellulaire (CMC). Ces deux techniques utilisées dans notre étude vont être développées dans les chapitres **B.1.1.** et **B.1.2.** suivants.

B.1.1. Membrane Artificielle Immobilisée (MAI)

Le développement des membranes artificielles immobilisées (MAIs) a ouvert de nouvelles perspectives dans l'application en CLHP et ainsi permettre une rapide évaluation de la diffusion passive des xénobiotiques à travers les membranes biologiques. Les phospholipides des membranes biologiques contiennent dans leur structure des groupements polaires et de

nombreux xénobiotiques possèdent, en plus de leur caractère hydrophobe prépondérant, des groupements polaires pouvant interagir avec ceux des phospholipides. Par conséquent, les MAIs sont préparées à partir de groupements de phosphatidylcholines (PCs) greffés de façon covalente sur des particules de silice et constituent ainsi une monocouche lipidique. Elles permettent ainsi de mieux décrire les interactions polaires pouvant exister entre le xénobiotique et les membranes biologiques (PIDGEON et *al.* 1995, ABRAHAM et *al.* 1997, TAILLARDAT-BERTSCHINGER et *al.* 2003). Les MAIs servent de modèle de prédiction de la diffusion passive des xénobiotiques car elles miment les bicouches lipidiques des membranes biologiques. Par contre ce k' représentera la diffusion facilitée dans le cas où la phase stationnaire est constituée de protéines membranaires greffées sur des particules de silice.

La figure ci-dessous explique les correspondances entre la bicouche lipidique des biomembranes et la monocouche lipidique de la MAI.

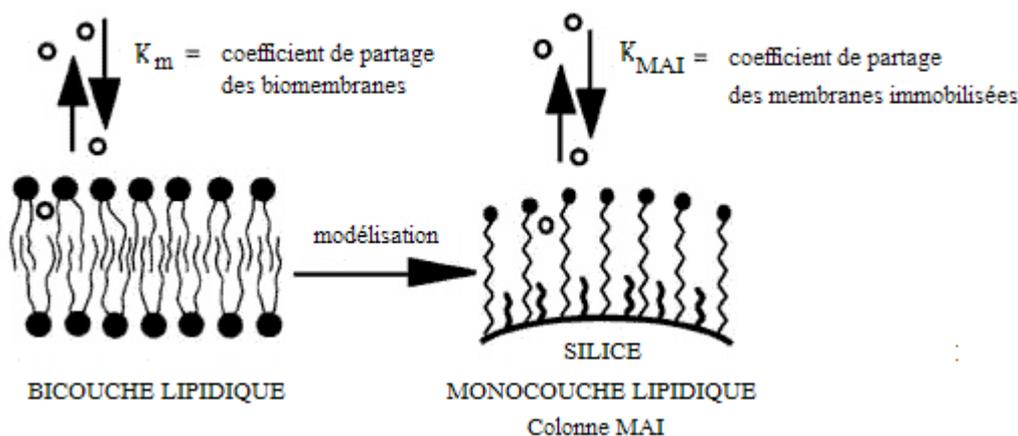


Figure 18 : La modélisation de la membrane plasmique en MAI (d'après YANG et al.1996)

➤ La première MAI, appelée MAI-PC est constituée d'un greffage par liaison covalente d'un groupement de diacylphosphatidylcholine (PC) sur des particules de silice substituées par un groupement propylamine ($-NH_2$). La silice propylamine est une matrice très stable qui permet l'immobilisation de ces lipides (PIDGEON et *al.* 1991). Cependant à cause de l'encombrement stérique, les groupements propylamines libres et résiduels confèrent un caractère basique à la surface de la MAI et ainsi diminuent la stabilité de la phase stationnaire.

Ceci provoque une rétention plus grande pour les composés acides mais faibles pour les composés basiques (MARKOVICH *et al.* 1991a, MARKOVICH *et al.* 1991b).

➤ La seconde MAI a été développée afin de diminuer cette différence de rétention entre les composés acides et basiques. Pour cela des groupements résiduels neutres ont été créés en transformant les groupements propylamines libres en groupements amines grâce à des groupements méthylglycolates (MG). Cette transformation a aussi conduit à la formation de groupements hydroxyles (OH) à l'intérieur de la poche lipophile de la monocouche. Cette nouvelle phase stationnaire dont la structure est représentée sur la figure 19 ci-dessous est appelée MAI-PC-MG.

➤ Afin de conférer aux MAIs une grande stabilité sous les conditions acides par l'augmentation de la densité des groupements polaires à sa surface, une seule chaîne de PC a été greffée par liaison covalente sur la surface des silices propylamines. Le nombre des groupements hydroxyles a été réduit en transformant ces derniers en groupements amines par l'anhydride propionique et décanoïque (figure 19). Cette troisième phase stationnaire appelée MAI-PC-DD (DD pour Drug Discovery) semble plus hydrophile que les MAIs précédentes (MAI-PC et MAI-PC-MG) à cause de l'immobilisation de PC monoacétylé (RHEE *et al.* 1991).

➤ La dernière MAI appelée MAI-PC-DD2 a été créée afin d'augmenter la durée de vie de la phase stationnaire et aussi allonger les temps de rétention des molécules analysées pour mieux visualiser le comportement des lipides au niveau des biomembranes. Elle est constituée, à la différence de la MAI-PC-DD, d'une double chaîne de groupements diacylphosphatidylcholines greffés sur la surface des silices propylamines. Les groupements amines résiduels sont couverts par des chaînes alkyles C3 ou C10 comme pour la MAI-PC-DD. La MAI-PC-DD2 est actuellement la colonne la plus utilisée pour l'étude de la

perméabilité membranaire ou la diffusion passive des molécules (YANG *et al.* 1996). Par contre la colonne MAI-PC-MG est utilisée pour la purification de mélange protéique. Ces trois phases stationnaires sont représentées sur la figure 19 ci-dessous.

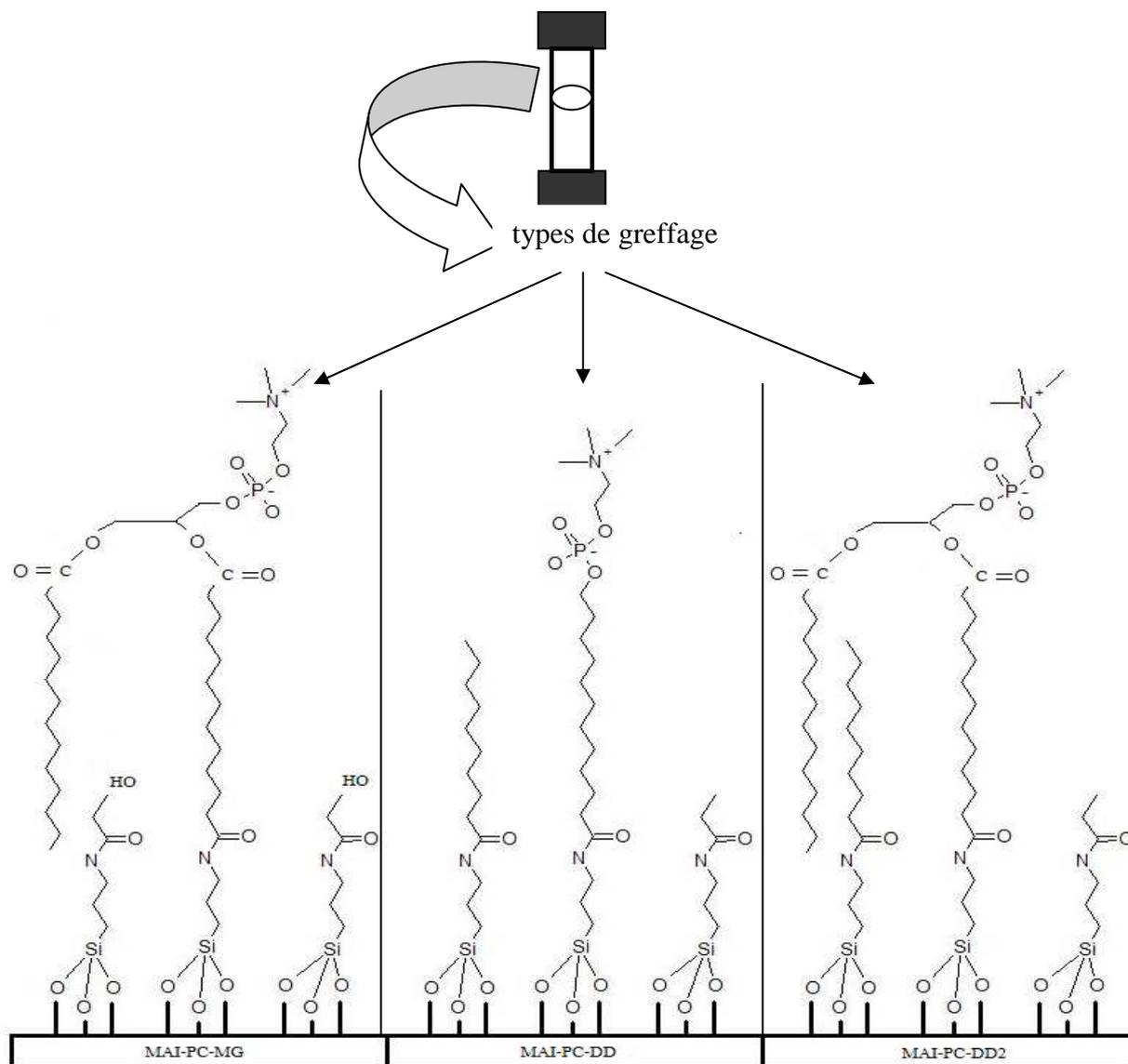


Figure 19 : Les différentes phases stationnaires MAIs

B.1.2. Chromatographie Membrane Cellulaire (CMC)

La Chromatographie Membrane Cellulaire (CMC) a été créée par HE et *al.* en 1996 (HE et *al.* 1996, HE et *al.* 2001, HE et *al.* 2007). Cette technique permet d'observer l'affinité des xénobiotiques avec le récepteur ou le transporteur de façon simple et commode sans dénaturer ces derniers. En effet, par rapport aux autres méthodes d'étude de l'affinité xénobiotique-récepteur telles que les MAIs couplées à des transporteurs membranaires, la CMC n'utilise pas de détergent pour solubiliser les protéines. Ce détergent peut provoquer un changement de l'état de la protéine ou la dénaturer.

En milieu aqueux, les groupements silanols (Si-OH) à la surface des particules de silice constituant le support chromatographique remplissant la colonne sont très polaires et provoquent ainsi une forte et irréversible adsorption des biopolymères. Cette propriété permet aux fragments des membranes de s'immobiliser sur la surface des particules de silice (figure 20).

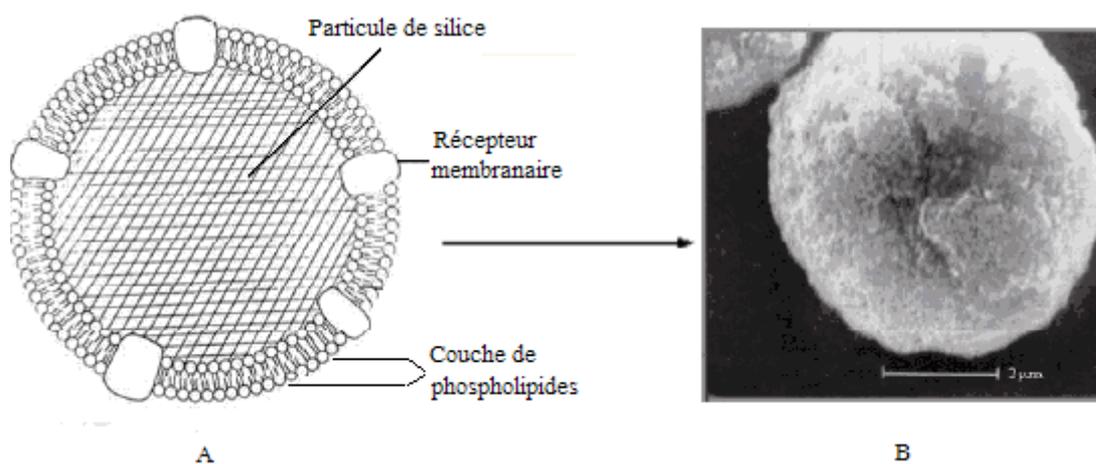


Figure 20 : Représentation d'une image idéale (A) et d'une micrographie réelle de la CMC (B) (d'après HE et al. 2007)

Cette nouvelle technique de bio-affinité chromatographique est utilisée dans plusieurs modèles d'études tels que l'établissement d'un modèle de chromatographie membrane

cellulaire de l'endothélium vasculaire humain ou CMC_{ECV304} . LI et HE démontrent dans une étude que ce modèle est fiable et reproduit *in vitro* les interactions entre les xénobiotiques, la membrane et ses récepteurs (LI et HE 2007). Ils ont également démontré, par des techniques de spectrométrie et de microscopie à balayage électronique, que les particules de silice sont entièrement recouvertes par les cellules de l'endothélium vasculaire. En effet les spectres de la CMC_{ECV304} obtenus montrent l'apparition d'un nouveau pic de carbone à la place du pic de la silice tandis que sur les spectres des particules de silice pure, il apparaît un pic d'oxygène et un grand pic de silice (figure 21). Ces résultats prouvent que la surface des particules de silice est entièrement recouverte par la membrane cellulaire de l'endothélium vasculaire. Cette technique semble donc efficace et mime les interactions entre xénobiotiques et récepteurs membranaires. En plus de cela elle est reproductible et stable (YU *et al.* 2005, LI and HE 2007, ZHENG *et al.* 2009).

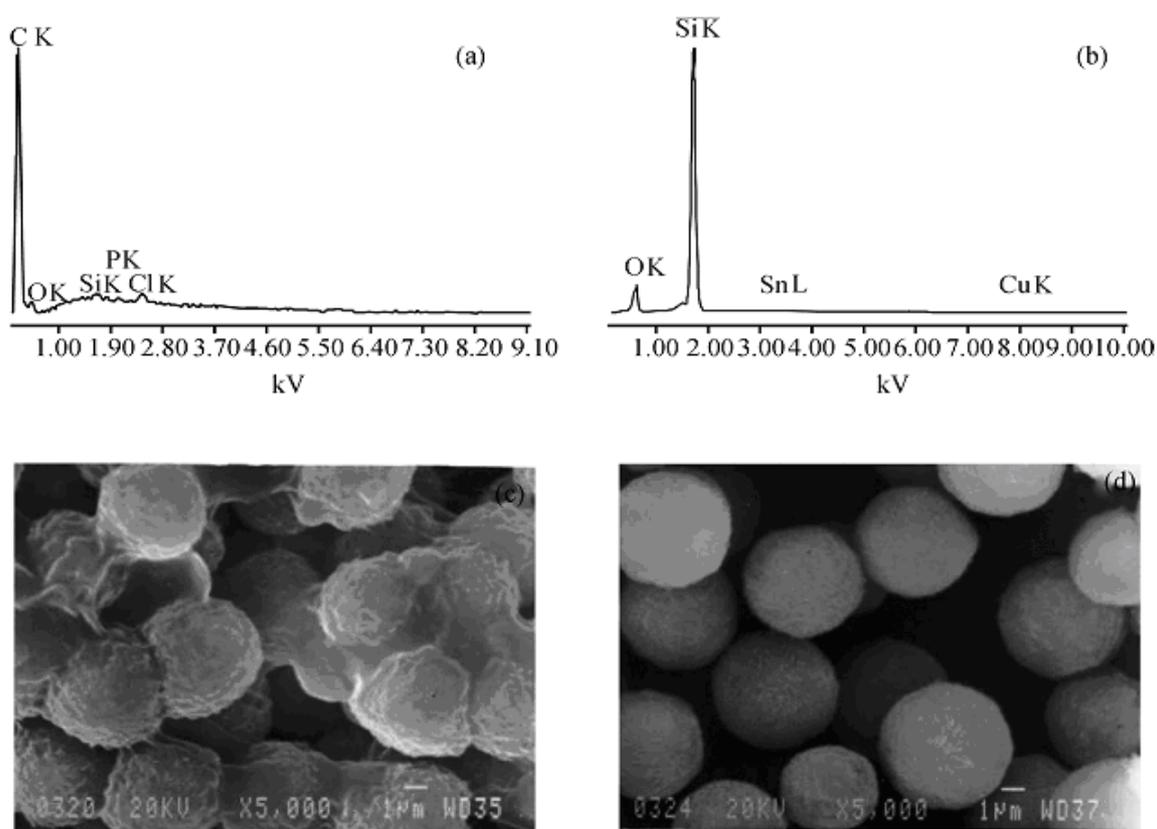


Figure 21 : La surface caractéristique d'une CMC_{ECV304}
Spectres d'énergie de la CMC_{ECV304} (a) et de la silice pure (b); Micrographes à balayage électronique de la CMC_{ECV304} (c) ($\times 5000$) et de la silice pure (d) ($\times 5000$) (d'après LI et HE 2007)

Pour une utilisation optimale de la chromatographie membrane cellulaire, les expérimentations doivent être réalisées dans des conditions identiques à celles d'un état physiologique c'est-à-dire un milieu d'étude aqueux à base de tampon phosphate (PBS) 50 mM à pH = 7,4 et une température de 37°C. Ces conditions permettent de mieux maintenir l'activité des protéines membranaires tout au long de l'étude.

B.2. Grandeurs chromatographiques

B.2.1. Facteur de rétention (k')

Le résultat obtenu lors d'une analyse CLHP se présente sous la forme d'une courbe d'allure gaussienne appelée chromatogramme comportant plusieurs grandeurs caractéristiques :

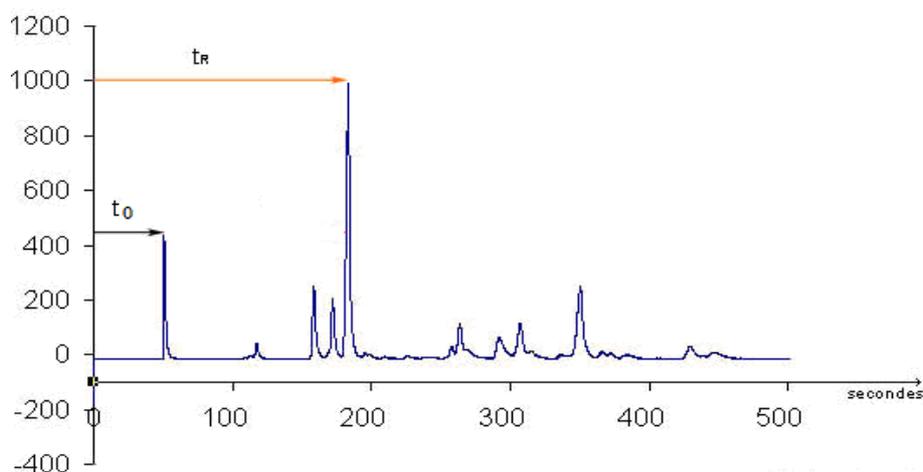


Figure 22 : Représentation d'un chromatogramme

➤ Le temps de rétention t_r , exprimé en minutes, est la principale grandeur de rétention. Il représente le temps que met le soluté à sortir de la colonne c'est-à-dire le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué. Il varie en fonction du débit, de la température, de la composition du milieu d'étude.

➤ Le temps mort t_0 est le temps que met un soluté n'ayant aucune affinité pour la phase stationnaire.

A partir de ces deux grandeurs, le facteur de rétention (k') du composé peut être déterminé selon la formule suivante :

$$k' = (t_r - t_0)/t_0 \quad (4)$$

C'est un paramètre important caractérisant l'affinité du composé avec la phase stationnaire remplissant la colonne chromatographique et qui est indépendant du débit.

B.2.2. Courbes de van't Hoff

L'enthalpie libre standard ΔG° du processus de fixation du xénobiotique sur la phase stationnaire est reliée à la constante d'association K par la relation suivante :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (5)$$

Où T est la température exprimée en Kelvin et R la constante des gaz parfaits.

K peut être exprimée en terme d'enthalpie standard ΔH° et d'entropie standard ΔS° du processus de fixation par la relation suivante :

$$\ln K = (-\Delta H^\circ/RT) + (\Delta S^\circ/R) \quad (6)$$

K est calculée selon l'équation suivante (MELANDER et HORVATH 1986, HAGE 1999) :

$$K = k'/\Phi \quad (7)$$

Où Φ représente le rapport de phase de la colonne (volume de la phase stationnaire divisé par celui de la phase mobile). Φ étant une constante, le facteur de rétention k' d'un composé est donc directement proportionnel à la constante d'association K . k' caractérise donc l'affinité du composé pour la phase stationnaire ou la diffusion passive ou facilitée du composé.

Comme k' est proportionnel à K , l'équation (7) peut aussi s'écrire :

$$\ln k' = (-\Delta H^\circ/RT) + (\Delta S^\circ/R) + \ln \Phi \quad (8)$$

$$\text{avec } (\Delta S^\circ/R) + \ln \Phi = \Delta S^{\circ*} \quad (9)$$

La courbe $\ln k'$ en fonction de $1/T$ est nommée courbe de van't Hoff. Si dans le domaine de température étudiée ΔH est constant, la courbe de van't Hoff est une droite qui permet de calculer les paramètres thermodynamiques ΔH° et ΔS° du processus d'association du xénobiotique avec la phase stationnaire (MELANDER et HORVATH 1986). Lorsque les conditions opératoires varient, $\Delta S^{\circ*}$ (sans unité) varie de manière identique à ΔS° puisque Φ est une constante.

B.2.3. Compensation Enthalpie-Entropie (CEE)

La CEE est un phénomène largement observé en biochimie. Elle permet d'étudier plus finement le mécanisme d'association d'une classe de xénobiotiques avec la phase stationnaire lorsque les conditions d'analyse varient. C'est une méthode extra-thermodynamique d'analyse des données physico-chimiques (MELANDER et HORVATH 1986).

Elle est exprimée généralement par la relation suivante :

$$\Delta H^\circ = \beta \Delta S^\circ + \Delta G^\circ_\beta \quad (10)$$

ΔG°_β est l'enthalpie libre du processus physico-chimique d'association d'un xénobiotique avec la phase stationnaire à la température de compensation β . Quand une réaction chimique exhibe une relation linéaire entre l'enthalpie et l'entropie alors une CEE est observée. D'après l'équation (10), si la CEE est observée lorsque les conditions d'analyse varient (par exemple par ajout d'un ion Ca^{2+} , Mg^{2+} dans le milieu d'étude) alors le xénobiotique a une enthalpie libre ΔG°_β , à la température β , indépendante des conditions d'analyse. Dans ce cas, les contributions enthalpique et entropique à l'enthalpie libre sont identiques pour toutes les conditions d'analyse (RANATUNGA et *al.* 2002). Le type d'association entre le xénobiotique et la phase stationnaire est alors indépendant des conditions d'analyse.

La CEE peut être étudiée pour une classe de xénobiotiques dans un système donné. Lorsqu'elle est observée, il peut être conclu que ces derniers sont retenus sur la phase stationnaire par globalement le même type d'interaction (MELANDER et HORVATH 1986). Cependant Ranatunga et *al.* ont montré que, pour des composés chimiquement différents et n'ayant pas les mêmes activités biologiques, l'ensemble des xénobiotiques testés n'exhibent pas forcément le même mécanisme de fixation sur la phase stationnaire (RANATUNGA et *al.* 2002). On admet donc que la CEE est observée si les xénobiotiques étudiés présentent également les mêmes activités biologiques.

B.2.4. Principales interactions gouvernant l'association xénobiotique-phase stationnaire

Pour qu'un xénobiotique tel qu'une statine s'associe à la phase stationnaire constituée soit de membrane artificielle immobilisée ou de protéines membranaires Oatp2 ou d'un extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2, il est nécessaire qu'il se trouve dans son voisinage. Les forces qui interviennent dans ce rapprochement sont des forces à longues portées constituées principalement par les interactions hydrophobes et coulombiennes. Ce sont les interactions primaires. Succédant à cette étape, la statine engage avec la phase stationnaire des interactions secondaires de courtes portées représentées par les interactions de van der Waals, les liaisons hydrogènes et les répulsions stériques. Ainsi l'association optimale entre la statine et la phase stationnaire étudiée se fait grâce à ces deux types d'interaction.

B.2.4.1. Interactions primaires

Le rapprochement de la statine à la surface de la phase stationnaire est gouverné par deux types d'interaction :

- Les interactions hydrophobes
- Les interactions coulombiennes

B.2.4.1.1. Interactions hydrophobes

L'interaction hydrophobe est un terme souvent employé avec une certaine imprécision. Tanford définit l'effet hydrophobe (assimilé aux interactions hydrophobes) comme étant la tendance qu'ont deux composés peu polaires ou apolaires à s'attirer mutuellement en milieu aqueux (TANFORD et *al.* 1973). Ces attractions hydrophobes sont la conséquence d'importantes énergies libres de cohésion des liaisons hydrogènes des molécules d'eau entourant ces solutés, en formant autour d'eux une coque de molécules d'eau hautement ordonnées. L'eau n'appartenant pas à cette coque portera le nom d'eau libre. « L'eau s'aime elle-même tout simplement trop pour permettre à quelques substances d'interférer dans ses affaires » (TANFORD 1973, VAN OSS 1996). Tout se passe comme si l'attraction polaire des molécules d'eau entre elles entraîne l'exclusion de toute autre molécule du système aqueux. L'attraction hydrophobe est gouvernée par le nombre de molécules d'eau ordonnées exclues de l'interface xénobiotique-phase stationnaire (v) quand le contact entre les molécules est établi selon le schéma suivant (ANDRÉ 2005) :

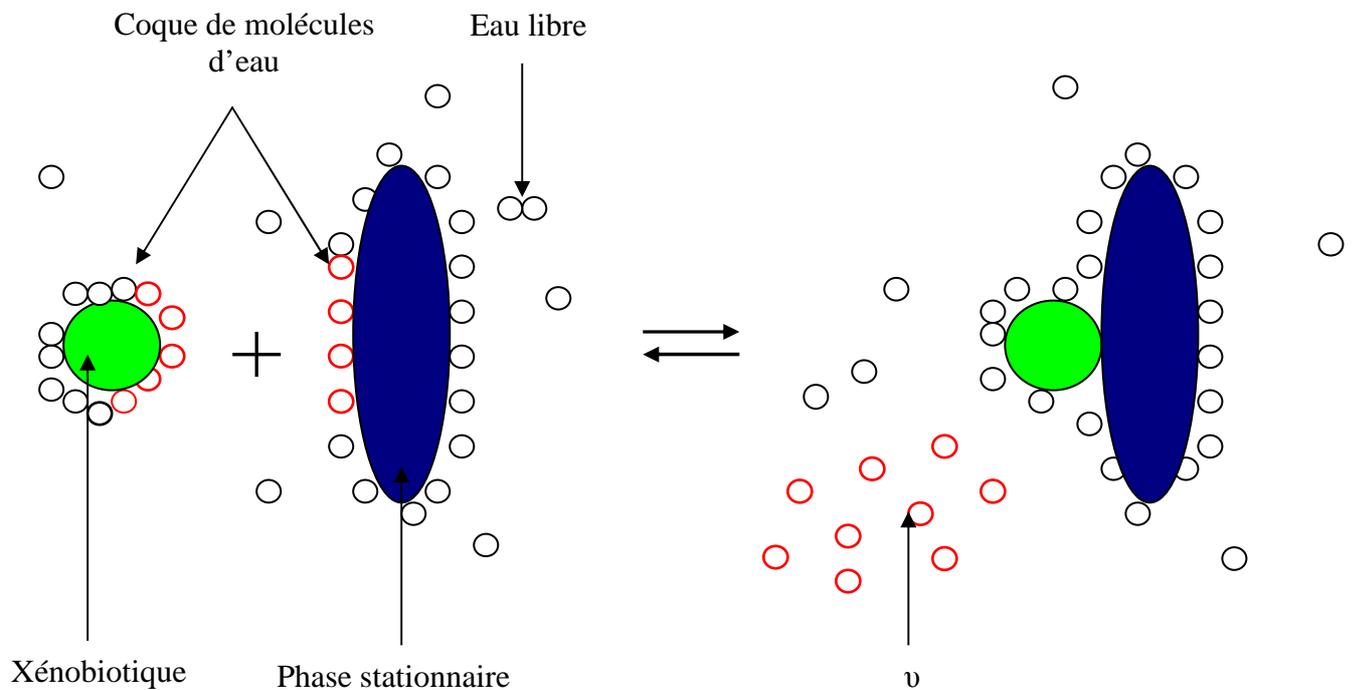


Figure 23 : Libération de v molécules d'eau lors du processus de liaison du ligand sur la phase stationnaire (d'après ANDRÉ 2005)

v a une valeur négative car elle correspond à un nombre de molécules d'eau exclues (figure 23) à l'interface ligand-phase stationnaire. L'effet hydrophobe est donc bien relié à une modification de l'activité de l'eau dans un milieu comme le stipulent de nombreux auteurs (TANFORD 1973, VAN OSS 1996). L'addition d'un cation (comme le Mg^{2+} ou le Ca^{2+}), de sucres ou de polyols diminue cette activité en augmentant l'effet hydrophobe par électrostriction du solvant. Ce phénomène est décrit par l'augmentation de l'enthalpie libre de cavitation des composés hydrophobes dans l'eau, c'est-à-dire l'énergie requise à la formation d'une cavité dans le milieu aqueux destinée à accueillir les composés (GUILLAUME *et al.* 2002b, ANDRÉ *et al.* 2005). Cet effet est directement relié à un accroissement de la pression interne du milieu et donc de la tension de surface du solvant (TIMASHEFF *et al.* 1976, BACK *et al.* 1979, MELANDER et HORVATH 1980). Dans le cas de l'ajout d'un cation Mg^{2+} ou Ca^{2+} dans le milieu d'étude, v correspond au nombre d'ions Mg^{2+} ou Ca^{2+} ($n_{Mg^{2+}}$ ou $n_{Ca^{2+}}$) impliqués dans la liaison xénobiotique-phase stationnaire.

D'un point de vue thermodynamique, la diminution de l'entropie du système molécules hydrophobes-molécules d'eau est une des caractéristiques fondamentales de l'effet hydrophobe à température ambiante.

Les interactions hydrophobes se produisent non seulement entre deux composés hydrophobes mais également entre une unité hydrophobe et une molécule plus hydrophile. Ce dernier cas est le plus fréquemment rencontré en milieu biologique.

B.2.4.1.2. Interactions coulombiennes

Les interactions électrostatiques entre deux ions ont pour contribution principale l'énergie coulombienne entre les charges q_1 et q_2 de ces deux entités. Elles peuvent être attractives ou répulsives. Ce sont des interactions fortes de l'ordre de 150 à 190 kJ/mol voisines de celui des interactions covalentes.

En solution liquide, les ions sont entourés d'entités de charges opposées dans leur voisinage (atmosphère ionique). Cet environnement masque le potentiel de coulomb qui décroît plus rapidement que s'il était réellement isolé. A grande distance caractéristique appelée longueur de Debye, cette décroissance limite la portée des interactions coulombiennes. Elle correspond à l'épaisseur de l'atmosphère ionique entourant les charges et est fonction notamment de l'inverse de la racine carrée de la force ionique du milieu.

Il existe une interconnexion entre les interactions coulombiennes et hydrophobes. En effet quand deux molécules de charges opposées se lient par la formation de paires d'ions, la neutralisation des charges entraîne un accroissement de l'hydrophobicité respective des deux entités (VAN OSS et *al.* 1986, VAN OSS et *al.* 1987). En milieu biologique, les interactions coulombiennes interviennent dans la plupart des processus physico-chimiques (VON OEPEN et *al.* 1991).

B.2.4.2. Interactions secondaires

A la suite du rapprochement du xénobiotique à la surface de la phase stationnaire grâce aux interactions primaires, ce dernier engage alors des interactions de courtes portées appelées interactions secondaires représentées principalement par :

- Les interactions de van des Waals
- Les interactions hydrogènes
- La répulsion stérique

B.2.4.2.1. Interactions de van der Waals

Les forces de van der Waals sont des forces d'origine électriques qui, pour la plupart, proviennent des interactions entre des dipôles permanents ou induits. Ce sont des forces attractives de faible intensité entre molécules, atomes. Les forces de van der Waals peuvent être déclinées en quatre forces plus particulières :

- Les forces de KEESOM : effets d'orientation

KEESOM (KEESOM 1912a, KEESOM 1912b) décrit l'interaction entre dipôles permanents par la relation suivante :

$$E_{Keesom} = -\frac{1}{r^6} \left[\frac{\mu_1 \cdot \mu_2}{3(4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon) \cdot k \cdot T} \right]$$

- Les forces de DEBYE : effets d'induction

DEBYE (DEBYE 1920, DEBYE 1921) décrit l'interaction entre un dipôle permanent ou une molécule polaire et un dipôle induit par celui-ci. L'énergie de cette force est exprimée par la relation :

$$E_{Debye} = -\frac{1}{r^6} \left[\frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_2 + \mu_2^2 \cdot \alpha_1}{(4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon)^2} \right]$$

- Les forces de LONDON : effets de dispersion

LONDON (LONDON 1930, LONDON 1937) montre que dans des atomes neutres, des dipôles fluctuants apparaissent rapidement qui à leur tour provoquent des moments dipolaires induits chez d'autres atomes et, par conséquent, les attirent. Cette énergie d'interaction est représentée par la relation :

$$E_{London} = -\frac{1}{r^6} \left[\frac{3}{4} \cdot \frac{h \cdot \nu \cdot \alpha_1 \cdot \alpha_2}{(4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0)^2} \right]$$

Toutes ces énergies sont inversement proportionnelles à la sixième de la distance moyenne interatomique (r). ϵ_0 est la constante diélectrique du vide, k ou h la constante de Planck, ν la fréquence électronique d'absorption. T est la température absolue, μ les moments dipolaires des molécules considérées et α les polarisabilités électriques.

B.2.4.2.2. Interactions hydrogènes

La liaison hydrogène ou pont hydrogène correspond à une liaison physique non covalente de dipôle-dipôle. Ces liaisons de hautes énergies (quelques dizaines de kJ/mol) se manifestent à chaque fois que des atomes de forte électronégativité s'associent à l'hydrogène (notamment

l'oxygène, l'azote ou le fluor). Cette interaction met en jeu la composante d'orientation de van der Waals (E_{Keesom}) car la charge partielle positive des atomes d'hydrogène provoque une attraction vers les doublets non liants des xénobiotiques. Elle est baptisée « la liaison de la vie » car elle joue un rôle central dans les processus biologiques au niveau moléculaire.

B.2.4.2.3. Répulsions stériques

Ce sont des forces de répulsions qui prédominent à très courte distance dès que les orbitales moléculaires tendent à s'interpénétrer. Dans le cadre d'un processus d'association d'un xénobiotique et d'une macromolécule, il peut y avoir un phénomène de répulsion stérique lorsque les molécules invitées présentent des groupements volumineux susceptibles de contrarier cette association.

***C.* MATERIEL ET MODES
OPERATOIRES**

C.1. Matériel

C.1.1. Appareillage

Le système chromatographique utilisé durant toute l'étude comprend une pompe L 7100 Merck Hitachi (Nogent sur Marne, France), une valve d'injection Rheodyne 7125 (Cotati, Californie, USA) munie d'une vanne d'éjection de 20 μ L et d'un détecteur Shimadzu UV-Visible. Les données de rétention des statines sont obtenues grâce à différentes colonnes chromatographiques :

➤ colonne IAM-PC-DD2 Interchim (Montluçon, France) d'une longueur de 100 mm, de diamètre interne 4,6 mm constituée de particules de silice avec une taille de 120 Å et 12 μ m de diamètre de pore greffées avec des chaînes de phosphatidylcholine.

➤ colonne MODULO-CART HS UPTISPHERE 3 NH₂ Interchim (Montluçon, France) d'une longueur de 50 mm et de diamètre interne 4,6 mm constituée de particules de silice avec une taille de 120 Å et 12 μ m de diamètre de pore.

➤ colonne en acier vide Interchim (Montluçon, France) d'une longueur de 50 mm et de diamètre interne 4,6 mm constituée de particules de silice avec une taille de 60 Å et 10 μ m de diamètre de pore.

C.1.2. Réactifs et molécules étudiées

Les phases mobiles utilisées sont constituées de différents produits en fonction des expériences réalisées :

- Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (Prolabo, Paris, France)
- Acide borique/Borate de sodium (Prolabo, Paris, France)
- Méthanol et acétonitrile (Carlo Erba, Val de Reuil, France)

- L'eau CLHP est obtenue grâce au système Elgastat Odil (Talant, France) puis dégazée par sonification
- Chlorure de magnésium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France)
- Chlorure de calcium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France)
- Sodium azide, chlorure de sodium, N,N'-Disuccinimidyl carbonate (DSC), glycine, acide citrique, nitrate de sodium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France)

Les xénobiotiques et les protéines étudiés sont :

- Statines i.e. pravastatine, mévastatine, atorvastatine, simvastatine et fluvastatine (Sigma-Aldrich et VWR, Paris, France)
- Rifamycine (Sigma-Aldrich, Paris, France)
- Oatp2 de rat – MM = 54000 daltons (Interchim, Montluçon, France)

***C.2.* Modes opératoires**

La plupart des injections ont été répétées trois fois et la détection des molécules étudiées à la sortie des colonnes est réalisée à une longueur d'onde de 254 nm ou 280 nm en fonction de leur structure chimique.

C.2.1. Etude de la fixation des statines sur la MAI

C.2.1.1. Evaluation de la lipophilie : concept de log

$$k'_{w-MAI}$$

Pour étudier le caractère lipophile des molécules de statines, le milieu d'étude (i.e., la phase mobile) est constituée d'un mélange tampon phosphate (0,05 M ; pH = 7,0)/méthanol. Le pourcentage de méthanol dans ce mélange varie de 30 à 60 %. Le débit du milieu d'étude est maintenu constant à 0,5 ml/min pour la pravastatine, la mévastatine et l'atorvastatine et à 0,7 ml/min pour la simvastatine et la fluvastatine. Pour une colonne maintenue à 37°C, 20 µl d'échantillon à 1 mM sont injectés. Les temps morts sont déterminés à l'aide de l'acide citrique. Le facteur de rétention k' de chaque molécule de statine est alors calculé (équation 4). La relation entre le facteur de rétention k' de la statine sur la MAI et le pourcentage de méthanol (x) dans le milieu d'étude peut être décrite comme suit :

$$\log k' = A x^2 - S x + D \quad (11)$$

Où A , S et D sont des constantes. D représente le logarithme du facteur de rétention ($\log k'$) de la molécule de statine sur la MAI à 0% de méthanol dans le milieu d'étude et est noté $\log k'_{w-MAI}$. Ce dernier est calculé pour chaque molécule de statine par extrapolation à $x = 0$ de la courbe $\log k'$ versus x (Eq. 11). Selon BRAUMANN, les logarithmes des facteurs de rétention à 0% de méthanol ou à 100% de phase aqueuse est identique au $\log P$ (BRAUMANN et *al.* 1983). Le $\log k'_w$ c'est-à-dire le logarithme du facteur de rétention à 100% d'eau a été démontré comme un paramètre de mesure spécifique du caractère hydrophobe ou lipophile du xénobiotique (HULSHOFF et PERRIN 1976, BRAUMANN et *al.* 1983). La lipophilie moléculaire est un paramètre de référence pour prédire la diffusion passive des statines à travers les membranes biologiques (LEO et *al.* 1971).

C.2.1.2. Effet du pH

Le milieu d'étude (phase mobile) est constitué d'un mélange tampon phosphate (0,05 M)/méthanol dans les proportions de 60/40 (v/v). Elle est ajustée à différents pH variant entre 5,7 et 7,0 (5,7 ; 6,0 ; 6,3 ; 6,7 et 7,0) et la colonne MAI est maintenue à différentes températures allant de 10 à 37°C (10, 15, 20, 25, 30, 35 et 37°C). L'élution des statines se fait à un débit constant de 0,5 ml/min pour la pravastatine, la mévastatine et l'atorvastatine et à un débit de 0,7 ml/min pour la simvastatine et la fluvastatine. Pour chaque pH du milieu d'étude et à chaque température de la colonne, 20 µl d'échantillons à 1 µM sont injectés successivement dans le système chromatographique et la diffusion passive des statines représentée par le facteur de rétention k' sont déterminées. A chaque condition de l'étude, l'acide citrique est injecté pour déterminer le temps mort.

C.2.1.3. Effet du magnésium et du calcium

Le milieu d'étude (phase mobile) est constitué d'un mélange de tampon acide borique/borate (pH = 7,0) et méthanol dans les proportions de 60/40 (v/v). Les débits de la phase mobile sont les mêmes que ceux utilisés dans l'étude du pH. Les effets des ions magnésium et calcium sur la diffusion passive (i.e., k') des statines sont étudiés en ajoutant dans le milieu d'étude des concentrations variant entre 0,00 à 2,60 mM et 0,00 à 3,25 mM pour le magnésium et le calcium respectivement. Les gammes de concentrations étudiées contiennent les concentrations biologiques des deux cations soient entre 0,75 et 0,90 mM pour le magnésium et entre 2,25 et 2,65 mM pour le calcium. La température de la colonne est comprise entre 5 et 45°C. 20 µl de solution de statine à 1 µM sont injectés et la diffusion passive (k') de chaque statine déterminée.

C.2.2. Etude de la fixation des statines sur l'Oatp2

C.2.2.1. Immobilisation « *in-situ* » de l'Oatp2

Les techniques d'immobilisation peuvent se faire de plusieurs façons soit (i) de manière « *in-situ* » soit (ii) de manière « *in-batch* ». L'immobilisation « *in-situ* » consiste à faire circuler les protéines directement à l'intérieur de la colonne contenant le support chromatographique constitué de particules de silice propylamine.

L'immobilisation « *in-situ* » de l'Oatp2 est effectuée sur des particules de silice propylamine (particules de silice greffées avec des groupements NH₂). L'Oatp2 est immobilisée à partir de son groupement amine sur des particules de silice propylamine. Cette immobilisation covalente entre des groupements amines nécessite l'activation des particules de silice propylamine en présence de DSC. Le DSC est également utilisé pour éliminer la présence des groupements imines restants. La colonne NH₂ est lavée avec de l'acétonitrile à débit 0,5 ml/min. La phase stationnaire est activée continuellement avec une solution de 2,25 g de DSC dans 100 ml d'acétonitrile pendant 18 h en circuit fermé. Ensuite la colonne est lavée en premier temps avec 60 ml d'acétonitrile, puis 60 ml de tampon phosphate (1 mM ; pH = 7,0). 500 µg d'Oatp2 sont dissous dans 10 ml de tampon phosphate (1 mM ; pH = 7,4) et la solution obtenue est circulée de façon continue à faible débit (0,3 ml/min) dans la colonne. Après 40 h d'immobilisation, la colonne est lavée avec 200 ml de tampon phosphate (20 mM ; pH = 7,4), 200 ml de solution de chlorure de sodium et finalement avec 100 ml de solution de glycine (0,2 M) afin de bloquer les groupements restés actifs. A la fin, la colonne est rincée puis stabilisée avec du tampon phosphate (50 mM ; pH = 7,4). Les réactions chimiques qui se produisent tout au long du greffage de l'Oatp2 sur les particules de silice propylamine sont détaillées dans la figure ci-dessous :

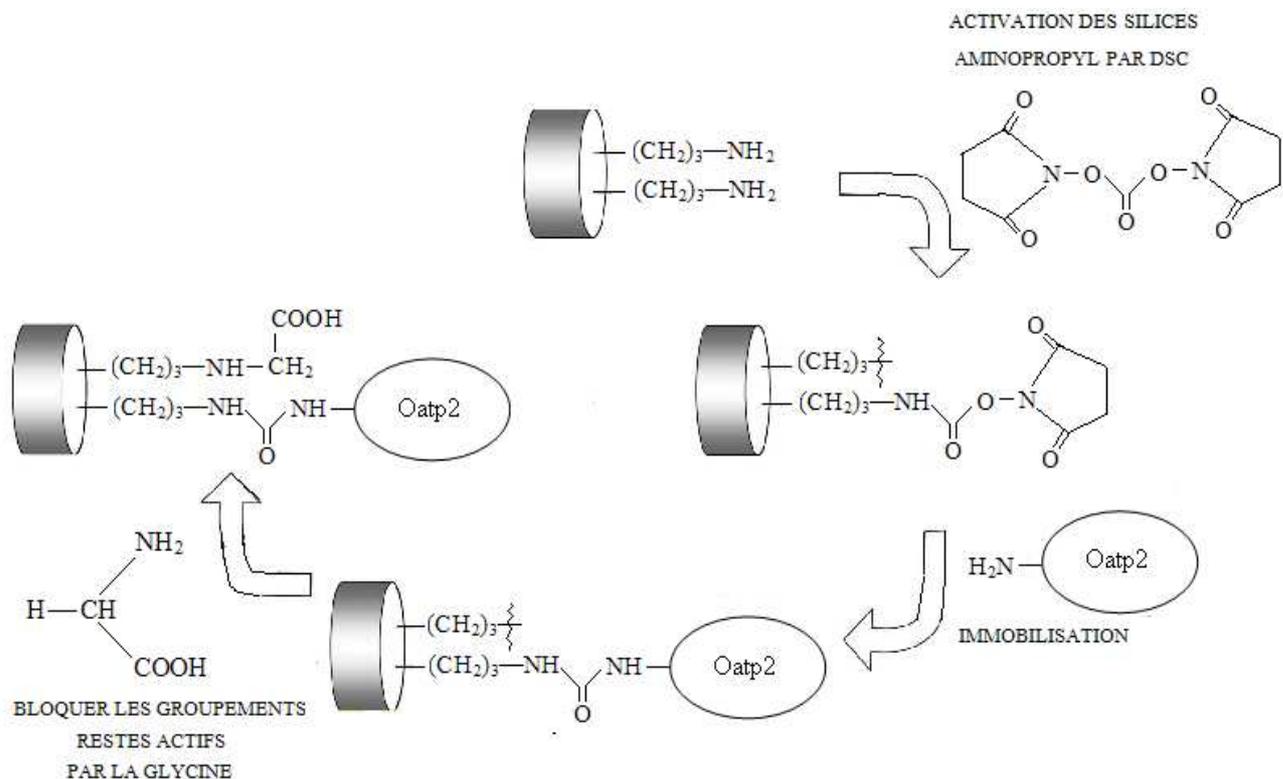


Figure 24 : Immobilisation de l'Oatp2 sur des particules de silice propylamine par le DSC

La masse totale de protéine immobilisée dans la colonne est déterminée à partir de quatre fractions de la phase stationnaire. Elle est de 425 µg d'Oatp2. La différence maximum relative de la quantité de protéine immobilisée entre ces différentes mesures ne dépasse pas 0,5% prouvant une distribution homogène de l'Oatp2 sur le support chromatographique.

C.2.2.2. Effet du magnésium

Le milieu d'étude (phase mobile), maintenu à un débit de 0,3 ml/min, est constituée d'un tampon phosphate (0,05 M ; pH = 7,4). Des concentrations de magnésium variant entre 0,00 et 3,00 mM (0,00 ; 0,60 ; 1,00 ; 1,40 ; 1,80 ; 2,20 et 3,00 mM) sont ajoutées respectivement dans le milieu d'étude. Les expériences sont effectuées entre 10 et 35°C. 20 µl d'une solution de statine à 1 µM ou de rifamycine à la même concentration sont injectés dans la valve et

entraînée par l'intermédiaire d'une pompe dans la colonne Oatp2. Les xénobiotiques sont élués et détectés à 254 nm pour les statines et 280 nm pour la rifamycine. Les temps de rétention sont déterminés et la diffusion facilitée (i.e., k') est calculée. Le nitrate de sodium est utilisé pour déterminer le temps mort.

C.2.3. Etude de la fixation des statines sur un extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2

C.2.3.1. Réactifs et matériel

En fonction des expériences réalisées, les réactifs et xénobiotiques suivants ont été utilisés :

- Dexaméthasone (DEX), prégnenolone-16 α -carbonitrile (PCN), bézafibrate (BEZA) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France)
- Particules de silice LiChrospher Si60 (10 μ m) [Merck, France]
- EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), Hépès (N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid), chlorure de calcium CaCl₂, collagénase IV, Percoll, (Sigma Aldrich, Saint-Quentin, France)
- Sérum de veau fœtal, Milieu de culture Williams' E, HBSS (Hank's Buffered Salt Solution), Pénicilline/streptomycine, insuline (Fisher Bioblock, France)
- Tris-HCl (Tris Hydrochloride) [Prolabo, Paris, France]
- Kit BSA (Sérum Albumine Bovine) [Sigma Aldrich, Saint-Quentin, France]
- Plaques de culture 6 puits et boîtes de Pétri de 60 mm tapies de collagène type I (Dutscher, France)
- Trizol® (Invitrogen, France)

C.2.3.2. Culture *in vitro* et induction de l'Oatp2 hépatocytaire

Dans notre recherche nous nous focalisons sur les OATPs des hépatocytes. Pour cela des hépatocytes de rat sont isolés et mis en culture en présence de différents composés permettant de faire surexprimer l'Oatp impliqué dans la diffusion des statines, l'Oatp2.

Le foie d'un rat mâle Wistar (Charles River, France, 280 g) est perfusé à partir de la veine porte par un tampon Hépès supplémenté par de l'EGTA (0,6 M), et préalablement mis à 37°C à un débit de 25 ml/min pendant 10 min. Ensuite un tampon Hépès supplémenté par CaCl₂ (5 mM) + collagénase type IV (100U/ml) est circulé dans le foie pendant 8 min à un débit de 25 ml/min. Le foie est ensuite délicatement retiré et placé dans une boîte de pétri stérile contenant de l'HBSS froid. La capsule de Glisson est découpée et le foie est mécaniquement écrasé afin de libérer les cellules isolées. Après filtration sur un filtre de nylon, la suspension cellulaire est lavée 2 fois avec de l'HBSS froid puis on réalise une purification de cette suspension cellulaire sur gradient de Percoll (33%). Le nombre de cellules totales ainsi que la viabilité cellulaire sont déterminés par un comptage au bleu de trypan. Ce colorant possède la caractéristique de pénétrer dans les cellules mortes dont la perméabilité membranaire est modifiée et les colore. La viabilité cellulaire de notre préparation est estimée à 80,9%. Les cellules sont alors mises en culture dans différents types de supports (plaques 6 puits à raison de 1,5 10⁶ cellules/ puits ou dans des boites de pétri de 60 mm de diamètre à raison de 3,5 10⁶ cellules/ boîte) dans un milieu de culture Williams' E, supplémenté avec 10% de sérum veau fœtal, 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine, 4 µg/ml d'insuline et 0,1 µM de dexaméthasone. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C dans une atmosphère saturée en eau avec une teneur en air de 95% et en CO₂ de 5%. Après 4h d'incubation, le milieu de culture est changé et remplacé par le même milieu Williams'E mais sans sérum de veau fœtal. Ensuite, à cet instant et pour les besoins de notre recherche, les cellules sont subdivisées en

quatre groupes. Chaque groupe est constitué de quatre boîtes de pétri de 60 mm et d'une plaque de culture 6 puits.

- Un groupe contrôle (CONTROL) : aucun inducteur n'est ajouté à ces cultures
- Un groupe traité avec de la dexaméthasone (DEX) à 50 μM
- Un groupe traité avec de la prégnenolone (PCN) à 100 μM
- Un groupe traité avec du bézafibrate (BEZA) à 250 μM

Le milieu de culture de chaque groupe est ensuite renouvelé chaque jour.

Après 48h de traitement, les cellules contenues dans les plaques 6 puits sont grattées avec une solution commerciale Trizol® afin d'étudier l'expression des ARNm. L'extraction des ARN totaux, la synthèse des ADN complémentaires et les PCR quantitatives ont été réalisées selon (ALVERGNAS et *al.* 2009).

Après 72h de traitement, les cellules contenues dans les boîtes de pétri sont grattées avec une solution de Tris-HCl (50 mM ; pH = 7,4) afin de finaliser la préparation de l'extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2 qui sera ensuite immobilisé sur le support chromatographique remplissant la colonne.

Dans les deux cas, les échantillons sont stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

C.2.3.3. Préparation de l'extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2

Les échantillons après décongélation, sont centrifugés à 1000 g pendant 10 min (YANG et *al.* 2008). Toutes les expériences sont alors réalisées à 4°C. Le culot obtenu est remis en suspension dans de l'eau ultra-pure puis laissé reposer pendant 30 min. Il est ensuite soumis aux ultra-sons pendant 10 min et centrifugé à 2000 g pendant 20 min. Le surnageant obtenu est centrifugé à 12000 g pendant 20 min. Le culot obtenu est ensuite récupéré et remis en

suspension dans une solution de Tris-HCl (50 mM ; pH = 7,4). La concentration en protéines membranaires est déterminée à l'aide du kit de Pierce. Une gamme d'étalonnage de la protéine Sérum Albumine Bovine (bovine serum albumin BSA) est réalisée et le dosage des protéines membranaires dans nos échantillons est effectué à partir de 20 µl d'échantillon et de 200 µl de réactif de Pierce (acide bicinchoninique BCA et cuivre II). Après une incubation à 37°C pendant 30 min, la densité optique est déterminée par spectrophotométrie à 570 nm. Les concentrations de protéines membranaires des quatre groupes de traitement obtenues à l'aide de la courbe d'étalonnage de BSA sont les suivantes :

- 7,6 mg/ml pour le groupe CONTROL
- 8,8 mg/ml pour le groupe traité avec la DEX
- 6,0 mg/ml pour celui traité avec la PCN
- 9,4 mg/ml pour le groupe traité avec le BEZA

Les extraits membranaires surexprimés ou non en Oatp2 (CMC_{Oatp2+/-}) sont alors stockés à – 80°C.

***C.2.3.4.* Immobilisation « *in-batch* » de l'extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2 sur des particules de silice**

Quatre colonnes chromatographiques sont préparées à partir des quatre groupes d'hépatocytes traitées. Les colonnes seront nommées tout au long de l'étude CMC_{CONTROL}, CMC_{DEX}, CMC_{PCN} et CMC_{BEZA}. CMC renvoie à Chromatographie Membrane Cellulaire. Pour chaque colonne chromatographique, toutes les expérimentations ci-dessous sont effectuées de la même manière et à 4°C. L'immobilisation « *in-batch* » consiste à immobiliser d'abord

l'extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2 sur des particules de silice puis de remplir le mélange dans une colonne chromatographique en acier.

Les particules de silice (10 μm de diamètre et 60 \AA de taille) sont activées à 120°C pendant 8 h puis placées dans un dessiccateur pendant 1 h. L'activation des particules de silice (Si-OH) par la température va les rendre plus adsorbantes et augmenter ainsi le nombre de groupements hydroxyles (—OH) disponibles. Ensuite, 3 ml de Tris-HCl (50 mM ; pH = 7,4) contenant 500 μg de suspension protéique sont versées doucement dans un tube à réaction contenant les particules de silice activées. L'adsorption des protéines membranaires se fait en ultrasoniquant jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint c'est-à-dire jusqu'à ce que le mélange soit bien homogène (environ entre 1 h et 2 h). Après l'équilibre, un volume égal d'eau ultra pure (3 ml) est dilué dans la préparation pour permettre aux phospholipides des membranes cellulaires de fusionner entre eux autour de la surface des particules de silice. Le surnageant de la préparation protéique est éliminée après centrifugation à faible vitesse (1000 g) pendant 7 min. Le culot est lavé avec du tampon Tris-HCl (50 mM ; pH = 7,4) jusqu'à ce qu'aucun résidu de membranes cellulaires ne reste en suspension.

Ce culot est ensuite rempli sous faible pression dans une colonne chromatographique (50 mm de longueur et 4,6 mm de diamètre interne) qui est ensuite équilibrée avec une solution tampon phosphate (50 mM ; pH = 7,4). La température de la colonne est maintenue à 37°C. Pour permettre un meilleur fonctionnement des colonnes chromatographiques, toutes les manipulations seront effectuées au pH et à la température physiologiques soient pH = 7,4 et T = 37°C.

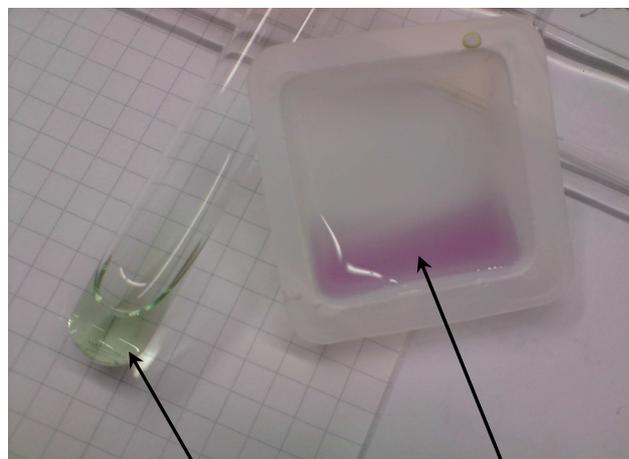
La présence des protéines membranaires sur les particules de silice est détectée avec le réactif de Pierce (mélange de 5 ml d'acide bicinchoninique et 100 μl de cuivre II). Une suspension de l'extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2 immobilisé sur les particules de silice est diluée dans le réactif de Pierce et incubée pendant 30 min à 37°C. La coloration de la suspension en pourpre ou mauve atteste de la présence de protéines membranaires (figure 25). La concentration totale de protéines est alors corrélée avec l'intensité de la coloration de la

solution en pourpre. La réaction qui conduit à la formation de la couleur pourpre est fortement influencée par la présence d'un des quatre résidus d'acides aminés (la cystéine, la cystine, la tyrosine ou le tryptophane) dans la séquence de la protéine. Cette couleur pourpre est donc due à la réduction du cuivre II en cuivre I par la protéine en milieu alcalin.



Silice greffée avec protéines + réactif de Pierce

Silice pure + réactif de Pierce



Réactif de Pierce

Silice greffée avec protéines + réactif de Pierce

Figure 25 : Détection des protéines membranaires par le réactif de Pierce

***D.* RESULTATS ET DISCUSSION**

D.1. Analyse de l'association des statines avec la Membrane Artificielle Immobilisée (MAI)

Ce travail a donné lieu à **deux publications** dans des revues internationales à comité de lecture et à **une publication soumise**:

SARR F.S., ANDRÉ C., GUILLAUME Y.C.

Statins (HMG-coenzyme A reductase inhibitors)-biomimetic membrane binding mechanism investigated by molecular chromatography.

Journal of Chromatography B, **2008**, 868 : 20-27

SARR F.S., GUILLAUME Y.C., ANDRÉ C.

Magnesium cation effect on passive diffusion of statin molecules: Molecular chromatography approach.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2008**, 47 : 651-657

SARR F.S., GUILLAUME Y.C., THOMASSIN M., ANDRÉ C.

Biochromatographic framework for analysing calcium chloride salt effect on statin passive diffusion to an Immobilized Artificial Membrane (IAM).

Submitted to *Anal Chim Acta*

D.1.1. Etude de la diffusion passive des statines

Comme nous l'avons vu dans le chapitre **B.1.1.**, la MAI est un modèle qui permet d'étudier la diffusion passive des xénobiotiques. Les facteurs de rétention k' calculés à partir des temps de rétention permettent de refléter la diffusion passive des statines. Les valeurs des k' des statines calculées à 25°C et à pH = 7,0 sont rassemblées dans le tableau ci-dessous :

Statines	k'
Pravastatine	0,31
Mévastatine	2,84
Atorvastatine	3,76
Simvastatine	7,59
Fluvastatine	7,76

Tableau 2 : Diffusion passive (représentée par k') des statines à pH = 7,0 et à T = 25°C

Sur la monocouche lipidique, l'ordre de diffusion passive des statines est la suivante :

Pravastatine <<< mévastatine < atorvastatine << simvastatine ≤ fluvastatine

Cette évolution semble être modulée par le degré de lipophilie des molécules de statines. En effet, la pravastatine (figure 2), une molécule hydrophile, présente la plus faible affinité avec la membrane. La fluvastatine présente avec la simvastatine la plus forte affinité avec la MAI. La forte diffusion passive de la fluvastatine est liée à une augmentation de sa lipophilie apparente due à ses nombreuses liaisons hydrogènes intramoléculaires (HAMELIN et TURGEON 1998). Ces résultats nous ont amenés à étudier l'importance de la lipophilie moléculaire dans la diffusion passive des statines.

D.1.2. Lipophilie moléculaire des statines

La lipophilie moléculaire déterminée par le coefficient de partage *n*-octanol/eau ($\log P$) est un paramètre important à tenir en compte dans la prédiction des propriétés pharmacologiques des xénobiotiques. Elle permet une appréciation du degré de lipophilie du xénobiotique et donc sa capacité à diffuser facilement à travers les membranes biologiques (LEO et *al.* 1971, PIDGEON et *al.* 1995). Afin de caractériser la lipophilie des cinq statines, une étude de l'affinité de ces molécules sur la monocouche lipidique est effectuée. La MAI mime la membrane cellulaire et permet la détermination des logs k'_{w-MAI} des statines. Ces derniers seront comparés aux logs P théoriques des statines obtenus par le logiciel *XLogP* (base de données de PubChem).

Ainsi pour chaque molécule de statine et à chaque pourcentage de méthanol x dans le milieu d'étude (v/v), les temps de rétention t_r sont mesurés et les facteurs de rétention k' calculés (équation 1). Un exemple de chromatogramme de la fluvastatine est représenté ci-dessous :

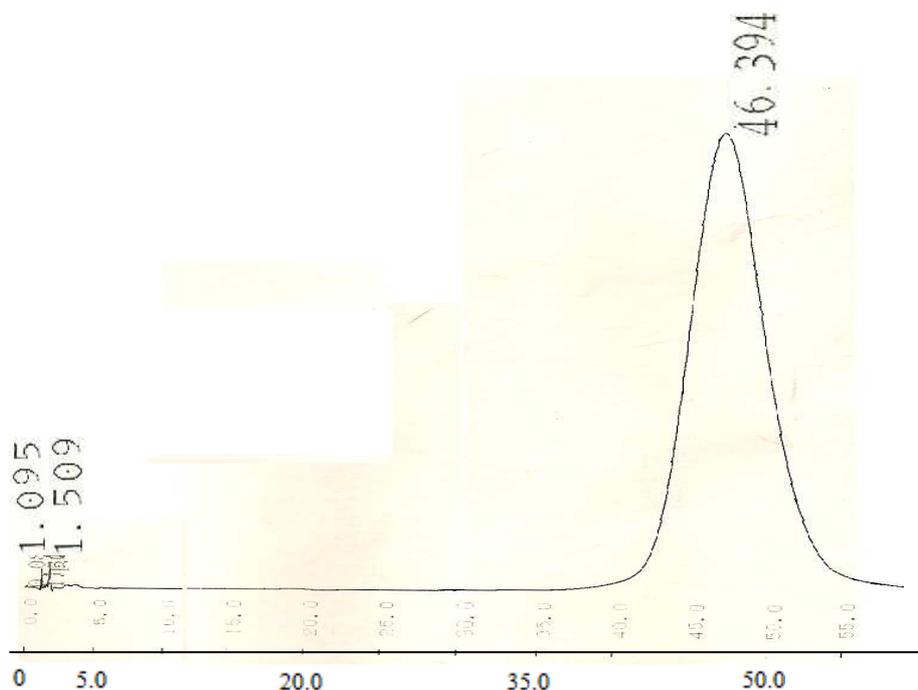


Figure 26 : Chromatogramme obtenu pour la fluvastatine à 25°C (phase mobile : méthanol/tampon phosphate, 30/70 v/v et pH=7,0)

Une extrapolation à 0% de méthanol est effectuée pour obtenir les valeurs de $\log k'_{w-MAI}$ des statines. La figure 27 représente la courbe $\log k'$ de la pravastatine en fonction du pourcentage de méthanol (x) dans la phase mobile.

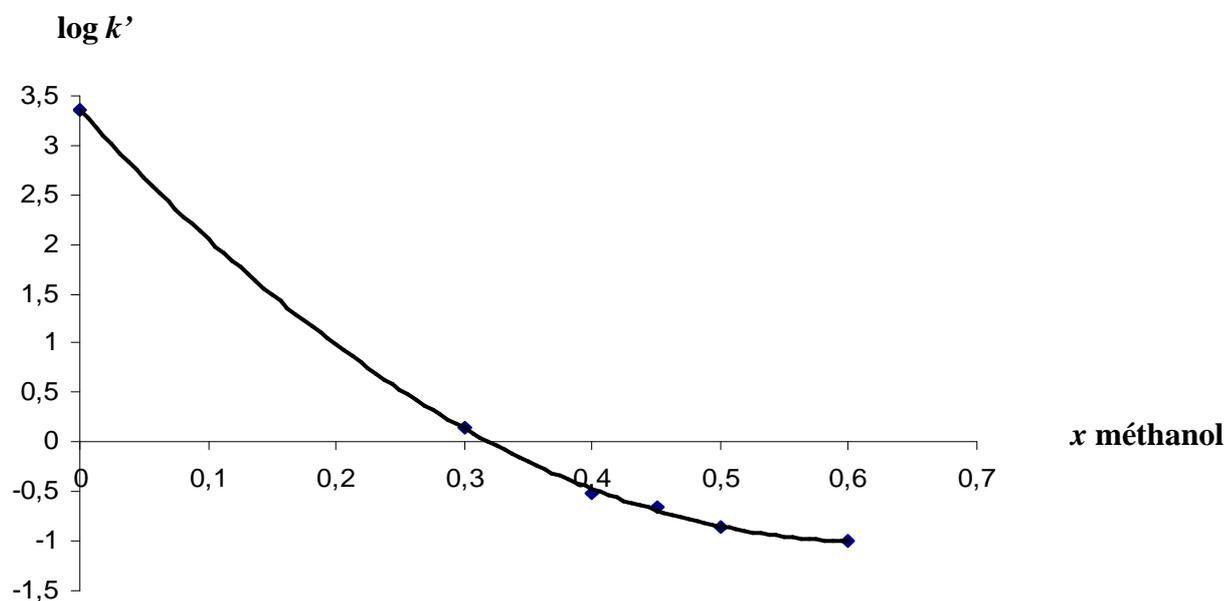


Figure 27 : Variation des valeurs de $\log k'$ de la pravastatine à 25°C en fonction du pourcentage de méthanol x dans le milieu d'étude

Cette variation de $\log k'$ en fonction du pourcentage de méthanol est identique pour toutes les autres molécules de statines avec un coefficient de corrélation $r^2 > 0,999$. Les valeurs de $\log k'_{w-MAI}$ obtenues à 25°C après extrapolation à 0% de méthanol ainsi que les logs P théoriques de toutes les statines sont consignées dans le tableau suivant :

Statines	$\log k'_{w-MAI}$	$\log P^*$
Pravastatine	3,36	2,20
Mévastatine	4,06	4,00
Atorvastatine	5,35	5,70
Simvastatine	4,90	4,70
Fluvastatine	4,45	4,50

Tableau 3 : Valeurs des logs P et k'_{w-MAI} des statines

*Données obtenues sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pccompound>

Les résultats obtenus démontrent que la pravastatine a l'affinité la plus faible avec la monocouche lipidique. Ceci peut être expliqué par le caractère hydrophile de cette molécule ($\log k'_{w-MAI} = 3,36$ et $\log P = 2,20$). En effet, la diffusion passive d'un xénobiotique à travers la membrane cellulaire se fait grâce à sa lipophilie. La membrane cellulaire est constituée d'une bicouche lipidique et la MAI d'une monocouche lipidique ce qui implique que l'affinité d'une molécule hydrophile est très faible et même nulle.

La comparaison des valeurs de $\log k'_{w-MAI}$ et de $\log P$ montre une courbe linéaire avec un coefficient de corrélation ($r^2 = 0,95$, tableau 3). Cette excellente corrélation suggère que les statines interfèrent avec la tête polaire de la monocouche lipidique. En effet, la MAI est constituée d'une partie non-polaire liée aux particules de silice mais elle offre, avec ses chaînes de phosphatidylcholines, une partie polaire ou tête polaire qui représente le premier site de contact des xénobiotiques. Ainsi la diffusion passive des statines augmente avec leur degré de lipophilie. Ce résultat confirme l'intervention des interactions hydrophobes et leur importance dans la diffusion passive des statines.

La pravastatine présente la plus faible diffusion passive et son caractère hydrophile suggère que son transport à travers la membrane cellulaire se fait grâce à un transporteur membranaire.

Pour atteindre le site actif de l'enzyme clé dans la biosynthèse de cholestérol, HMG-coenzyme A réductase, les statines doivent traverser la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. En effet, le site actif de cette enzyme est localisé dans le cytosol des hépatocytes. Ainsi une comparaison entre la concentration inhibant 50% l'enzyme (CI50) et le degré de lipophilie des statines est analysée. La figure 28 montre une courbe linéaire entre le $\log k'_{w-MAI}$ et les CI50 des statines avec un coefficient de corrélation $r^2 > 0,96$. Cette relation montre que plus la statine est lipophile et traverse facilement la membrane cellulaire plus elle accède à son site actif et inhibe de façon compétitive l'HMG-coenzyme A réductase. Les valeurs des CI50 des statines sont représentées dans le tableau 4 dans le chapitre **A.2.3.** La pravastatine, la molécule la plus hydrophile, a une CI50 de 44 nM alors que les autres statines

plus lipophiles telles que la simvastatine présente une CI50 de 9 nM quatre fois plus faible que celle de la pravastatine.

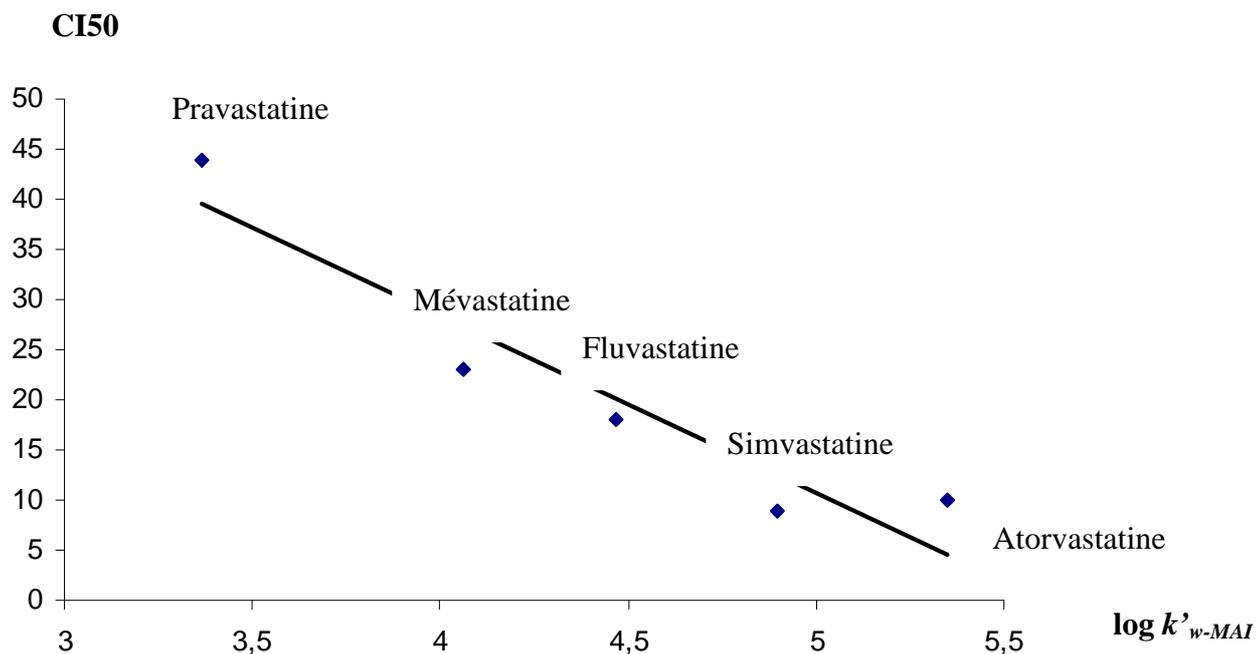


Figure 28 : Comparaison entre les valeurs de $\log k'_{w-MAI}$ à 37°C et la CI50 des statines

La diffusion passive des xénobiotiques est également influencée par leur degré d'ionisation. En effet le pH de l'organisme joue un rôle important dans le processus de passage membranaire des xénobiotiques.

D.1.3. Effet du pH sur la diffusion passive des statines

Le pH est un paramètre physico-chimique très important au niveau de l'organisme et la plupart des xénobiotiques tels que les molécules de statines peuvent s'ioniser. Il joue un rôle clé dans les processus de transport membranaire des xénobiotiques. Il est donc intéressant d'étudier l'effet de ce paramètre sur la diffusion passive des statines. Ainsi le mécanisme d'association des statines sur la Membrane Artificielle Immobilisée (MAI), qui reflète comme

nous l'avons vu dans le chapitre **B.1.1**. la diffusion passive, est étudié en fonction de la variation du pH dans le milieu d'étude. Cette étude est effectuée à différentes températures. Pour chaque molécule de statine et à chaque pH, les temps de rétention sont mesurés et la diffusion passive (k') déterminée. Ce pH varie entre 5,7 et 7,0. La courbe du logarithme du facteur de rétention ($\log k'$) est tracée en fonction du pH. La courbe $\log k'$ de la simvastatine en fonction du pH à 25°C est représentée sur la figure 29.

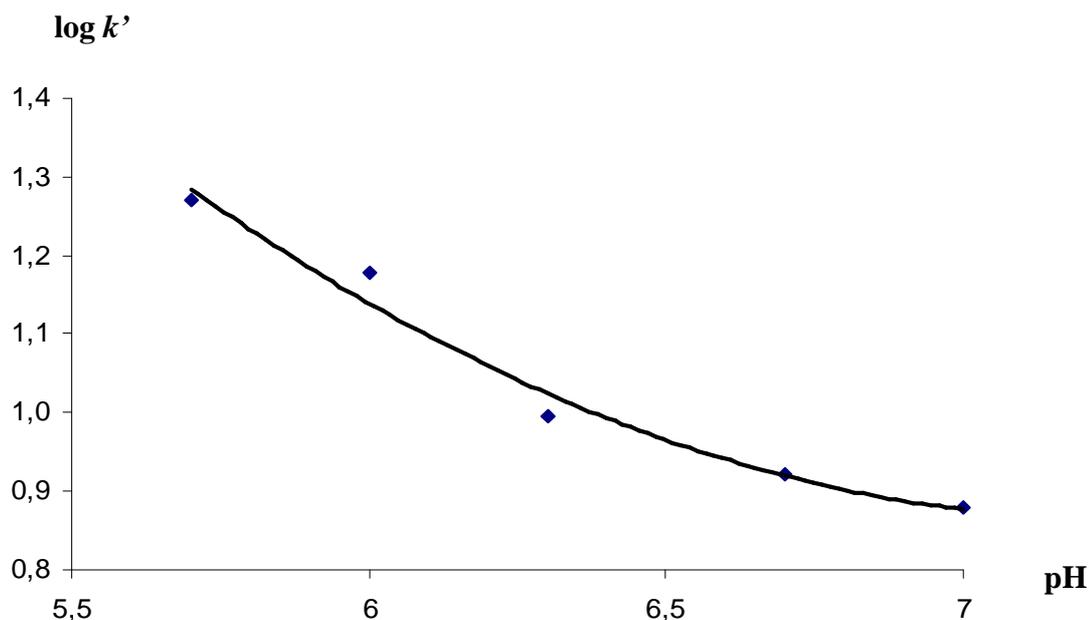


Figure 29 : Courbe du $\log k'$ de la simvastatine en fonction du pH à 25°C

C'est une courbe non linéaire quadratique de type $\log k'(\text{pH}) = a\text{pH}^2 - b\text{pH} + c$ avec a , b et c des constantes ($r^2 \geq 0,98$ avec $a = 0,17$, $b = 2,48$ et $c = 9,89$). L'allure de la courbe est similaire pour toutes les autres molécules de statines.

L'affinité des statines sur la monocouche lipidique est pH-dépendante, plus le pH est acide plus l'association statine-MAI est forte. L'évolution de la courbe démontre l'existence d'une courbure à un pH critique (pH_c) qui se situe autour de $\text{pH} = 7,0$. A partir de ces courbes, le pH critique théorique des statines a été déterminé et est égal à 6,96 ; 7,37 ; 7,36 ; 7,27 et 7,25 pour respectivement la pravastatine, la mévastatine, l'atorvastatine, la simvastatine et la fluvastatine.

- Pour les $\text{pH} \ll \text{pH}_c$, une diminution initiale est observée suivie d'une faible variation de l'association statine-MAI aux $\text{pH} > \text{pH}_c$. Pour ces pH plus acides, les statines sont dans une forme moléculaire et leurs groupements carboxyliques ne sont pas ionisés ou faiblement ionisés. Le tableau ci-dessous représente les valeurs de pKa des molécules de statine.

Statines	Pravastatine	Mévastatine	Atorvastatine	Simvastatine	Fluvastatine
pKa	4,36	-	3,95	4,45	4,15

Tableau 4 : Valeurs des pKa des molécules de statine

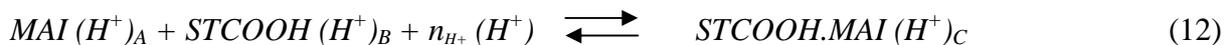
La diffusion passive des xénobiotiques à travers les membranes biologiques se fait plus facilement sous leur forme neutre qu'ionisée. En effet l'état d'ionisation de la molécule, qui dépend de son pKa et du pH du milieu d'étude, joue un rôle important dans sa capacité à traverser les membranes biologiques (PANDIT 2007). Ceci pourrait expliquer l'augmentation de l'affinité des statines pour la monocouche lipidique aux pH très acides ($\text{pH} \ll \ll \text{pH}_c$) et donc de leur diffusion passive.

- Pour les $\text{pH} < \text{pH}_c$, la proportion de la forme ionisée des molécules de statine est plus importante que celle de la forme neutre. Ceci provoque l'augmentation des répulsions électrostatiques entre les groupements carboxyles ($-\text{COO}^-$) des molécules de statine et les groupements phosphates ($-\text{POO}^-$) de la MAI. Ces forces de répulsions ne sont pas favorables à la diffusion passive des statines.

L'évolution non-linéaire de la courbe $\ln k'$ en fonction du pH démontre que le mécanisme de liaison des statines sur la MAI n'est pas seulement gouverné par des liaisons hydrophobes, des interactions de van der Waals et hydrogènes.

Pour mieux apprécier l'effet du pH sur la diffusion passive des statines, le nombre de protons H^+ (n_H^+) impliqué dans le mécanisme d'association statine-MAI est calculé à chaque pH du

milieu d'étude. Lorsque le pH du milieu d'étude change, la relation entre la monocouche lipidique (MAI), les statines (STCOOH) et le complexe statine-MAI (STCOOH.MAI) est la suivante :



Où $n_{H^+} = C - (A + B)$ est le nombre d'ions H^+ impliqué dans l'association statine-MAI.

La constante d'association K de cet équilibre est donnée par l'équation :

$$K = [STCOOH.MAI] / ([MAI] [STCOOH] [H^+]^{n_{H^+}}) \quad (13)$$

L'équation (13) peut être écrite comme suit :

$$K = K_0 / [H^+]^{n_{H^+}} \quad (14)$$

Avec K_0 représente les valeurs de K pour $[H^+] = 1$ mM. Le logarithme de l'équation (14) est :

$$\log K = \log K_0 - n_{H^+} \log [H^+] \quad (15)$$

Après dérivation de l'équation (15), on obtient :

$$\partial \log K / \partial \text{pH} = n_{H^+} \quad (16)$$

D'après les équations (7) et (16) on a :

$$\partial \log k' / \partial \text{pH} = n_{H^+} \quad (17)$$

Ainsi le n_{H^+} est calculé à partir de l'équation de la droite $\log k'$ en fonction du pH.

La figure 30 ci-dessous représente la variation du nombre d'ions H^+ exclus (n_{H^+}) lors de l'association statine-MAI en fonction du pH.

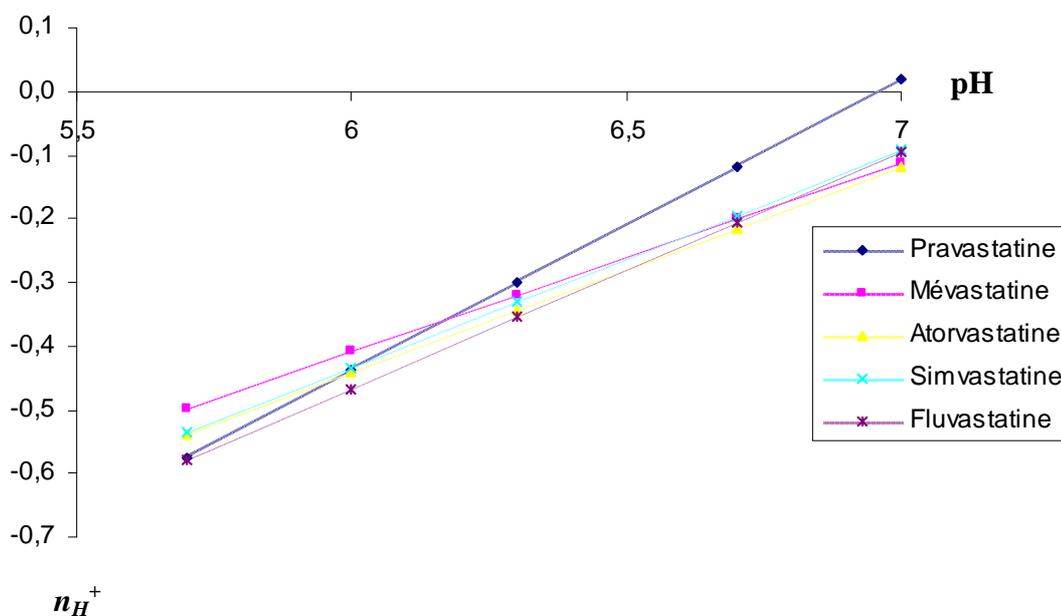


Figure 30 : Variation du n_H^+ des statines en fonction du pH à la température de 25°C

Ces valeurs de n_H^+ impliquées dans l'association des statines avec la monocouche lipidique sont négatives et diminuent linéairement avec le pH du milieu d'étude ($r^2 > 0,999$). En effet, pour une valeur de pH inférieure à 7,0 (i.e. pH_c), plus le n_H^+ s'approche de 0 et plus la diffusion passive des statines diminue. Le tableau ci-dessous présente les valeurs du pH du milieu d'étude où $n_H^+ = 0$.

Statines	Pravastatine	Mévastatine	Atorvastatine	Simvastatine	Fluvastatine
pH	6,96	7,37	7,36	7,27	7,25

Tableau 5 : Valeurs du pH du milieu d'étude où $n_H^+ = 0$ à la température de 25°C

A des valeurs de $pH < 7,0$, le nombre de protons n_H^+ est négatif. Ceci est une conséquence de la liaison des statines sur la MAI et de la libération des protons H^+ . Donc la propriété de la MAI serait de diminuer le pKa des groupements carboxyles des molécules de statine

(CACCURI et al. 1999). Ce groupement carboxyle peut être responsable du nombre négatif des ions H^+ impliqué dans l'association statine-MAI.

Cependant à des valeurs de $pH > 7,0$, le n_H^+ devient positif et peut être expliqué par une augmentation du pK_a du groupement phosphate de la surface de la MAI. En effet, le rapprochement du groupement phosphate de la MAI avec les groupements carboxyles des molécules de statine se fait grâce à des liaisons hydrogènes et pourrait jouer un rôle dans la déprotonation des molécules de statine. Ces résultats démontrent pour la première fois l'existence d'une fonction catalytique ou de navette à protons du groupement phosphate de la monocouche lipidique.

D.1.3.1. Analyse des données thermodynamiques

Dans le domaine de température étudié (10-35°C), les courbes de van't Hoff ($\ln k'$ en fonction de $1/T$, équation 9) sont tracées pour chaque valeur de pH . La figure 30 représente un exemple de courbe van't Hoff pour la fluvastatine pour différentes valeurs de pH dans milieu d'étude.

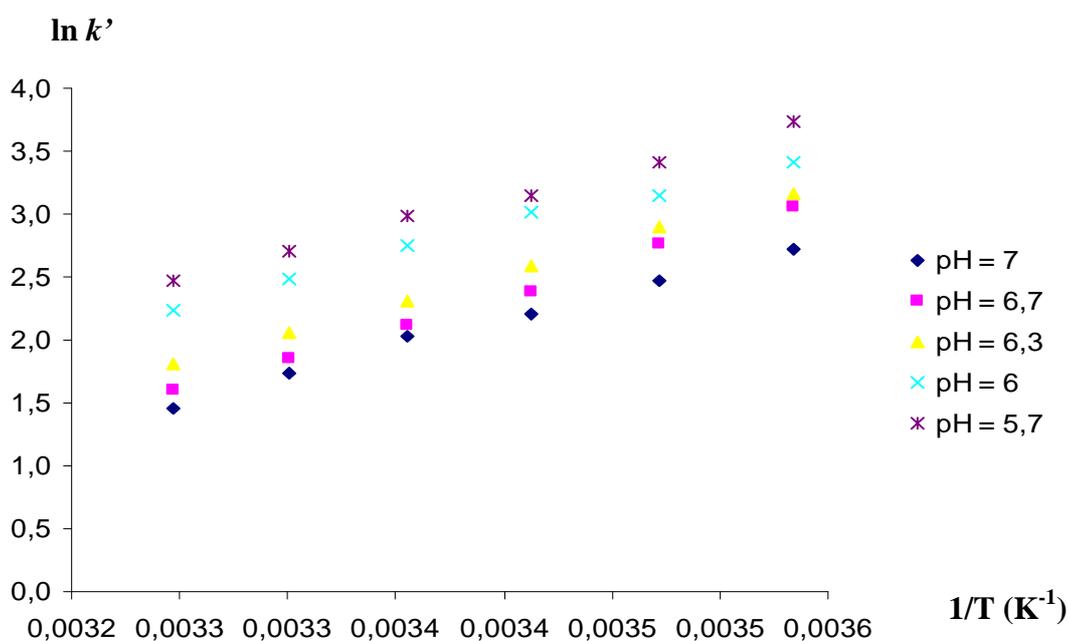


Figure 31 : Courbe de van't Hoff de la fluvastatine pour différentes valeurs de pH

La courbe est linéaire et est similaire pour l'ensemble des statines avec des coefficients de corrélation $r^2 > 0,996$. Elles montrent que dans le domaine de température étudié, la diffusion passive des statines est indépendante de la température.

A partir de ces courbes de van't Hoff, les valeurs des paramètres thermodynamiques sont calculées pour chaque pH du milieu d'étude et consignées dans le tableau ci-dessus :

Statines	pH = 5,7		pH = 6,0		pH = 6,3		pH = 6,7		pH = 7,0	
	ΔH°	$\Delta S^{\circ*}$								
Pravastatine	-15,90	-6,88	-20,40	-8,90	-25,09	-11,14	-27,68	-12,33	-24,21	-11,07
Mévastatine	-25,12	-8,27	-24,33	-8,14	-28,50	-10,21	-31,12	-11,43	-26,73	-9,81
Atorvastatine	-31,12	-10,34	-30,31	-10,21	-34,94	-12,49	-37,37	-13,65	-31,97	-11,65
Simvastatine	-28,26	-8,52	-27,07	-8,26	-32,11	-10,65	-34,96	-11,99	-29,45	-9,93
Fluvastatine	-33,50	-11,09	-35,63	-11,56	-39,62	-13,67	-42,42	-14,99	-36,06	-12,60

Tableau 6 : Valeurs des paramètres thermodynamiques des statines à chaque pH

Pour mieux apprécier l'évolution des données thermodynamiques en fonction du pH, les figures suivantes représentent les variations de l'enthalpie (ΔH° , kJ/mol) et de l'entropie ($\Delta S^{\circ*}$, sans unité) obtenues pour la fluvastatine.

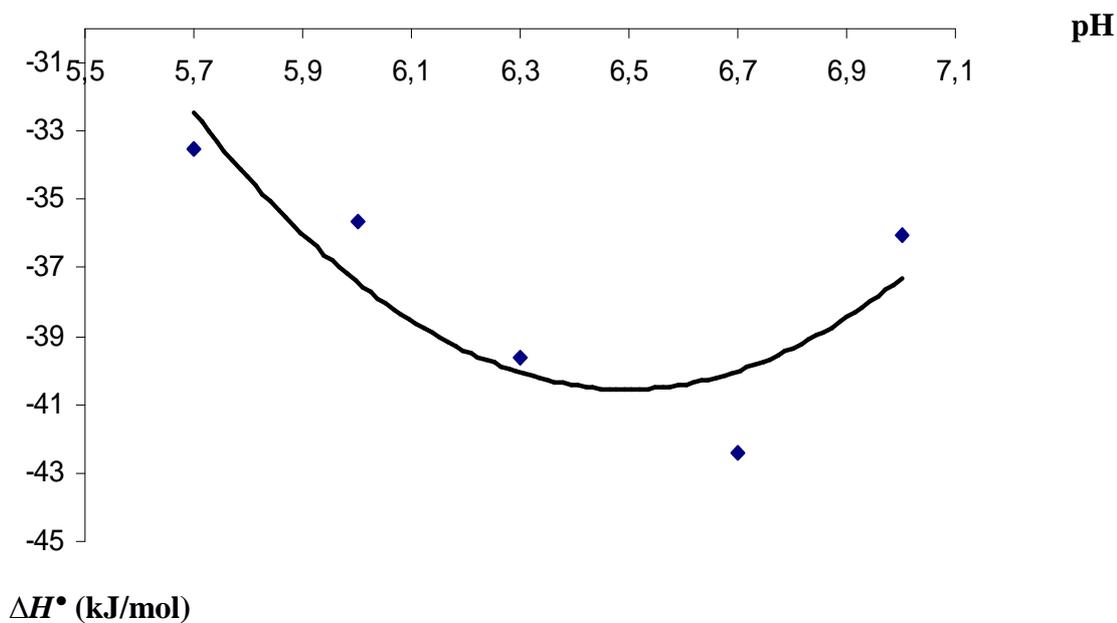


Figure 32 : Variation de l'enthalpie de l'association fluvastatine-MAI en fonction du pH

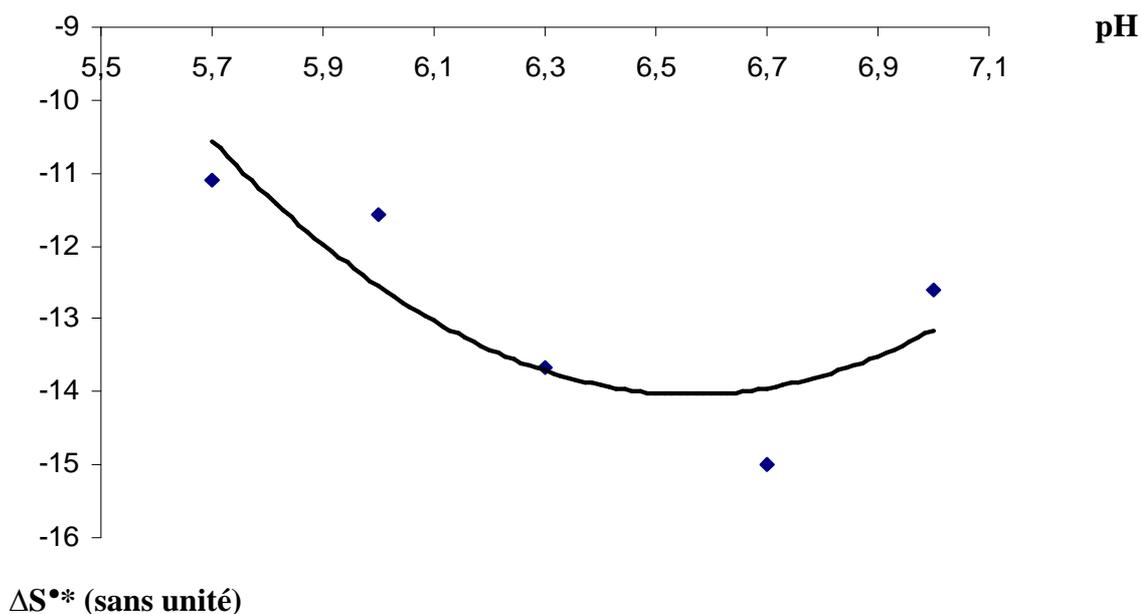


Figure 33 : Variation de l'entropie de l'association fluvastatine-MAI en fonction du pH

Toutes les molécules de statine présentent la même variation parabolique avec un $r^2 > 0,70$.

Par exemple les équations des régressions paraboliques pour la fluvastatine sont les suivantes :

$$\Delta H^\circ = 12,80\text{pH}^2 - 166,27\text{pH} + 499,46 \quad r^2 = 0,76 \quad (18)$$

$$\Delta S^{\circ*} = 4,66\text{pH}^2 - 61,22\text{pH} + 186,91 \quad r^2 = 0,74 \quad (19)$$

Les valeurs des enthalpies du mécanisme d'association statine-MAI sont négatives. Ce résultat démontre que ce mécanisme de liaison des statines sur la monocouche lipidique est dominé par des liaisons de van der Waals et des interactions hydrogènes. Il est donc énergiquement plus favorable aux statines de se fixer sur la monocouche lipidique que de rester en solution dans le milieu d'étude. Les données négatives de l'entropie quant à elles montrent une augmentation de l'ordre lors de l'association statine-MAI. Les données thermodynamiques deviennent de plus en plus négatives quand le pH du milieu d'étude augmente. En effet les répulsions électrostatiques, entre les groupements phosphates de la membrane et les groupements carboxyles négativement chargés des statines, augmentent. Cette diminution des interactions électrostatiques, favorables à l'association statine-MAI, provoque une diminution de la diffusion passive des statines. Ces résultats démontrent la grande importance des sites polaires de la surface de la monocouche lipidique (figure 19), c'est-à-dire l'effet de la rétention polaire, sur le processus de la diffusion passive des statines. Afin de vérifier si le mécanisme d'association de chaque molécule de statine sur la membrane est identique, nous avons analysé la compensation enthalpie-entropie ou CEE. La courbe CEE (équation 10) est représentée par la figure 34.

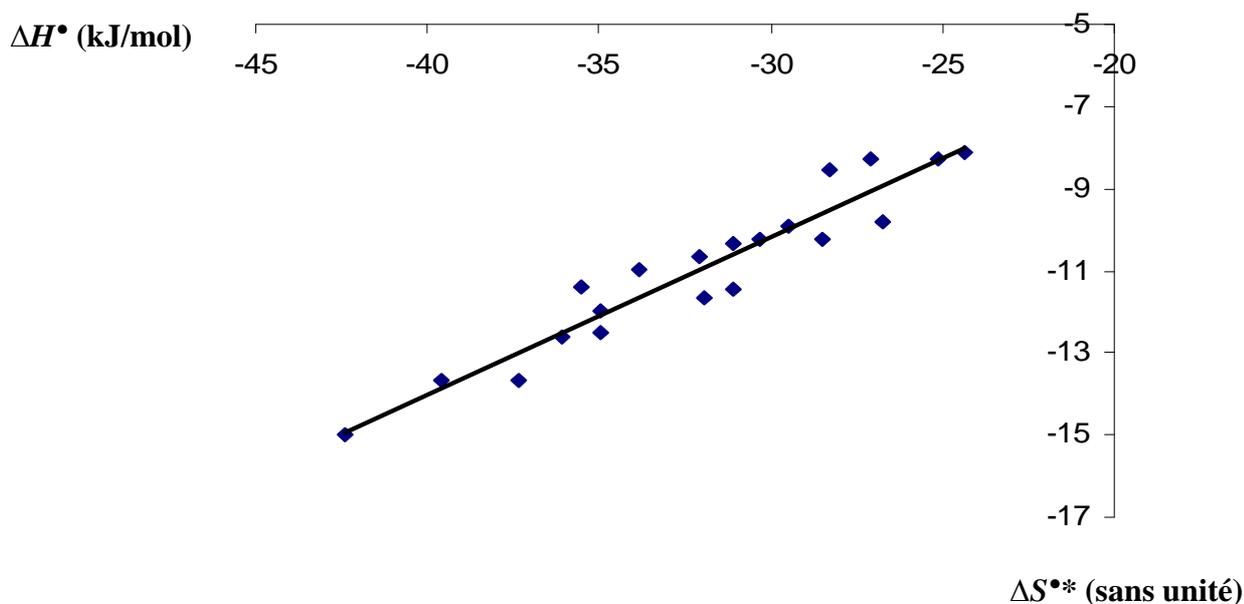


Figure 34 : Compensation enthalpie-entropie des statines à tous les pH du milieu d'étude

La courbe de CEE est linéaire avec un $r^2 > 0,90$ mais on ne peut pas déduire de façon rigoureuse que le mécanisme de fixation des statines sur la monocouche lipidique est indépendant :

- de la structure des molécules de statine
- du pH du milieu d'étude

Cependant comme nous l'avons vu dans le chapitre **B.2.3.**, cette CEE peut être observée et vérifiée si les xénobiotiques étudiés présentent les mêmes activités biologiques (RANATUNGA et al. 2002). Ainsi sachant que les statines présentent des activités biologiques similaires, on peut en déduire qu'elles présentent toutes des mécanismes d'association sur la MAI similaires.

En conclusion, cette étude nous a permis de connaître le mécanisme d'association des statines sur la membrane et les interactions y intervenant. Il peut être retenu que :

- La diffusion passive des statines est température-dépendante et pH-dépendante

- Elle est gouvernée par les forces de van der Waals et les interactions hydrogènes qui sont prédominantes
- L'importance du degré de lipophilie des statines et des interactions hydrophobes occupent également une place importante dans cette diffusion passive
- Le groupement phosphate de la monocouche lipidique joue un rôle de fonction catalytique. Il peut modifier le pKa des xénobiotiques.
- Les statines diffusent passivement à travers les membranes biologiques. Cependant la pravastatine nécessite un transporteur pour franchir ces barrières lipidiques.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre **B.2.4.1.1.**, l'addition d'un cation (comme le Mg^{2+} ou le Ca^{2+}) diminue l'activité de l'eau en augmentant l'effet hydrophobe par électrostriction du solvant. Dans cette étude nous avons démontré l'importance des interactions hydrophobes dans la diffusion passive des statines. La pravastatine, une molécule hydrophile, est faiblement retenue sur la monocouche lipidique. En effet, elle présente une faible diffusion passive à travers les biomembranes. Ces deux constats nous amène à étudier l'effet de certains sels tels que le magnésium sur le mécanisme d'association des statines sur la MAI. Le choix de ce minéral est lié à son importance et à son rôle au niveau de l'organisme. En effet, le magnésium est le 3^{ème} minéral le plus important de l'organisme et il intervient dans plus de 300 réactions biochimiques (RAYSSIGUIER et *al.* 1993). Il est souvent utilisé au cours de supplémentation dans le traitement des maladies cardiovasculaires, de l'hypertension artérielle... (GUILLAUME et *al.* 2002a, ROSANOFF et *al.* 2004).

D.1.4. Etude de l'effet du magnésium et du calcium

D.1.4.1. Effet du magnésium sur la diffusion passive des statines

La figure 35 représente la variation de $\ln k'$ des statines à 35°C en fonction du logarithme de la concentration en magnésium (c) ($-\log c$ ou PMg^{2+}). La concentration en magnésium c varie entre 0,6 et 3,0 mmol/L. Le pH du milieu d'étude est fixé à 7,0.

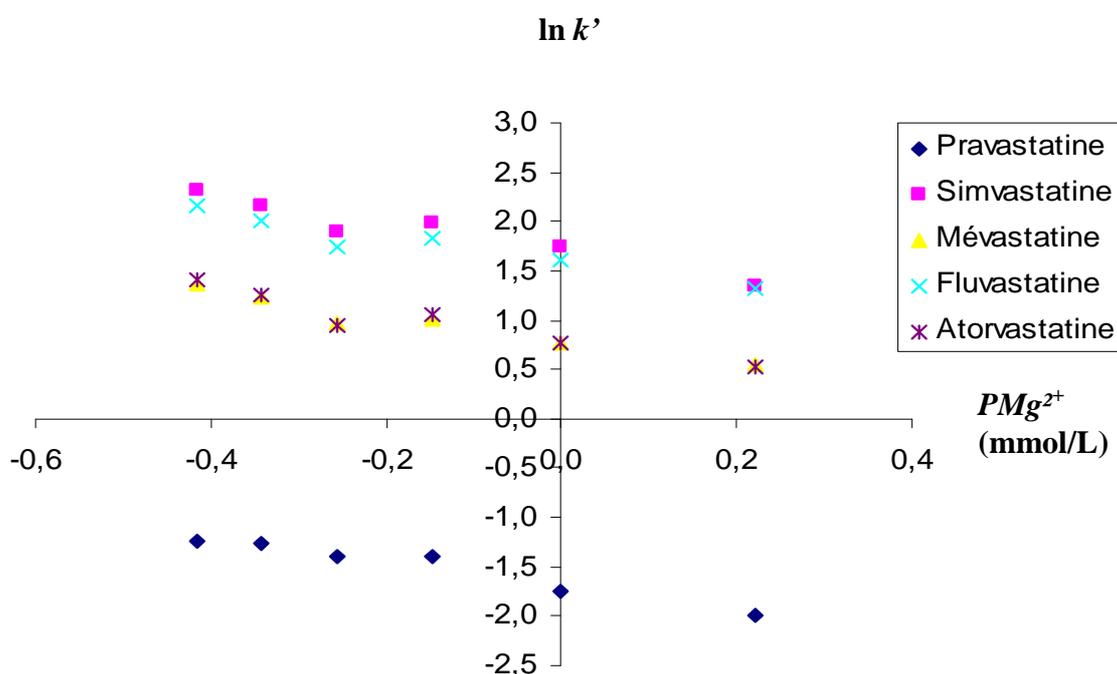


Figure 35 : Variation des $\ln k'$ des statines à 35°C en fonction de PMg^{2+} ($-\log c$) dans le milieu d'étude à pH = 7,0

Cette évolution est similaire pour toutes les autres températures de l'étude. Elle montre une augmentation de la diffusion passive des statines lorsque la concentration en magnésium dans le milieu d'étude croît. Cet effet peut être expliqué par une diminution de l'activité de l'eau (i.e. effet hydrophobe) classiquement attribué à l'effet du sel (GUILLAUME et al. 2002b, ANDRÉ et al. 2003). Ainsi le magnésium améliorerait le processus de fixation des statines sur la membrane. Par contre, l'ordre d'affinité sur la monocouche lipidique reste la même que

celle obtenue avec l'étude du pH. L'augmentation de la diffusion passive des statines peut être expliquée par une formation de paires d'ions entre le groupement carboxyle d'une molécule de statine ($-\text{COO}^-$ ou $-\text{OOC}^-$), l'ion Mg^{2+} et le groupement phosphate de la tête polaire ($-\text{POO}^-$ ou $-\text{OOP}^-$) de la monocouche lipidique (i.e. $\text{STCOO}-\text{Mg}-\text{OOP}$). Cette association va diminuer les forces répulsives entre la tête polaire de la MAI et les groupements carboxyles des statines négativement chargés. En effet, comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre **D.1.3.**, quand le pH du milieu d'étude augmente, la faible diffusion passive des statines était due à l'accroissement des forces répulsives entre le groupement phosphate de la MAI ($-\text{POO}^-$) et les groupements carboxyles des statines négativement chargés ($-\text{COO}^-$).

Afin d'élucider les interactions intervenant dans l'augmentation de la diffusion passive des statines avec celle de la concentration du magnésium, les données thermodynamiques ont été calculées à partir des courbes de van't Hoff. Ces dernières présentent des coefficients de corrélation $r^2 > 0,99$. Les courbes ΔH° et $\Delta S^{\circ*}$ en fonction de PMg^{2+} de la mévastatine et de la fluvastatine sont représentées par les figures 36 et 37 ci-dessous. L'allure de ces courbes est identique pour toutes les autres molécules de statine :

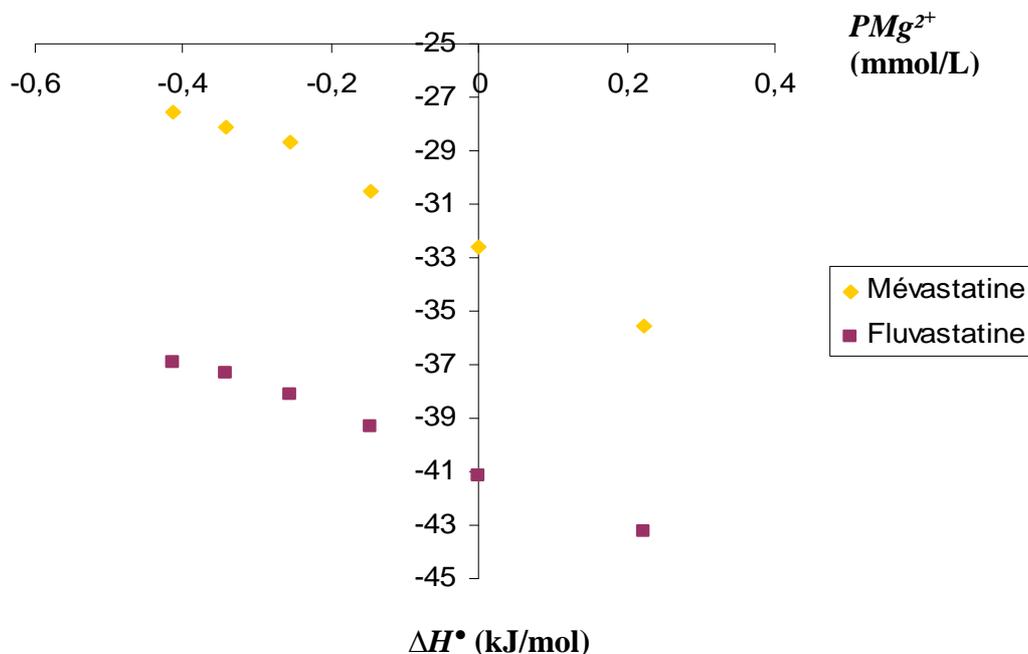


Figure 36 : Variation de l'enthalpie de la mévastatine et de la fluvastatine en fonction du logarithme de la concentration en magnésium (PMg^{2+})

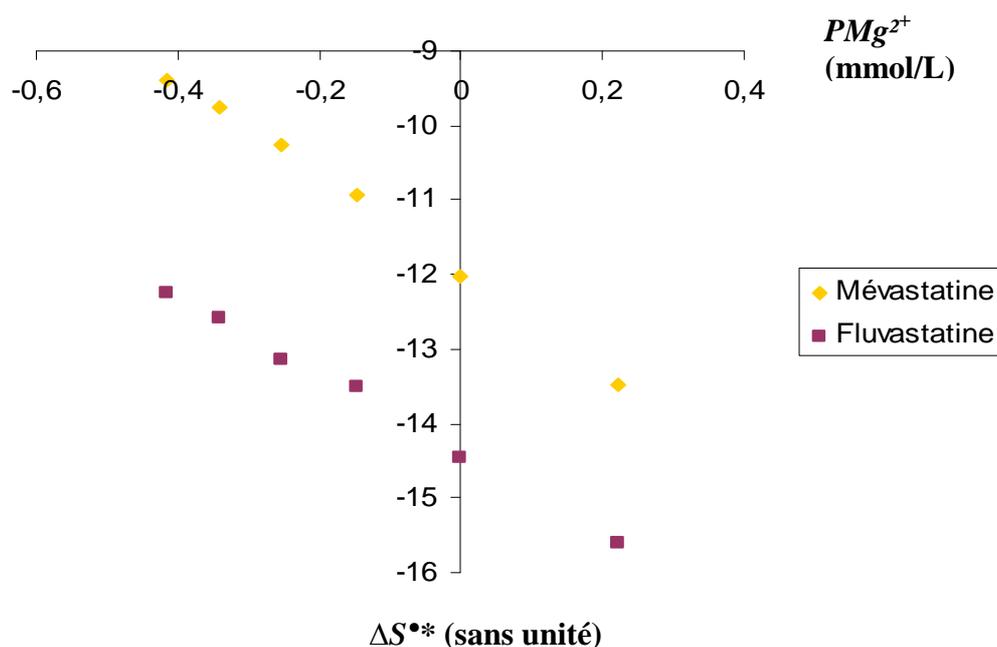


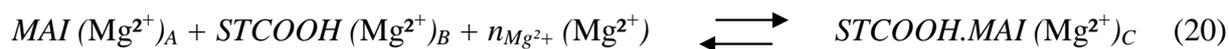
Figure 37 : Variation de l'entropie de la mévastatine et de la fluvastatine en fonction du logarithme de la concentration en magnésium (PMg^{2+})

L'étude de la variation de ces données thermodynamiques montre qu'elles sont négatives et deviennent cependant progressivement moins négatives avec l'augmentation de la concentration en magnésium dans le milieu d'étude. Les données négatives de l'enthalpie confirment l'intervention des forces de van der Waals et des interactions hydrogènes dans le

processus d'association statine-MAI. Ces forces ne sont pas les seules car l'augmentation de la concentration en sel s'accompagne d'une augmentation des données thermodynamiques qui deviennent moins négatives. Ceci reflète la prédominance de forces hydrophobes due à l'augmentation de la tension de l'eau (GUILLAUME *et al.* 2002b, ANDRÉ *et al.* 2003). Cet effet hydrophobe provoque une augmentation de l'affinité des statines avec la monocouche lipidique. De plus, les groupements carboxyles de deux molécules de statine (STCOO⁻ ou ⁻OOCST) peuvent former une paire d'ions avec l'ion Mg²⁺ (i.e. STCOO—Mg—OOCST) ayant pour conséquence une augmentation de la lipophilie des statines (ISMAILI *et al.* 2003). Cette dernière va ainsi provoquer une augmentation de leur diffusion passive. En effet dans le chapitre **B.2.4.1.2.**, on a vu que la neutralisation des charges due à la formation de paires d'ions entre deux molécules entraînait un accroissement de l'hydrophobicité ou de la lipophilie respective de ces deux entités. En formant également ces paires d'ions avec le magnésium, les statines ne se retrouvent plus sous leur forme ionisée ce qui est favorable pour la diffusion passive.

Dans le chapitre **D.1.3.**, nous avons étudié le nombre de protons H⁺ (n_H^+) impliqué dans la formation du complexe STCOOH.MAI. Les équations utilisées dans la détermination du n_H^+ peuvent être reprises pour calculer le nombre de magnésium ($n_{Mg^{2+}}$) impliqué dans ce même processus d'association.

Lorsque la concentration en magnésium du milieu d'étude change, la relation entre la monocouche lipidique (MAI), les statines (STCOOH) et le complexe statine-MAI (STCOOH.MAI) est la suivante :



où $n_{Mg^{2+}} = C - (A + B)$ est le nombre d'ions Mg²⁺ impliqué dans l'association statine-MAI.

En remplaçant le terme H⁺ par Mg²⁺, l'équation 17 du chapitre **D.1.3.** redevient :

$$\partial \log k' / \partial PMg^{2+} = n_{Mg^{2+}} \quad (21)$$

A partir de cette équation 21, la droite de la courbe $\ln k'$ versus PMg^{2+} est tracée et les valeurs du nombre de magnésium impliqué dans le processus d'association statine-MAI sont calculées. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 7 :

Température (°C)	Pravastatine	Mévastatine	Atorvastatine	Simvastatine	Fluvastatine
5	- 0,26	- 0,33	- 0,34	- 0,38	- 0,37
10	- 0,22	- 0,44	- 0,41	- 0,40	- 0,38
15	- 0,29	- 0,52	- 0,50	- 0,42	- 0,43
20	- 0,31	- 0,49	- 0,52	- 0,47	- 0,45
25	- 0,33	- 0,50	- 0,53	- 0,52	- 0,51
30	- 0,56	- 0,53	- 0,53	- 0,58	- 0,54
35	- 0,53	- 0,54	- 0,56	- 0,61	- 0,52
40	- 0,90	- 0,53	- 0,62	- 0,76	- 0,57
45	- 0,82	- 0,74	- 0,76	- 0,74	- 0,62

Tableau 7 : Valeurs du nombre de magnésium ($n_{Mg^{2+}}$) exclu lors de l'association statine-MAI à différentes températures de la colonne

La figure 38 représente la courbe $n_{Mg^{2+}}$ de la fluvastatine et de la simvastatine en fonction de la température de la colonne. Cette courbe est linéaire et évolue de façon similaire pour toutes les autres statines.

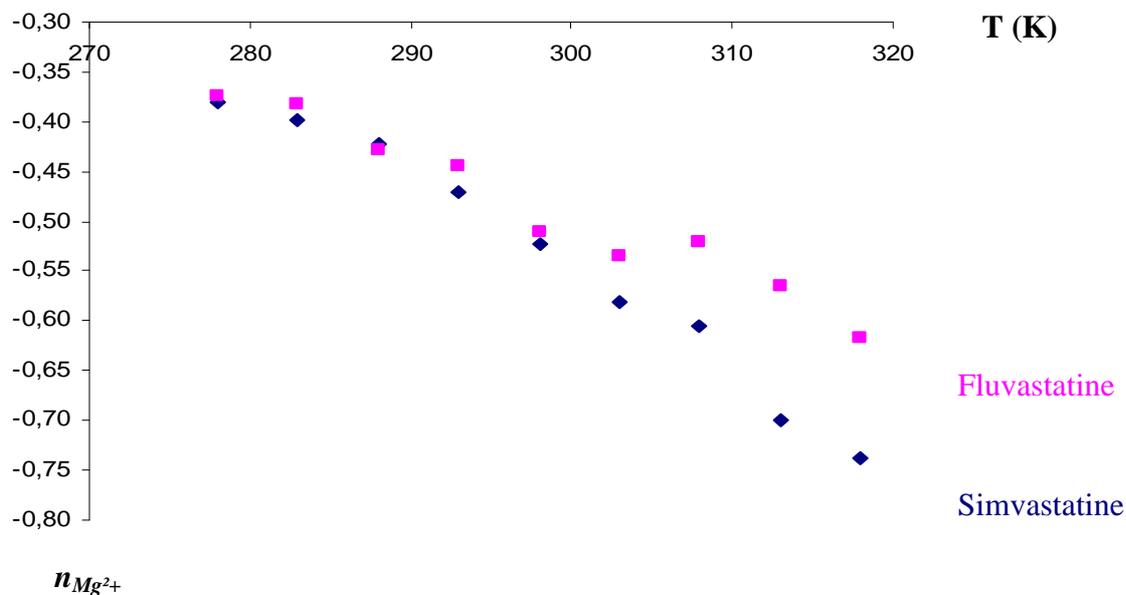


Figure 38 : Variation des $n_{Mg^{2+}}$ de la fluvastatine et de la simvastatine en fonction de la température (T) de la colonne

Le nombre de magnésium impliqué dans l'association statine-MAI est négatif et augmente en valeur absolue avec la température (tableau 7 et figure 38). Le $n_{Mg^{2+}}$ calculé reflète l'exclusion du magnésium quand les statines se lient avec la monocouche lipidique. Les valeurs négatives sont expliquées par la formation des paires d'ions entre le Mg^{2+} et :

- (i) Le groupement carboxyle de deux statines (STCOO–Mg–OOCST)
- (ii) Le groupement phosphate de la monocouche lipidique (STCOO–Mg–OOP).

La courbe CEE de toutes les molécules de statine et à toutes les concentrations de magnésium est représentée par la figure 39 avec un coefficient de corrélation $r^2 > 0,80$.

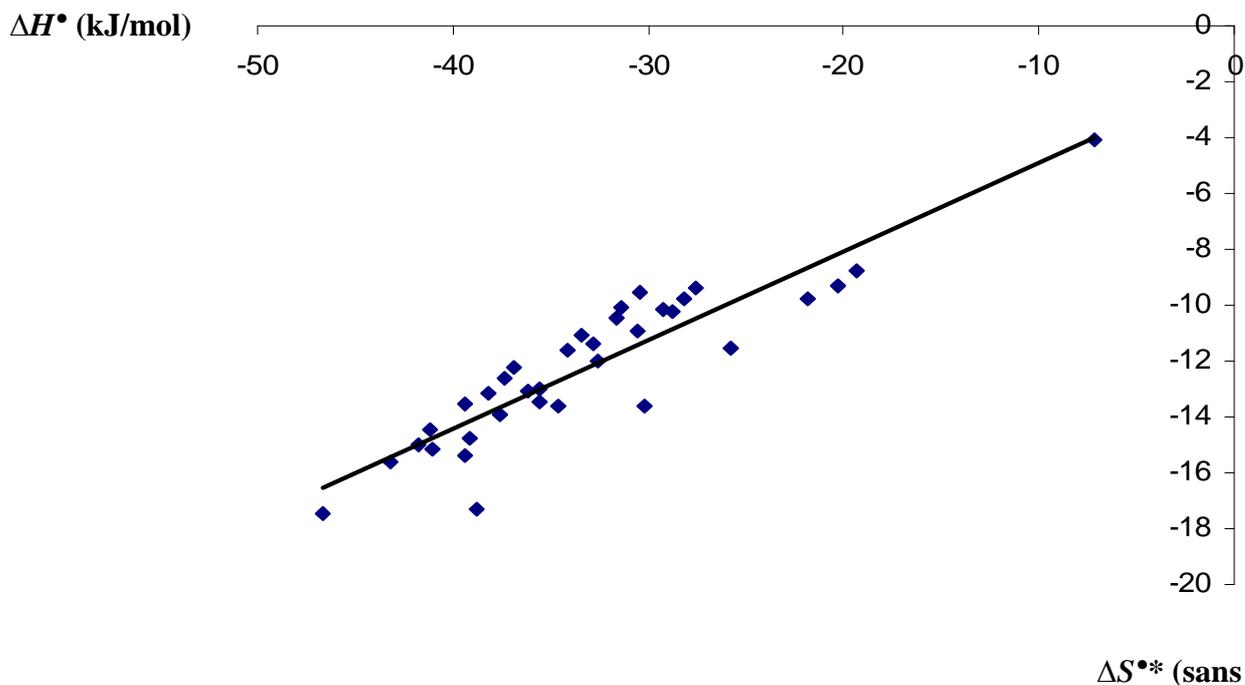


Figure 39 : Compensation enthalpie-entropie pour toutes les statines et pour toutes les concentrations de magnésium

D'après la figure 39, cette linéarité associée aux propriétés biologiques similaires des statines peuvent démontrer que le mécanisme de fixation des statines sur la MAI est indépendant des concentrations de magnésium dans le milieu d'étude.

En conclusion, les résultats obtenus ont permis de démontrer qu'une supplémentation en magnésium augmentait l'affinité des statines avec la monocouche lipidique c'est-à-dire leur diffusion passive à travers les membranes biologiques. Ce phénomène est accompagné par l'augmentation des liaisons hydrophobes qui deviennent prédominantes et gouvernent ainsi la fixation des statines sur la MAI. L'augmentation de la diffusion passive des statines sous l'effet du cation Mg^{2+} et l'importance des liaisons hydrophobes y intervenant nous amène à poser cette hypothèse : tous les cations divalents peuvent induire le même effet. Ainsi pour vérifier cette hypothèse, une étude supplémentaire a été réalisée. Elle consiste à analyser l'effet d'un autre cation, le calcium, sur l'association statine-MAI. En effet le calcium est, comme le magnésium, un minéral très important au niveau de l'organisme. Il régule le pH du

corps et intervient dans la formation des os. Il est également utilisé au cours de supplémentation dans le traitement de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées (HEANEY et NORDIN 2002).

D.1.4.2. Effet du calcium sur la diffusion passive des statines

Les facteurs de rétention k' ainsi que les données thermodynamiques (enthalpie et entropie) calculées à partir des courbes de van't Hoff de l'association statine-MAI à différentes concentrations de calcium (Ca^{2+}) dans le milieu d'étude sont transcrits dans le tableau 8.

Ca^{2+} (mM)	Pravastatine			Mévastatine			Atorvastatine			Fluvastatine		
	k'	ΔH°	$\Delta S^{\circ*}$	k'	ΔH°	$\Delta S^{\circ*}$	k'	ΔH°	$\Delta S^{\circ*}$	k'	ΔH°	$\Delta S^{\circ*}$
0,00	0,10	-30,92	-14,42	0,54	-38,42	-15,57	0,72	-42,66	-16,99	1,23	-52,59	-20,33
1,00	0,30	-34,01	-4,94	2,58	-31,33	-11,27	2,45	-43,70	-16,28	5,41	-40,37	-14,05
2,00	0,41	-28,09	-10,22	3,41	-26,73	-9,21	2,76	-42,78	-15,68	7,12	-34,00	-11,30
2,25	0,41	-32,01	-13,31	3,64	-29,65	-10,26	3,19	-43,92	-15,93	7,53	-36,44	-12,21
2,50	0,55	-23,33	-9,66	4,05	-28,62	-9,76	3,91	-37,16	-13,10	8,71	-34,66	-11,37
2,65	0,52	-33,55	-13,73	4,24	-29,23	-10,00	4,80	-34,76	-12,03	9,00	-36,35	-12,01
3,00	0,52	-22,24	-9,29	4,27	-26,14	-8,76	4,70	-31,66	-10,81	9,11	-35,42	-11,63
3,25	0,62	-19,26	-8,01	4,63	-25,89	-8,00	5,25	-30,43	-10,24	9,88	-34,30	-11,11

Tableau 8 : Valeurs des k' et des paramètres thermodynamiques de la liaison statine-MAI à différentes concentrations de Ca^{2+} (mmol/L) dans le milieu d'étude

La variation de la diffusion passive des statines en fonction de la concentration de calcium dans le milieu d'étude est représentée par la figure 40.

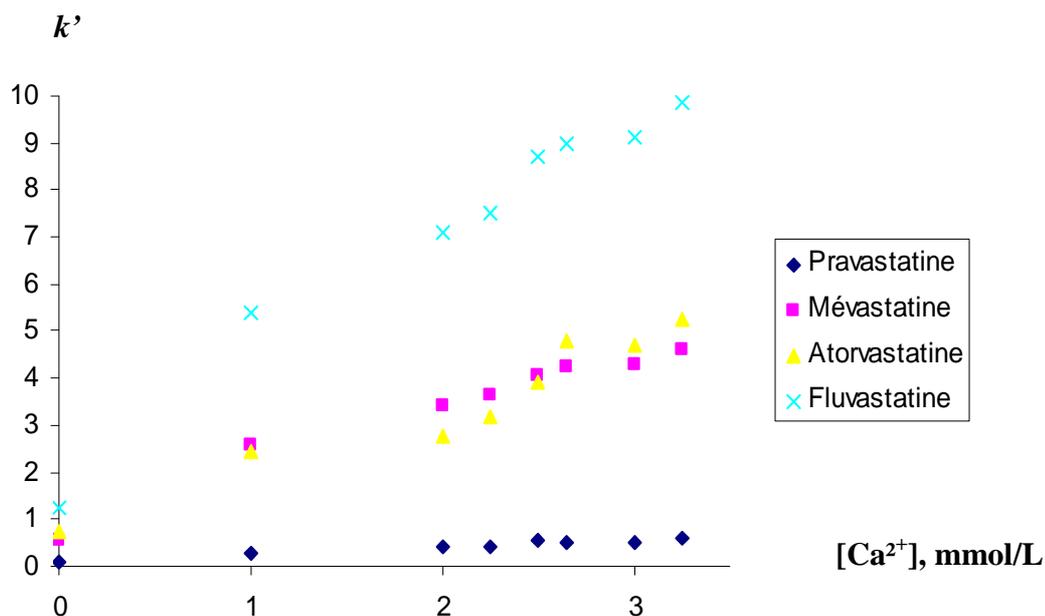


Figure 40 : Variation de la diffusion passive (représentée par k') des statines en fonction de la concentration en calcium ($[Ca^{2+}]$) dans le milieu d'étude à $pH = 7,0$

Cette dernière montre que la diffusion passive des statines augmente quand la concentration de calcium augmente dans le milieu d'étude. Ceci est accompagné par des données thermodynamiques qui deviennent moins négatives. L'augmentation de la diffusion passive des statines est expliquée par l'augmentation des interactions hydrophobes classiquement attribuée à l'effet du chlorure de calcium.

Pour voir si le magnésium et le calcium agissent de la même façon sur la diffusion passive des statines, l'effet du calcium est comparé à celui du magnésium. Les données de k' , de l'enthalpie et de l'entropie obtenues sous l'effet du magnésium sont recalculées à partir de la courbe k' en fonction de la concentration en magnésium ($r^2 > 0,995$) de l'étude précédente (chapitre **D.1.4.1**). Elles sont reportées dans le tableau suivant :

Mg^{2+} (mM)	Pravastatine			Mévastatine			Atorvastatine			Fluvastatine		
	k'	ΔH°	$\Delta S^{\circ*}$	k'	ΔH°	$\Delta S^{\circ*}$	k'	ΔH°	$\Delta S^{\circ*}$	k'	ΔH°	$\Delta S^{\circ*}$
0,00	0,12	-27,19	-19,42	0,95	-34,58	-13,58	1,02	-39,33	-15,36	2,00	-46,67	-17,48
1,00	0,17	-30,23	-13,58	2,14	-32,59	-12,01	2,17	-37,53	-13,95	5,00	-41,13	-14,46
2,00	0,26	-22,83	-10,23	3,20	-29,02	-10,20	3,27	-33,54	-11,95	7,03	-38,02	-12,91
2,25	0,28	-20,83	-9,20	3,47	-28,19	-9,74	3,55	-32,68	-11,50	7,63	-37,07	-12,41
2,50	0,30	-18,83	-8,17	3,74	-27,36	-9,28	3,83	-31,82	-11,03	8,22	-36,12	-11,92
2,65	0,31	-17,63	-7,55	3,91	-26,86	-9,01	4,00	-31,31	-10,75	8,58	-35,56	-11,62
3,00	0,34	-14,84	-6,11	4,29	-25,70	-8,37	4,39	-30,10	-10,10	9,41	-34,23	-10,93
3,25	0,36	-12,84	-5,08	4,56	-24,87	-7,91	4,67	-29,24	-9,63	10,01	-33,28	-10,43

Tableau 9 : Valeurs des k' et des paramètres thermodynamiques de la liaison statine-MAI à différentes concentrations de Mg^{2+} (mmol/L) dans le milieu d'étude

On peut constater dans le tableau 9 ci-dessus que l'évolution de la fixation des statines sur la MAI est similaire à celle observée en présence du magnésium dans la phase mobile. Les forces impliquées sont les liaisons hydrophobes qui deviennent prédominantes dans le mécanisme d'association statine-MAI. Cependant l'effet du calcium sur la diffusion passive des statines est plus important que celui du magnésium. Ceci peut être expliqué par le caractère hautement osmotropique du calcium induisant une augmentation plus importante de la tension de l'eau (i.e. de l'effet hydrophobe) (LO NOSTRO et *al.* 2002). Un exemple de la comparaison entre les effets du calcium et du magnésium sur la diffusion passive de la pravastatine est représenté par la figure 41.

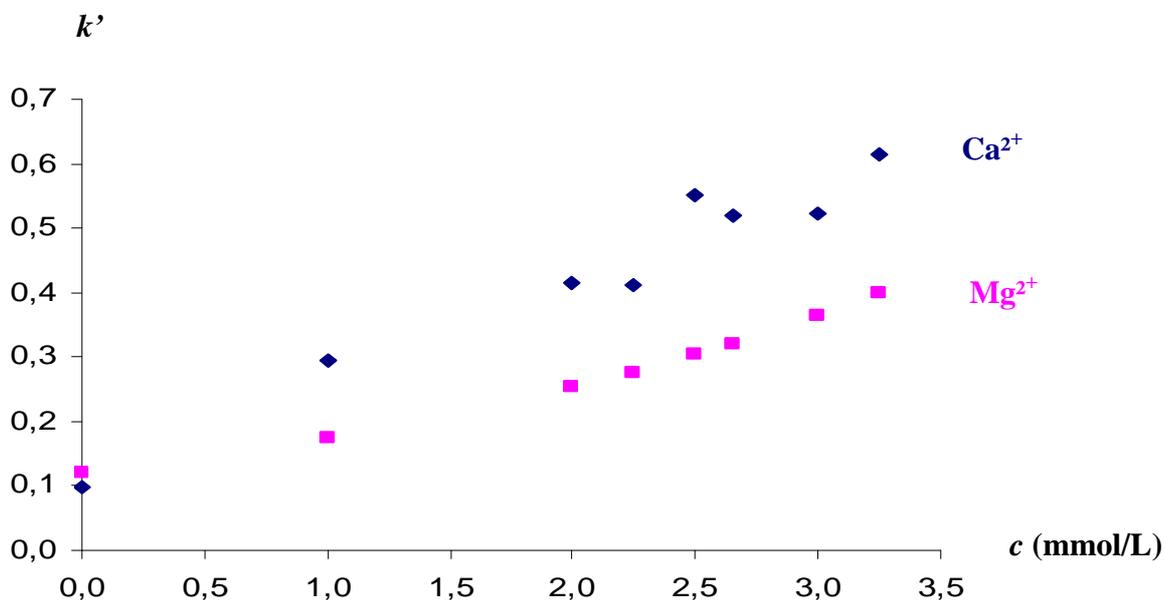


Figure 41 : Comparaison des valeurs de la diffusion passive (k') de la pravastatine à 35°C en fonction des concentrations de Mg^{2+} et de Ca^{2+} (c) dans le milieu d'étude à pH = 7,0

A 35°C et avec une même concentration de calcium et de magnésium (1,00 mM), la diffusion passive de la pravastatine est égale à 0,30 et 0,17 respectivement.

Afin de vérifier si le mécanisme d'association statine-MAI est identique, la compensation enthalpie-entropie est étudiée. Cette CEE pour toutes les concentrations de cations et pour toutes les molécules de statine est représentée par la figure 42.

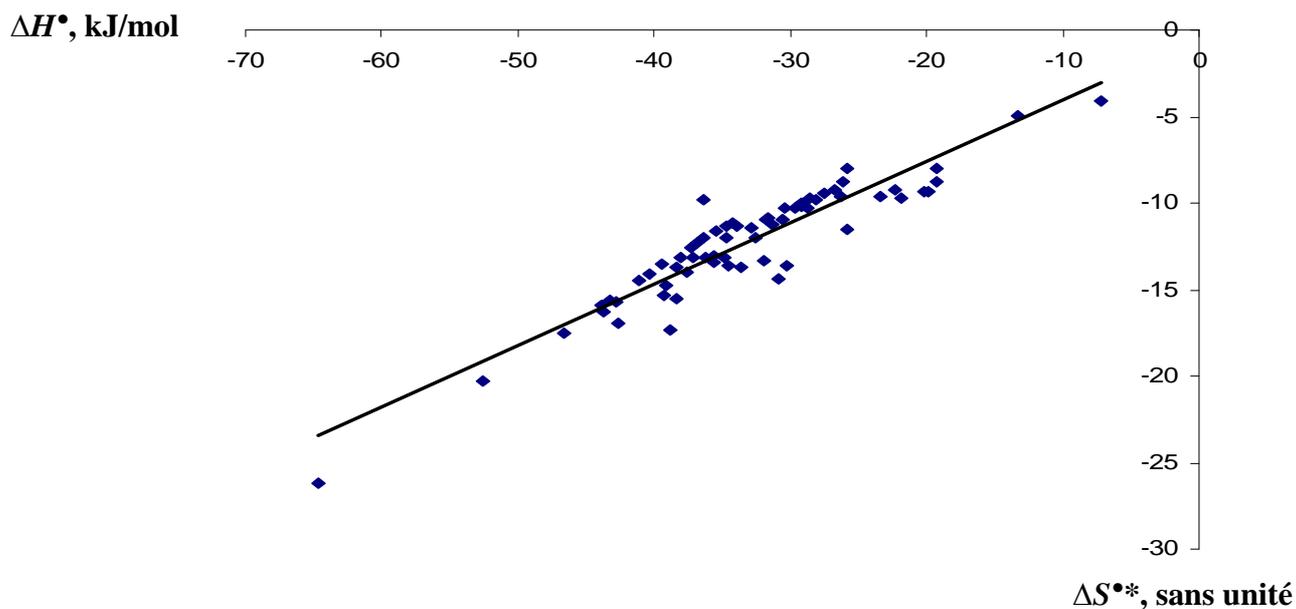


Figure 42 : Compensation enthalpie-entropie des statines pour toutes les concentrations de Mg^{2+} et de Ca^{2+} dans le milieu d'étude

La courbe est linéaire avec un coefficient de corrélation $r^2 > 0,87$. Cette CEE prouve que le mécanisme d'association des statines sur la membrane est similaire quelque soit le sel utilisé.

En conclusion, le calcium et le magnésium induisent une augmentation de la diffusion passive des statines. Cependant le calcium grâce à son fort caractère osmotrope provoque une augmentation plus grande de la diffusion passive des statines que le magnésium. Ce résultat semble important pour amplifier la diffusion passive de la pravastatine, une molécule hydrophile. Cette dernière n'a pas trop d'affinité avec la monocouche lipidique et semble traverser les membranes biologiques par l'intermédiaire de transporteurs membranaires, les OATPs. Les OATPs sont des transporteurs transmembranaires d'origine hépatique. La diffusion facilitée semble être un autre mode de transport des statines à travers les hépatocytes. Ce résultat nous amène à mettre au point une nouvelle colonne biochromatographique. Elle sera constituée d'une phase stationnaire greffée avec de l'Oatp2. Ces derniers sont les transporteurs transmembranaires présents au niveau de l'hépatocyte de rat et sont responsables du transport des statines dans le foie. Cette nouvelle colonne va nous permettre de mieux apprécier la diffusion facilitée des statines à travers les membranes biologiques.

D.2. Analyse de l'association des statines avec l'Oatp2 : Effet du magnésium

Ce travail a donné lieu à **une publication** dans une revue internationale à comité de lecture :

SARR F.S., ANDRÉ C., GUILLAUME Y.C.

A novel biochromatographic Oatp2 column to study the transmembrane transport of statins

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2010**, 52 : 93-98

Afin d'étudier le transport facilité des statines à travers les membranes biologiques par l'intermédiaire des transporteurs transmembranaires, l'Oatp2, une nouvelle colonne biochromatographique a été créée dans notre laboratoire (voir chapitre **C.2.2.**). Les OATPs qui se trouvent dans la membrane plasmique des hépatocytes sont responsables en partie de l'entrée rapide des statines dans les hépatocytes. Cette nouvelle colonne est utilisée pour étudier l'effet du magnésium sur le mécanisme de fixation des statines mais aussi d'un antibiotique, la rifamycine, sur l'Oatp2 à la température et pH physiologiques (i.e. pH = 7,4 et T = 35°C). La rifamycine est un inhibiteur de l'Oatp2 qui diminue la constante d'association K de certains xénobiotiques tels que le taurocholate, la pravastatine. On a démontré précédemment que les molécules de statines et le magnésium pouvaient former des paires d'ions. De plus comme nous l'avons vu dans le chapitre **A.4.2.**, ces transporteurs possèdent un pore central chargé positivement et ce cation pourrait donc interférer dans la diffusion facilitée des statines.

Les chromatogrammes obtenus grâce à cette nouvelle colonne biochromatographique sont quasi-identiques. Un exemple de chromatogramme est représenté dans la figure ci-dessous :

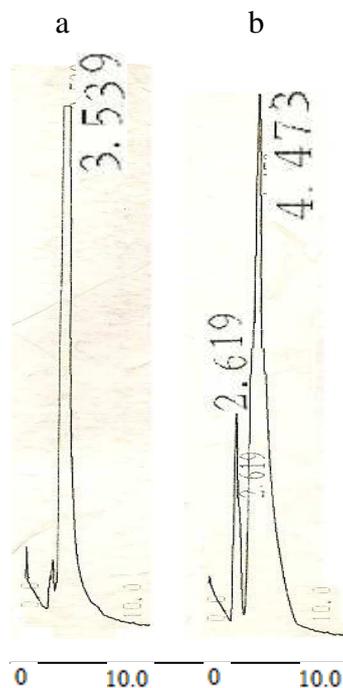


Figure 43 : Chromatogrammes obtenus pour la pravastatine (a) et la mévastatine (b) à 10°C (phase mobile : tampon phosphate 0,05 mM, 0 mM de magnésium, pH=7,4 et débit : 0,3 ml/min)

La figure 44 ci-dessous représente la variation de la diffusion facilitée des statines et de la rifamycine (représentée par le logarithme du facteur de rétention k') sur l'Oatp2 en fonction de la concentration de magnésium (c) dans le milieu d'étude.

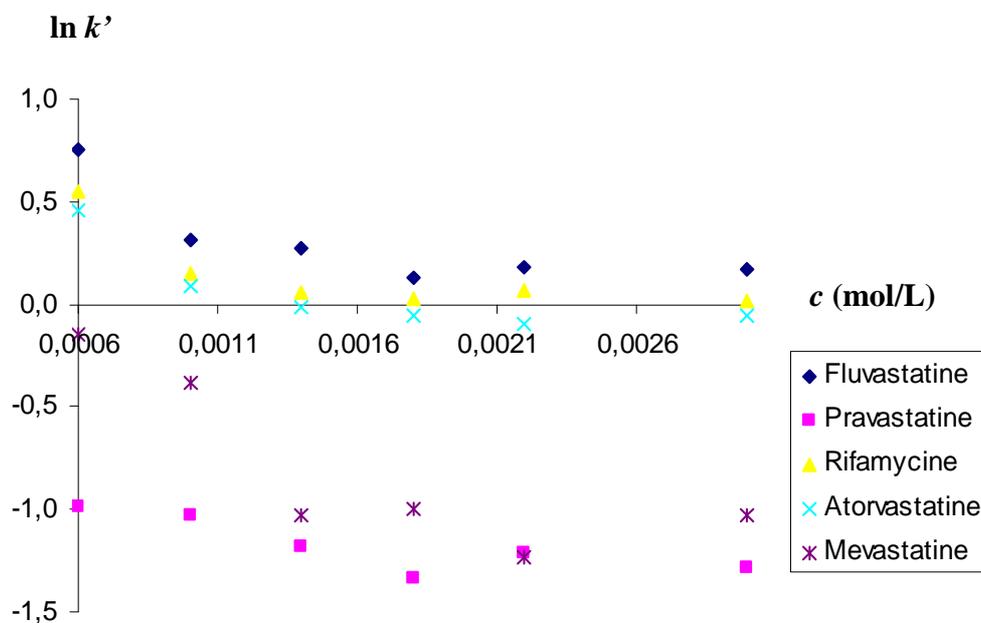


Figure 44 : Variation des valeurs de $\ln k'$ des xénobiotiques en fonction des concentrations de magnésium (c) dans le milieu d'étude

La fixation des statines et de la rifamycine sur l'Oatp2 diminue avec l'augmentation de la concentration en magnésium (c) dans le milieu d'étude (figure 44). Au pH de l'étude (pH = 7,4), toutes les molécules de statine et la rifamycine sont sous leur forme ionisée avec des groupements carboxyles chargés négativement. L'Oatp2 est un transporteur d'anions organiques qui possède un pore central actif chargé positivement. La fixation des xénobiotiques étudiés se fait donc par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques. La diminution de la diffusion facilitée des xénobiotiques étudiés en présence de magnésium peut être expliquée par le fait que le magnésium bloque la fixation de ces xénobiotiques sur le site actif de l'Oatp2. En effet comme il a été démontré dans l'étude précédente (chapitre **D.1.4.1.**), les groupements carboxyles de deux molécules de statine et le magnésium peuvent former une paire d'ion empêchant ainsi l'accès du site actif à ces xénobiotiques. Il peut être aussi constaté que la rifamycine est retenue de la même façon que les statines qui sont des substrats de l'Oatp2. En effet, cet antibiotique possède un groupement carboxylique qui s'ionise également au pH de l'étude. Elle peut donc se fixer de façon similaire aux molécules de statines sur l'Oatp2. Ce résultat prouve que la rifamycine est un inhibiteur compétitif de l'Oatp2. Il se lie de la même manière que les substrats de l'Oatp2 et peut ainsi provoquer une diminution de leur affinité avec ces protéines.

Afin d'apprécier les interactions intervenant dans ce mécanisme d'association xénobiotiques-Oatp2, les valeurs des enthalpies sont déterminées à partir des courbes de van't Hoff. La figure 45 représente la courbe de la variation de l'enthalpie des xénobiotiques en fonction de la concentration en magnésium dans le milieu d'étude.

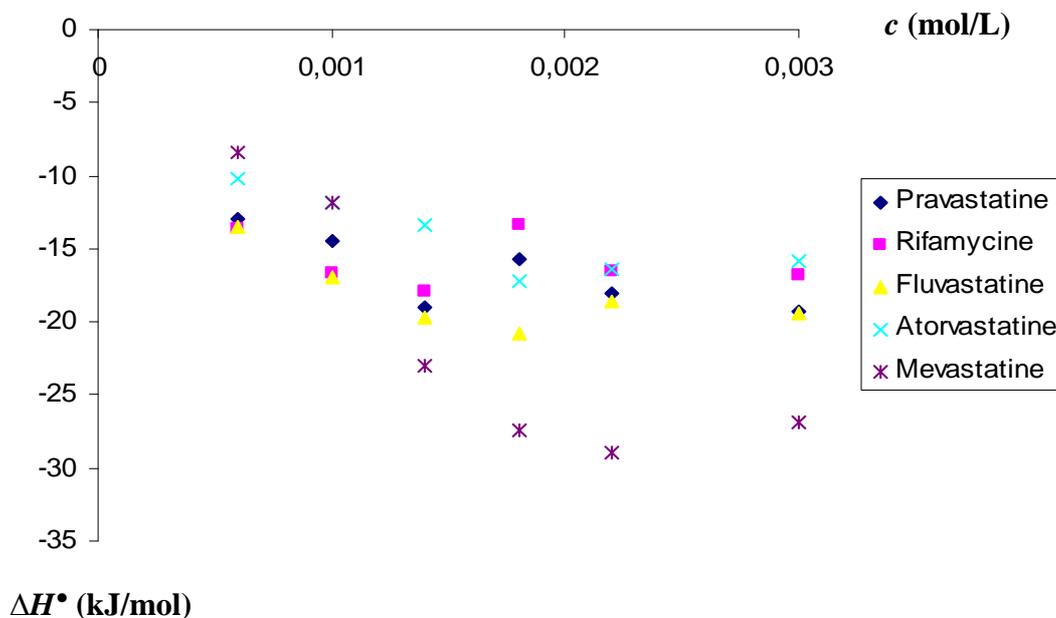


Figure 45 : Variation des valeurs de l'enthalpie des xénobiotiques fonction des concentrations en magnésium (c) dans le milieu d'étude

Cette variation des valeurs de l'enthalpie des xénobiotiques en fonction de la concentration en magnésium montre qu'une augmentation de la concentration en magnésium dans le milieu d'étude conduit à une diminution des valeurs d'enthalpie qui deviennent plus négatives. Ces valeurs démontrent que le mécanisme de fixation des xénobiotiques sur le site actif de l'Oatp2 est conduit enthalpiquement c'est-à-dire qu'il est gouverné par des interactions de van der Waals. L'ordre de diffusion facilitée des xénobiotiques sur l'Oatp2 est la suivante :

Pravastatine < mévastatine < rifamycine < atorvastatine < fluvastatine.

Cet ordre démontre qu'outre les interactions de van der Waals et électrostatiques, d'autres forces telles que les interactions hydrophobes gouvernent également ce mécanisme. En effet, cet ordre est aussi lié au degré de lipophilie des xénobiotiques (tableaux 1 et 3 des chapitres **A.2.4.** et **D.1.2.**).

La figure 46 représente la variation du nombre de magnésium ($n_{Mg^{2+}}$) impliqué dans le mécanisme de liaison des xénobiotiques sur le site actif de l'Oatp2 en fonction de la température.

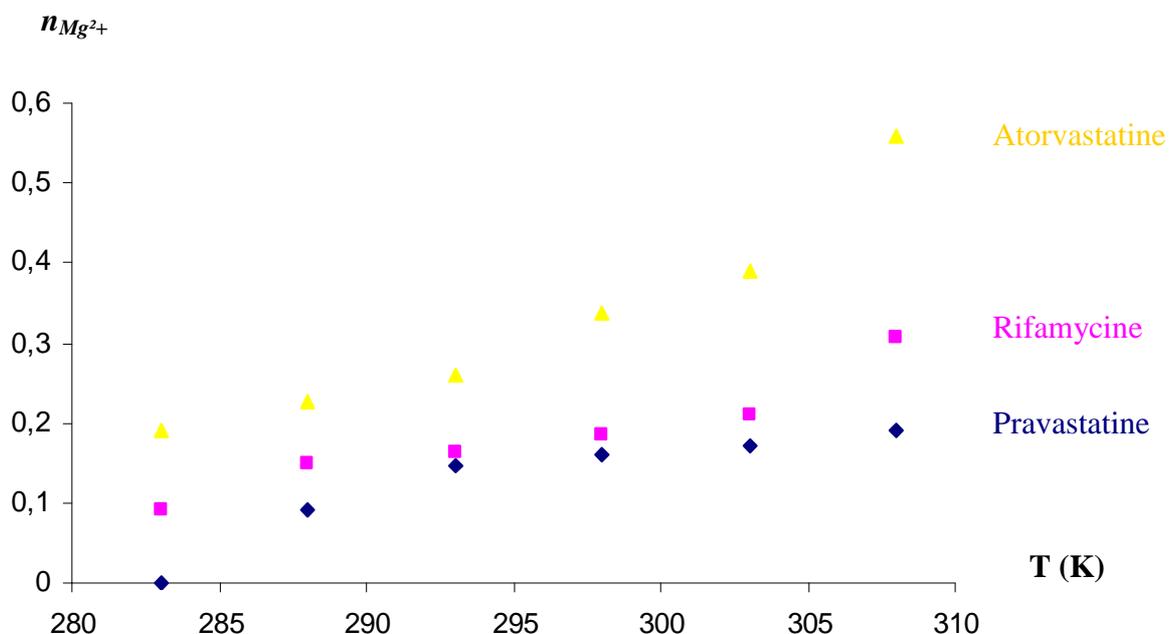


Figure 46 : Variation des $n_{Mg^{2+}}$ de l'atorvastatine, de la rifamycine et de la pravastatine en fonction de la température (T) de la colonne

Les valeurs de $n_{Mg^{2+}}$ sont déterminées à partir de la courbe $\ln k'$ en fonction de $\ln c$ (équation 21). Ces données sont positives et augmentent avec la température. Elles sont accompagnées par une diminution de l'affinité des xénobiotiques avec le site actif de l'Oatp2. En effet, la formation de liaison ionique entre le Mg^{2+} et les groupements carboxyles négativement chargés de deux xénobiotiques peuvent expliquer ce nombre positif de Mg^{2+} . De plus, la diminution de l'attraction électrostatique entre les xénobiotiques et le pore chargé positivement de l'Oatp2 peut induire ces valeurs positives du $n_{Mg^{2+}}$. Ceci provoque la diminution de la fixation des xénobiotiques sur le site actif de la protéine quand la concentration en ions magnésium augmente dans le milieu d'étude.

La courbe ΔH° en fonction $\Delta S^{\circ*}$ permet de déterminer la CEE pour toutes les xénobiotiques à toutes les concentrations de magnésium. Cette courbe est représentée par la figure 47.

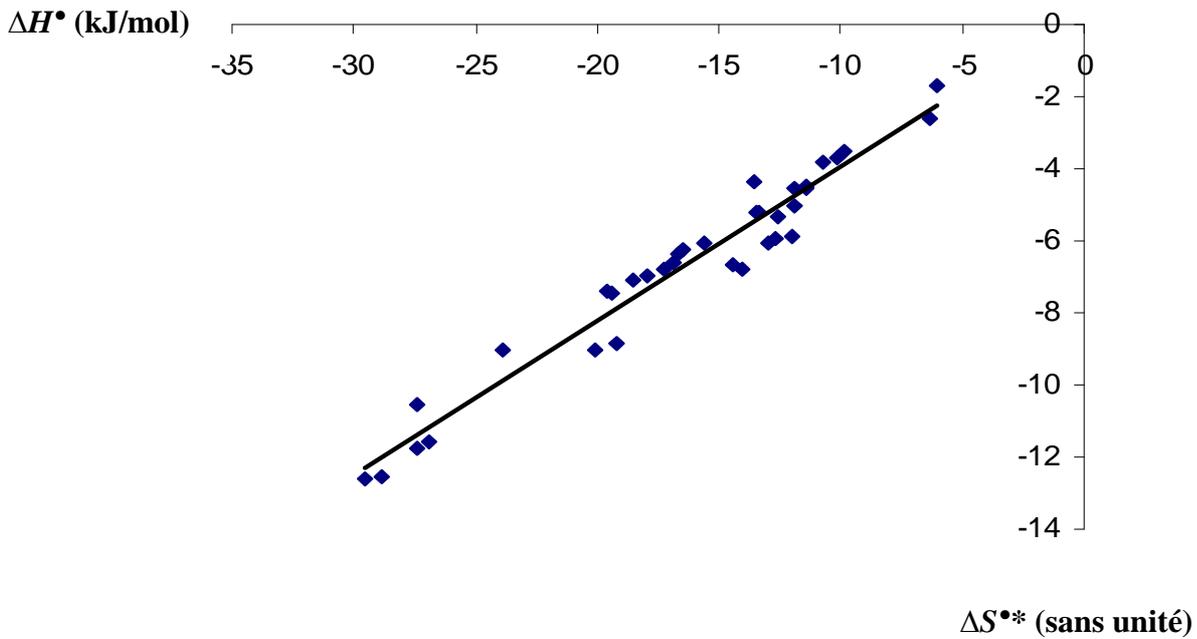


Figure 47 : Compensation enthalpie-entropie pour tous les xénobiotiques et pour toutes les concentrations de magnésium

Ce résultat démontre que le mécanisme de fixation des xénobiotiques sur le site actif de l'Oatp2 est indépendant de la structure chimique de ces derniers mais aussi de la concentration en magnésium dans le milieu d'étude.

En conclusion, les résultats obtenus ont permis de montrer que les statines et la rifamycine se fixent sur le pore positif de l'Oatp2. Le magnésium provoque une diminution de cette affinité en créant des liaisons ioniques avec les xénobiotiques. Le pore positif de l'Oatp2 n'est donc plus accessible aux xénobiotiques. L'association xénobiotique-Oatp2 (i.e. la diffusion facilitée) est gouvernée par des forces électrostatiques, des liaisons de van der Waals et hydrophobes. Cette étude ouvre d'autres perspectives pour déterminer un inhibiteur spécifique des OATPs. En effet, la détermination de cet inhibiteur spécifique va permettre de mieux visualiser l'influence des OATPs sur le mécanisme de passage membranaire. Le modèle de la colonne Oatp2 se trouve être une méthode de screening simple et rapide pour

étudier la diffusion facilitée des xénobiotiques chargés négativement et spécifiques à ces types de transporteurs.

D.3. Analyse de l'association des statines avec un extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2 : Modèle de la CMC

A partir d'hépatocytes de rat traités avec des inducteurs de l'Oatp2, une colonne biochromatographique a été mise au point au sein de notre laboratoire. Cette colonne est obtenue en immobilisant « *in-batch* » un extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2 sur des particules de silice. Toutes les manipulations sont effectuées à température et pH physiologiques (37°C et 7,4) pour des résultats optimaux.

Pour vérifier si les hépatocytes de rat surexpriment l'Oatp2, nous avons analysé les niveaux d'expression des ARNm de l'Oatp2 et des CYP3A1/4A1 (tableau 10) par PCR quantitative.

INDUCTEURS	CYP3A1	CYP4A1	Oatp2
DEX (50 μ M)	87,43	-12,50	1,50
PCN (100 μ M)	4002,45	-14,28	-1,29
BEZA (250 μ M)	9302,05	83,29	-25,00

Tableau 10 : Expression des ARNm CYP3A1, CYP4A1 et Oatp2 par PCR quantitative après 48 h de traitement des cultures d'hépatocytes avec des composés inducteurs de référence (DEX, PCN et BEZA)

Résultats exprimés en nombre de fois de la valeur du groupe contrôle (contrôle = 1). Les valeurs positives (> à 1) indiquent une induction de l'expression de l'ARNm, alors que les valeurs négatives indiquent une répression de cette expression.

Le traitement de notre culture d'hépatocytes de rat pendant 48 h avec 50 μ M DEX augmente l'expression du CYP3A1 (87,4-fois l'expression de cet ARNm comparativement au groupe contrôle). De plus, le traitement par 50 μ M BEZA augmente l'expression du CYP3A1 et 4A1 (9302,0- et 83,3- fois respectivement). Ces résultats en parfaite adéquation avec des données recueillies dans la littérature quant aux inducteurs de référence des CYP, prouvent que notre modèle d'étude est fiable (TURNCLIFF *et al.* 2004, ALVERGNAS *et al.* 2009).

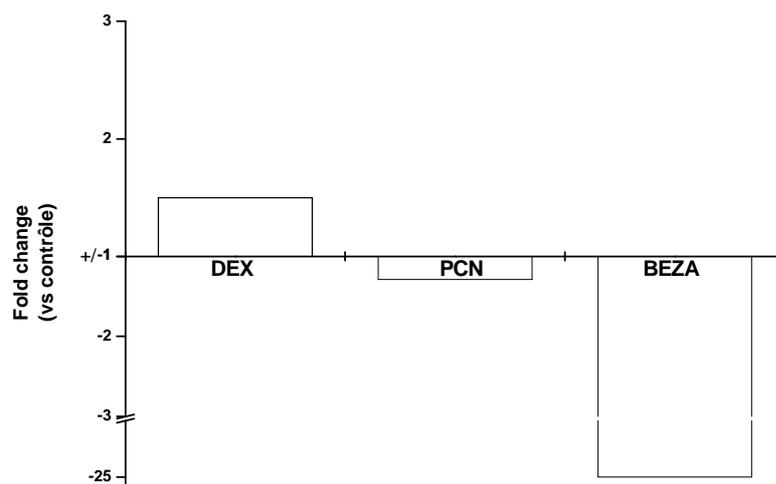


Figure 48 : Expression de l'ARNm de l'Oatp2 par PCR quantitative après 72 h de traitement des cultures d'hépatocytes avec des composés inducteurs de référence (DEX, PCN et BEZA)

Le tableau 10 et le figure 48 présentent les résultats obtenus quant à l'expression de l'ARNm de l'Oatp2 après 48h de traitement des hépatocytes en culture. Une augmentation d'un facteur 1,5-fois de l'expression de cet ARNm après traitement par la DEX est observée. Ce résultat est en accord avec la littérature puisqu'il a été montré que le traitement de cultures d'hépatocytes de rat en sandwich soit 1 μ M de DEX pendant 96 h ou 100 μ M de DEX pendant 48 h provoque une augmentation de l'expression de l'Oatp2 (LUTTRINGER *et al.* 2002, TURNCLIFF *et al.* 2004). Par contre, nous n'avons pas obtenu d'induction de l'expression de l'Oatp2 après traitement par 100 μ M de PCN alors que des travaux publiés (GUO *et al.* 2002) décrivent une induction après traitement d'hépatocytes de rat par PCN à cette même concentration pendant 72 h. Les taux d'expression obtenus dans notre étude sont semblables à ceux obtenus dans le groupe contrôle. Ceci peut être expliqué par la présence de cristaux de PCN non dissous dans notre milieu de culture lors du traitement des hépatocytes avec la concentration 100 μ M de PCN; ceci impliquerait que la concentration finale de traitement obtenue était inférieure à 100 μ M et à cette concentration ce composé n'est plus inducteur (GUO *et al.* 2002).

Le bézafibrate provoque une répression de l'expression de l'ARNm de l'Oatp2 d'un facteur 25-fois par rapport au groupe contrôle. Une étude *in vivo* de Nakajima et *al.* a démontré que le traitement avec 10 mg/kg/jour ou 100 mg/kg/jour de BEZA pendant 10 jours n'induisait aucun changement des taux d'expression des ARNm de l'Oatp2 et de l'Oatp1 chez des souris (NAKAJIMA et *al.* 2008). Notre étude *in vitro* a permis de montrer pour la première fois l'effet du bézafibrate sur l'expression de l'ARNm de l'Oatp2 chez le rat.

Pour confirmer cet effet des inducteurs sur l'expression de l'Oatp2, des colonnes biochromatographiques immobilisées avec des extraits membranaires surexprimés ou non en Oatp2 ont été fabriquées pour étudier la diffusion facilitée des statines. Chaque colonne contient une phase stationnaire constituée de particules de silice immobilisées avec des fragments cellulaires d'un des quatre groupes de cellules traitées ou non. Les colonnes vont être nommées par les termes CMC_{CONTROL}, CMC_{DEX}, CMC_{PCN} et CMC_{BEZA}. Avant chaque remplissage de la colonne par la phase stationnaire greffée, un test par le réactif de Pierce est effectué pour vérifier la présence de protéines. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 30 min et l'intensité de la couleur pourpre est proportionnelle à la quantité de protéines dans le milieu. Ce test est positif et est présenté dans le chapitre **C.2.3.3**. Il confirme bien que les protéines membranaires sont immobilisées sur les particules de silice.

L'affinité des statines et de la rifamycine sur ces colonnes est exprimée par le facteur de rétention k' . Plus k' est grand plus l'affinité des xénobiotiques avec la phase stationnaire, constituée d'un extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2, est grande.

Les chromatogrammes de la fluvastatine obtenus pour chaque colonne CMC sont représentés sur la figure suivante :

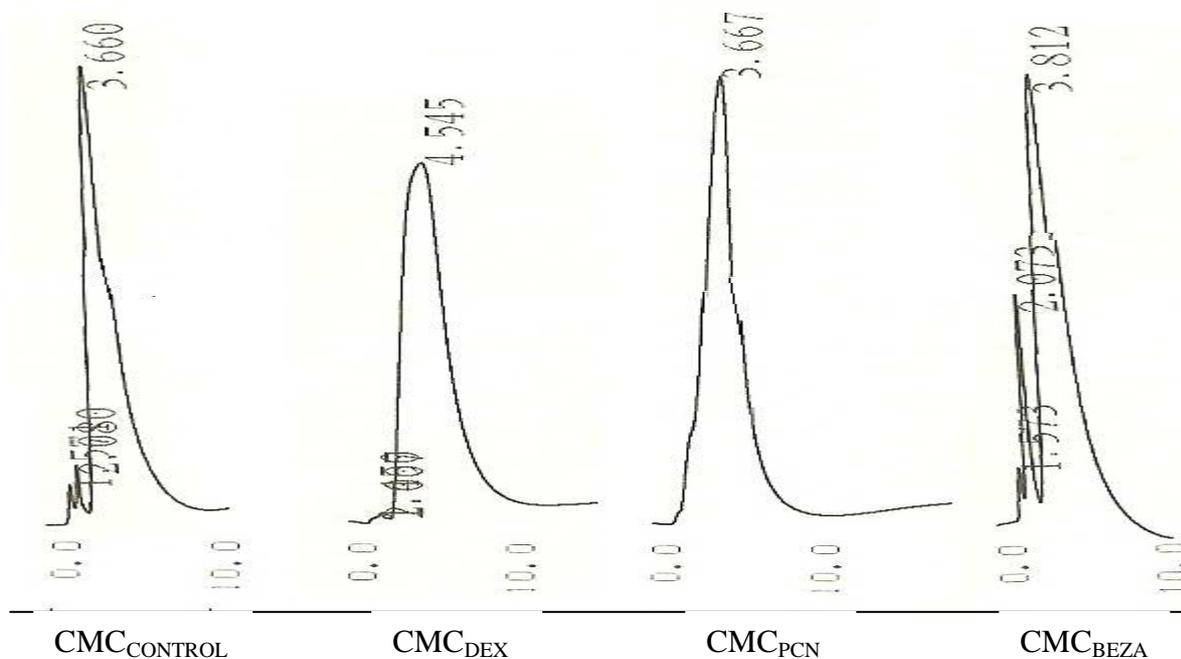


Figure 49 : *Chromatogrammes de la fluvastatine obtenus avec les différentes colonnes CMC à 37°C (phase mobile : tampon phosphate 0,05 mM, pH=7,4 et débit : 0,3 ml/min)*

Le tableau 11 et la figure 50 ci-dessous représentent les facteurs de rétention k' des pharmacomolécules obtenus à 37°C et à pH = 7,4 pour chaque colonne. k' représente ici la diffusion facilitée des xénobiotiques étudiés.

Molécules	CMC _{CONTROL}	CMC _{DEX}	CMC _{PCN}	CMC _{BEZA}
Pravastatine	0,23	0,64	0,47	0,29
Mévastatine	0,55	1,14	0,96	0,64
Rifamycine	1,21	1,56	1,31	1,05
Atorvastatine	1,21	1,75	1,26	1,11
Fluvastatine	1,16	1,81	1,26	1,32

Tableau 11 : *Valeurs de la rétention k' des xénobiotiques sur les quatre CMC*

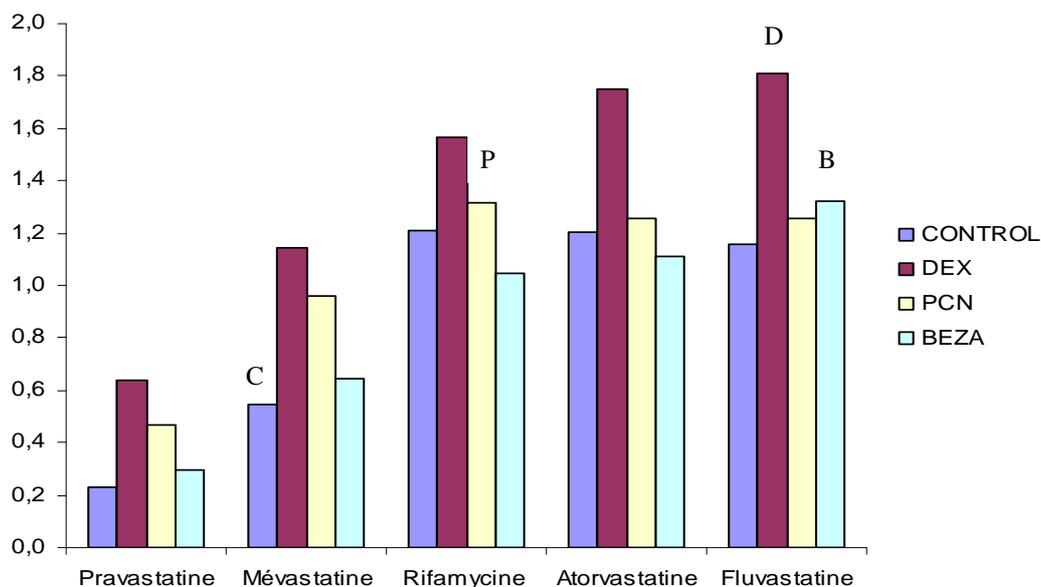


Figure 50 : Comparaison des valeurs de la rétention k' des xénobiotiques sur les quatre CMC

L'ordre de fixation des xénobiotiques sur les quatre colonnes est la même : Fluvastatine > Atorvastatine > Rifamycine > Mévastatine > Pravastatine.

L'affinité de ces xénobiotiques avec la phase stationnaire est plus grande pour la CMC_{DEX} que pour les autres colonnes. Par exemple la diffusion facilitée de la pravastatine est de 0,23 et 0,64 pour respectivement les colonnes CMC_{CONTROL} et CMC_{DEX}. Cette diffusion est faible voir insignifiante pour la CMC_{BEZA}. Ces résultats semblent bien se corrélérer avec les données obtenues sur l'expression de l'ARNm de l'Oatp2. En effet, cette expression est plus importante pour les hépatocytes traités avec la dexaméthasone qu'avec les autres traitements. L'ordre de diffusion facilitée sur ces colonnes greffées semble être la même que celle obtenue sur la colonne Oatp2 (chapitre **D.2.**). Selon CHENG et *al.*, la diminution de la toxicité de la digoxine chez des rats prétraités avec des ligands PXR était due à une augmentation de sa diffusion dans le foie via l'activation des récepteurs nucléaires PXR et la régulation ou la surexpression de l'Oatp2 (CHENG et *al.* 2005). De plus, l'activation de ces récepteurs nucléaires par l'acide lithocholique et l'augmentation de l'expression de l'Oatp2 provoquent la diminution de la synthèse des acides biliaires et l'augmentation de leur diffusion

(STAUDINGER et al. 2001, CHENG et al. 2005). Cette expression de l'Oatp2 serait régulée par l'activation du PXR via l'élément de réponse DR3, un nucléotide présent au niveau du promoteur de l'Oatp2, qui induirait la transcription du gène de ce transporteur membranaire (GUO et al. 2002, LUTTRINGER et al. 2002). Ainsi l'augmentation de l'expression de l'Oatp2 par la DEX peut induire une augmentation de la diffusion des xénobiotiques donc de leur rétention sur la CMC_{DEX} . HASEGAWA et al. ont démontré que le transport de la pravastatine à travers les hépatocytes chez des rats diabétiques STZ-4w était favorisé par une augmentation de l'expression de l'Oatp2 (HASEGAWA et al. 2010).

Une étude de l'effet de la rifamycine, un inhibiteur de l'Oatp2, sur la fixation des statines sur la CMC_{DEX} a été effectuée. La rifamycine a été ajoutée à des concentrations croissantes dans le milieu d'étude. Après chaque concentration, la colonne est lavée et les statines réinjectées. Les temps de rétention obtenus sont à 0,1 % les mêmes que ceux obtenus à 0 mM de rifamycine dans le milieu d'étude. La figure 51 montre la variation de la diffusion facilitée des statines quand la concentration de rifamycine (c) augmente dans le milieu d'étude.

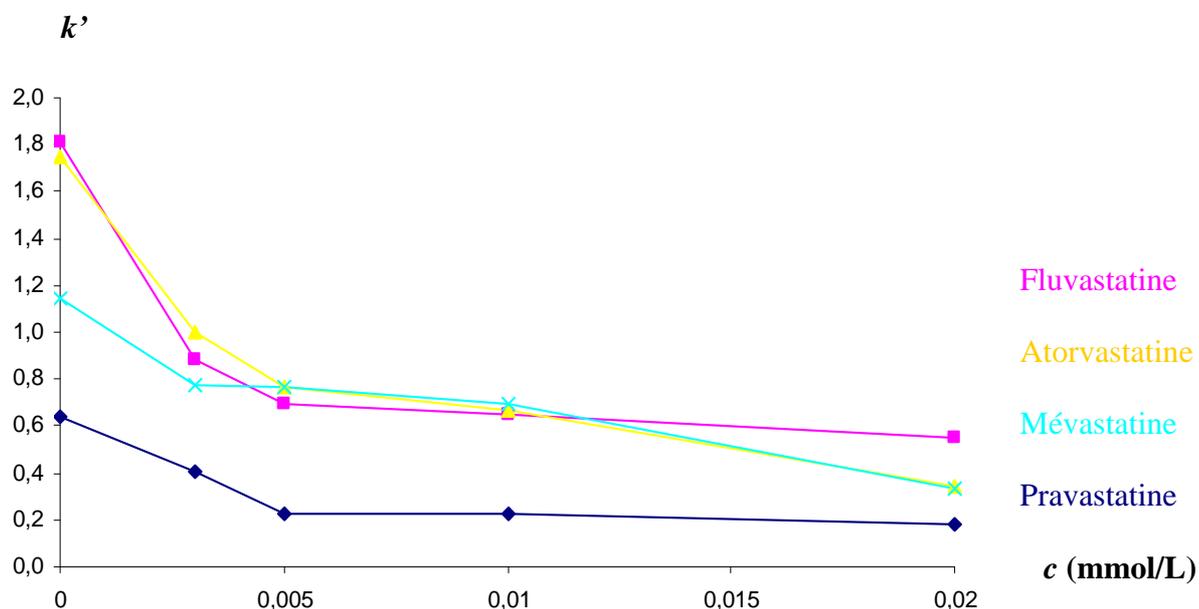


Figure 51 : Effet de la concentration en rifamycine (c) sur la diffusion (représentée par k') des statines sur la CMC_{DEX} à 37°C

La rétention des statines sur la CMC_{DEX} diminue avec l'augmentation de la concentration en rifamycine dans le milieu d'étude. Cette diminution est plus importante et accentuée aux concentrations inférieures à 0,005 mM avec une pente plus forte. Cependant à partir de cette concentration la diminution de la diffusion facilitée des statines est faible et l'augmentation de la concentration en rifamycine ne l'affecte pas trop. Il est possible qu'à partir de cette concentration la totalité des sites actifs de l'Oatp2 soit encombrée et qu'aucun pore actif ne soit accessible aux statines.

En conclusion, cette nouvelle technique qui palie l'utilisation du détergent dans la solubilisation des protéines, permet une étude de la diffusion facilitée des xénobiotiques. Les résultats obtenus ont confirmé les données obtenues sur la nouvelle colonne Oatp2 (chapitre **C.2.**). Le coefficient de corrélation ($r^2 = 0,89$, figure 52) semble indiquer que la colonne Oatp2 permet d'étudier la diffusion facilitée des xénobiotiques aussi bien que celle immobilisée avec l'extrait membranaire surexprimé en Oatp2 (CMC_{DEX} ou CMC_{Oatp2}).

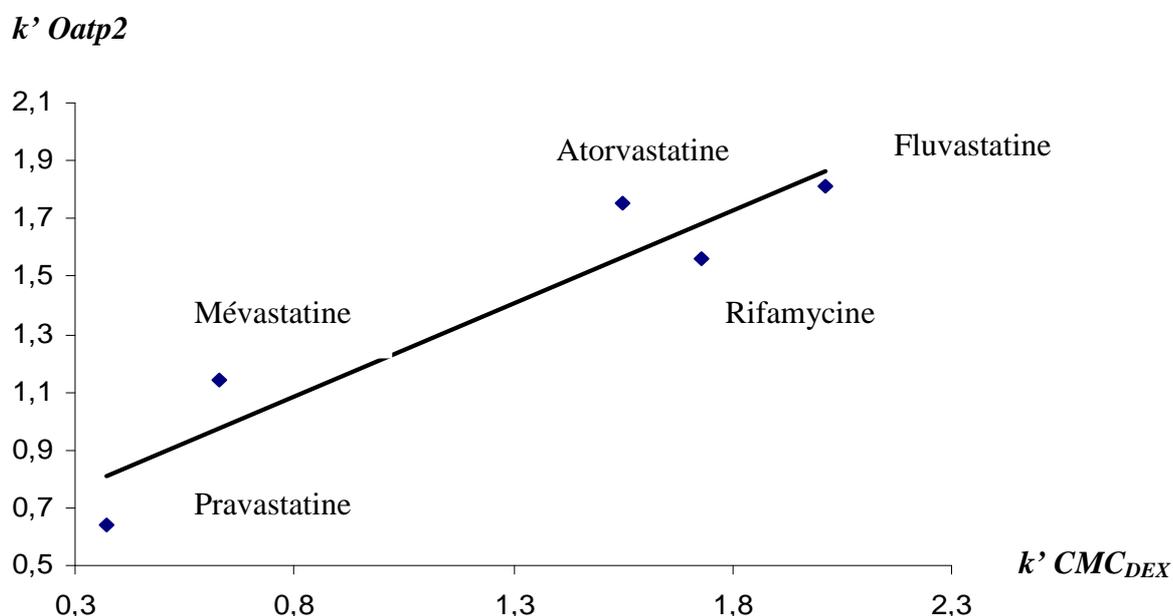


Figure 52 : Corrélation entre les valeurs de la diffusion facilitée (représentée par k') des xénobiotiques sur la colonne Oatp2 et la CMC_{DEX}

Cependant la CMC est beaucoup plus lourde dans son processus de mise au point que la colonne Oatp2. En effet elle nécessite un matériel biologique, des rats de laboratoire. Ces animaux doivent être acclimatés en animalerie avant de pouvoir être utilisé dans nos expérimentations ; ensuite un isolement des hépatocytes est nécessaire. En effet, l'induction des protéines membranaires passe d'abord par la préparation des cellules et leur culture pendant 72 h. Ensuite l'extrait membranaire surexprimé ou non en Oatp2 doit être préparé et immobilisé sur des particules de silice (CMC_{Oatp2+/-}) pour étudier enfin la diffusion des xénobiotiques. Par contre la colonne Oatp2 est une colonne dont la mise au point est plus simple et plus rapide. L'Oatp2 et les colonnes silices propylamines sont disponibles dans le commerce et la technique d'immobilisation dure au plus 48 h. La méthode de greffage des protéines sur un support en silice ouvre de nouvelles perspectives pour étudier la diffusion facilitée des xénobiotiques avec d'autres protéines membranaires.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La mise au point de nouvelles colonnes chromatographiques pour étudier les propriétés pharmacologiques des xénobiotiques a suscité un intérêt majeur. En effet, ce sont des techniques de screening rapides et fiables. Elles permettent, en utilisant la chromatographie liquide haute performance (CLHP), d'analyser et de mieux comprendre les processus physico-chimiques impliqués dans le mécanisme d'association des xénobiotiques sur les différentes phases stationnaires remplissant une colonne chromatographique.

Le but de cette étude était de mieux appréhender et analyser, par la mise au point de nouvelles colonnes chromatographiques, les associations impliquées dans les diffusions passive et facilitée des statines à travers les membranes biologiques. Ainsi les différentes méthodes chromatographiques utilisées pour atteindre cet objectif sont constituées de différents supports tels que la membrane artificielle immobilisée (MAI), le transporteur polypeptide d'anion organique 2 (Oatp2) ou des extraits membranaires surexprimés ou non en Oatp2 (CMC_{Oatp2+/-}) greffés sur des particules de silice. Ces deux dernières nouvelles colonnes biochromatographiques ont été développées au sein de notre laboratoire pour étudier la diffusion facilitée des statines à travers les hépatocytes.

Ces différentes méthodes ont permis de tirer les résultats généraux suivants :

- La diffusion passive des statines ou leur fixation sur la MAI est pH-dépendante
- Le rôle prépondérant des interactions hydrophobes dans la diffusion passive des statines
- L'intensité des liaisons de van der Waals et hydrogènes sur le mécanisme d'association des statines
- La fonction catalytique du groupement phosphate de la tête polaire de la MAI a été montrée pour la première fois. Il joue un rôle de navette à protons en modifiant le pKa des statines
- L'influence de certains ions tels que le magnésium et le calcium sur la diffusion passive des statines et sur le processus d'association statine-MAI a été démontrée. De

manière générale, le magnésium diminue la diffusion de la pravastatine mais augmentent celle des autres statines

- La diffusion facilitée des statines se fait grâce à des interactions électrostatiques avec le site actif positivement chargé de l'Oatp2

Les données obtenues sur la colonne Oatp2 sont comparées avec les résultats obtenus sur une nouvelle colonne dont la phase stationnaire est constituée d'un extrait membranaire surexprimé en Oatp2. Pour cela les hépatocytes ont été traités par différents inducteurs.

- La dexaméthasone (DEX) permet une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'Oatp2
- La CMC_{DEX} est la colonne avec laquelle la diffusion facilitée des statines est la plus importante
- Les résultats obtenus sur la colonne Oatp2 et la CMC_{DEX} sont similaires. La colonne Oatp2 est une nouvelle colonne plus simple à réaliser d'un point de vue expérimental et qui permet d'étudier la diffusion facilitée des statines

Ce travail de recherche démontre l'importance des colonnes biochromatographiques dans l'analyse des processus de transport des xénobiotiques en utilisant la chromatographie liquide haute performance (CLHP). La phase stationnaire Oatp2, couplée à une colonne d'analyse séparative classique (type colonne C18) et à un spectre de masse (SM) (i.e., CLHP-Oatp2/CLHP-C18/SM), devrait permettre de faire des études de type « screening » pour trouver et développer de nouveaux inhibiteurs spécifiques pour chaque membre de la sous-famille des Oatps. Cette méthode de greffage de l'Oatp2 sur des particules de silice propylamine ouvre de nouvelles perspectives dans la mise au point de colonnes biochromatographiques greffées avec les transporteurs membranaires des xénobiotiques ciblés.

REFERENCES

- ABRAHAM M.H., TAKACS-NOVAK K., MITCHELL R.C., On the partition of ampholytes : application to blood-brain, *J. Pharm. Sci.*, **1997**, 86 : 310-315
- AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé), Prise en charge du patient dyslipidémique - recommandations de bonnes pratiques, **2005**
- ANDRÉ C., Traitement thermodynamique de l'équilibre d'association entre une série de pesticides et diverses molécules cibles : approche biochromatographique et applications biologiques, Thèse **2005**
- ANDRÉ C., BERTHELOT A., ROBERT J.F., THOMASSIN M., GUILLAUME Y.C., Testimony of the correlation between DHEA and bioavailable testosterone using a biochromatographic concept: effect of two salts, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 33 : 911-921
- ANDRÉ C., GUYON C., THOMASSIN M., BARBIER A., RICHERT L., GUILLAUME Y.C., Association mechanism between a series of rodenticide and humic acid: A frontal analysis to support the biological data, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2005**, 820 : 9-14
- ALVERGNAS M., RICHERT L., BLANCHARD N., ABADIE C., HEYD B., MANTION G., GALLEMANN D., MARTIN H., Regulation of CYP4A expression by bezafibrate in primary culture of rat and human hepatocytes: interspecies difference and influence of N-acetylcysteine, *Toxicol. In Vitro.*, **2009**, 23 : 1259-1267
- BACK J.F., OAKENFULL D., SMITH M.B., Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols, *Biochemistry*, **1979**, 18 : 5191-5212
- BALLIGAND J.L., Traitement hypolipémiant combiné pour une prise en charge efficace de l'hypercholestérolémie : Nouvel appoint de l'ézétimibe. *Louvain médical*, **2004**, 123 : 132-136

- BANGHAM A.D., STANDISH M.M., WATKINS J.C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, **1965**, 13 : 238-252
- BRAUMANN T., WEBER G., GRIMME L.H., Quantitative structure-activity relationships for herbicides : reversed-phase liquid chromatographic retention parameter, log k[w], versus liquid-liquid partition coefficient as a model of the hydrophobicity of phenylureas, s-triazines and phenoxy-carbonic acid derivatives. *J. Chromatogr.*, 1983, **261** : 329-343
- CADRANEL J.F., SEDDIK M., LORIC S., JEANNE S., Statins : Hepatotoxicity and monitoring. *Biothérapies*, **2009**, 38 : 717-725
- CACCURI A.M., ANTONINI G., BOARD P.G., PARKER M.W., NICOTRA M., LO BELLO M., FEDERICI G., RICCI G., Proton release on binding of glutathione to alpha, Mu and Delta class glutathione transferases, *Biochem. J.*, **1999**, 344 : 419-425
- CALLERI E., TEMPORINI C., FURLANETTO S., LOIODICE F., FRACCHIOLLA G., MASSOLINI G. Lipases for biocatalysis : development of a chromatographic bioreactor. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 32 : 715-724
- CAMPBELL N.A., REECE J.B., Biologie, Ed. De Boeck Université : Issy-les Moulineaux, **2004**
- CHENG X., MAHER J., DIETER M.Z., KLAASSEN C.D., Regulation of mouse organic anion-transporting polypeptides (Oatps) in liver by prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription factor pathways. *Drug Metab. Dispos.*, **2005**, 33 : 1276-1282
- CHITTURI S., GEORGE J., Hepatotoxicity of commonly used drugs: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antihypertensives, antidiabetic agents, anticonvulsivants, lipid-lowering agents, psychotropic drugs. *Sem. Liver Dis.*, **2002**, 22 : 169-183
- COLLANDER R., The partition of organic acids between higher alcohols and water. *Acta. Chem. Scand.*, **1951**, 5 : 774-780

- DANIELLI J.F., DAVSON H., A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **1935**, 5 : 495-508
- DEBYE P.J.W., Die van der Waalsschen Kohäsionskräfte, *Physik. Zeitschr.*, **1920**, 21 : 178-187
- DEBYE P.J.W., Molekularkräfte und ihre Elektrische Deutung, *Physik. Zeitschr.*, **1921**, 22 : 302-308
- DENG D.D., LUI C.Y., LIAO Z.X., LIANG J.Y., LU J.Z., Prediction of Passive Transport of 10 Natural Products by Liposome-based Fluorescence Technique, *Chinese J. Anal. Chem.*, **2007**, 35 : 1696-1700
- DE ROBERTIS E.M.F., LEMONDE A., DELISLE C., Biologie cellulaire et moléculaire. Presses de l'université Laval, Québec Maloine S.A Ed. Paris **1983**
- DIAZ G.J., Basolateral and canalicular transport of xenobiotics in the hepatocyte : A review. *Cytotechnology*, **2000**, 34 : 225-235
- DREES (Direction de la Recherche des Etudes de l'Evaluation et des Statistiques), Le marché des statines dans cinq pays européens, structure et evolution en 2004. n°509, **2006**
- EVERS R., CHU X.-Y., Role of the Murine Organic Anion-Transporting Polypeptide 1b2 (Oatp1b2) in Drug Disposition and Hepatotoxicity, *Mol. Pharmacol.*, **2008**, 74 : 309-311
- FELDMAN G., Membrane plasmique de l'hépatocyte et pathologie hépatique, *Hépatologie*, **1997**

FIX M., MELCHIOR D.L., The Fluorosome technique for investigating membrane on-and off-loading of drugs by beta-CD and sonicated SUV, *FEBS Lett.*, **2002**, 516 : 109-112

GARRIDO E., GIRARD J.M., JACQUET E., LALLEMAND J.Y., LECLAIRE M., LEVAIQUE H., PAMLARD O., SIZUN C., Etude structurale et fonctionnelle des transporteurs ABC, ICSN **2006**

GIRELLI A.M., MATTEI E., Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review, *J. Chromatogr. B.*, **2005**, 819 : 3-16

GUILLAUME Y.C., NICOD L., TRUONG T.T., GUINCHARD C., ROBERT J.F., THOMASSIN M., Role of the magnesium cation on antihypertensive molecule-human serum albumin binding: affinity chromatography approach, *J. Chromatogr. B.*, **2002a**, 768 : 129-135

GUILLAUME Y.C., TRUONG T.T., MILLET J., NICOD L., ROULAND J.C., THOMASSIN M., Role of the Na⁺ ion on phenol derivatives/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex formation on porous graphitic carbon phase, *J. Chromatogr. A.*, **2002**, 955 : 197-205

GUO G.L., STAUDINGER J., OGURA K., KLAASSEN C.D. Induction of rat organic anion transporting polypeptide 2 by pregnenolone-16alpha-carbonitrile is via interaction with pregnane X receptor. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, 61 : 832-839

HAGE D.S., Affinity Chromatography : A review of clinical applications, *Clin. Chem.*, **1999**, 45 : 593-615

HAGENBUCH B., MEIER P.J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.*, **2004**, 447 : 653-665

- HAMELIN B.A., TURGEON J., Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors, *Trends Pharmacol. Sci.*, **1998**, 19 : 26-37
- HÄNGGI E., GRUNDSCHÖBER A.F., LEUTHOLD S., MEIER P.J., ST-PIERRE M.V., Functional Analysis of the Extracellular Cysteine Residues in the Human Organic Anion Transporting Polypeptide, OATP2B1, *Mol. Pharmacol.*, **2006**, 70 : 806-817
- HARTMANN G., CHEUNG A.K., PIQUETTE-MILLER M., Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002, 303 : 273-281
- HASEGAWA Y., KISHIMOTO S., SHIBATANI N., INOTSIME N., TAKEUCHI Y., FUKUSHIMA S., The disposition of pravastatin in a rat model of streptozotocin-induced diabetes and organic anion transporting polypeptide 2 and multidrug resistance-associated protein 2 expression in the liver, *Biol. Pharm. Bull.*, **2010**, 33 : 153-156
- HEANEY R.P., NORDIN B.E., Calcium effects on phosphorus absorption: implications for the prevention and co-therapy of osteoporosis, *J. Am. Coll. Nutr.*, **2002**, 21 : 239-244
- HE L.C., GENG X.D., Cell-membrane chromatography-a new technique in studying drug-receptor interaction, *N. Prog. Biomed. Chromatogr.*, **1996**, 3 : 8-9
- HE L.C., WANG S.C., GENG X.D., Coating and fusing cell membranes onto silica surface and their chromatographic characteristics, *Chromatographia*, **2001**, 54 : 71-76
- HE L.C., WANG S.C., YANG G., ZHANG Y., WANG C., YUAN B., HOU X., Progress in cell membrane chromatography, *Drug Discov. Ther.*, **2007**, 1 : 104-107
- HOFFMANN U., KROEMER H.K., The ABC Transporters MDR1 and MRP2 : Multiple Functions in Disposition of Xenobiotics and Drug Resistance, *Drug Metab. Reviews*, **2004**, 36 : 669-701

HOPKINS W.G., *Physiologie Végétale*, Ed. John Wiley & Sons, Inc. **1995**

<http://med.tn.tudelft.nl/~hadley/nanoscience/week4/4.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pccompound>

HULSHOFF A., PERRIN J.H., A comparison of the determination of partition coefficients of 1,4-benzodiazepines by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography, *J. Chromatogr.*, **1976**, 129 : 263-276

ISMAILI L., REFOUVELET B., XICLUNA A., ROBERT J.F., GUILLAUME Y.C., Phloroglucinol: novel synthesis and role of the magnesium cation on its binding with human serum albumin (HSA) using a biochromatographic approach based on Langmuir isotherms, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 32 : 549-553

ISTVAN E., Statin inhibition of HMG-CoA reductase: A 3-dimensional view, *Atheroscler. Suppl.*, **2003**, 4 : 3-8

JUNG D., KULLAK-UBLICK G.A., Hepatocyte nuclear factor 1a: a key mediator of the effect of bile acids on gene expression, *Hepatology*, **2003**, 37 : 622-631

JUNG D., HAGENBUCH B., GRESH L., PONTOGLIO M., MEIER P.J., KULLAK-UBLICK G., Characterization of the Human OATP-C (SLC21A6) Gene Promoter and Regulation of Liver-specific OATP Genes by Hepatocyte Nuclear Factor, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276 : 37206-37214

KEESOM W.H., On the Deduction of the Equation of State from Boltzmann's Entropy Principle, *Communications Physical Laboratory University of Leiden Supplement*, Ed. *Kamerlingh Onnes H., Eduard Ijdo Printer, Leiden*, Supplement 24a to No. 121-132, **1912a**

KESOM W.H., On the Deduction from Boltzmann's Entropy Principle of the Second Virial-coefficient for Material Particles (in the Limit Rigid Spheres of Central Symmetry) which Exert Central Forces Upon Each Other and For Rigid Spheres of Central Symmetry Containing an Electric Doublet at Their Centers, *Communications Physical Laboratory University of Leiden Supplement*, Ed. *Kamerlingh Onnes H., Eduard Ijdo Printer, Leiden, Supplement 24b to No. 121-132, 1912b*

KELLER S.R., *Histology of the liver, Gallbladder, and pancreas, Physiology, 2004*

KIMURA T., PERRY J., ANZAI N., PRITCHARD J.B., MOADDEL R., Development and characterization of immobilized human organic anion transporter-based liquid chromatographic stationary phase: hOAT1 and hOAT2, *J. Chromatogr. B.*, **2007**, 859 : 267-271

KÖNIG J., CUI Y., NIES A.T., KEPLER D., A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am. J. Physiol. Gastrointest, Liver Physiol.*, **2000**, 278 : 156-164

KÖNIG J., SEITHEL, A., GRADHAND U., FROMM M.F. Pharmacogenomics of human OATP transporters, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **2006**, 372 : 432-443

LAW M., RUDNICKA A.R., Statin safety : A systemic review, *Am. J. Cardiol.*, **2006**, 97 : 52-60

LEO A.J., HANOCH C., ELKINS D., Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.*, 1971, 71 : 525-615

LEUTHOLD S., HAGENBUCH B., MOHEBBI N., WAGNER C.A., MEIER P.J., STIEGER B., Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2009**, 65 : 579-582

LE VEE M., Protéines de transport membranaire des xénobiotiques : optimisation des modèles d'étude *in vitro* et étude des mécanismes de régulation de leur expression, Mémoire **2006**

LEWIN J.J., NAPPI J.M., TAYLOR M.H., Rhabdomyolysis with concurrent atorvastatin and diltiazem, *Ann. Pharmacother.*, **2002**, 36 : 1546-1549

LI Y., HE L.C., Establishment of the model of vascular endothelial cell membrane chromatography and its preliminary application, *Biomed. Life Sciences*, **2007**, 52 : 922-928

LI N., KLAASSEN C.D., Role of liver-enriched transcription factors in the down-regulation of organic anion transporting polypeptide 4 (oatp4; oatp1b2; slc21a10) by lipopolysaccharide, *Mol. Pharmacol.*, **2004**, 66 : 694-701

LODISH H., BALTIMORE D., BERK A., ZIPURSKY L., MATSUDAIRA P., DARNELL J., *Molecular Cell Biology*, Ed. W.H. Freeman and Compagny, New York 1995

LONDON F., Zur Theorie und Systematik der Molekularkräfte, *Z. Physik.*, **1930**, 63 : 245-279

LONDON F., The General Theory of Molecular forces, *Trans. Faraday Soc.*, **1937**, 33 : 8-26

LO NOSTRO P., FRATONI L., NINHAM B.W., BAGLIONI P., Water absorbency by wool fibers: Hofmeister effect, *Biomacromolecules*, **2002**, 3 : 1217-1224

LORIN A., FLORE C., THOMAS A., BRASSEUR R., Les liposomes : description, fabrication et applications, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2004**, 8 : 163-176

LU L., LEONESSA F., CLARKE R., WAINER I.W., Competitive and Allosteric Interactions in Ligand Binding to P-glycoprotein as Observed on an Immobilized P-glycoprotein Liquid Chromatographic Stationary Phase, *Molecular Pharmacol.*, **2001**, 59 : 62-68

LUDMAN A., VENUGOPAL V., YELLON D.M., HAUSENLOY D.J., Statins and cardioprotection - More than just lipid lowering? *Pharmacol. Ther.*, **2009**, 122 : 30-43

LUNDAHL P., ZENG C.M., LAGERQUIST HÄGGLUND C., GOTTSCHALK I. et GREIJER E., Chromatographic approaches to liposomes, proteoliposomes and biomembrane vesicles. *J. Chromatogr. B.*, **1999**, 722 : 103-120

LUTTRINGER O., THEIL F.P., LAVÉ T., WERNLI-KURATLI K., GUENTERT T.W., DE SAIZIEU A., Influence of isolation procedure, extracellular matrix and dexamethasone on the regulation of membrane transporters gene expression in rat hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.*, **2002**, 64 : 1637-1650

MAHAGITA C., GRASSL S.M., PIYACHATURAWAT P., BALLATORI N., Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2007**, 293 : 271-278

MAHUZIER G., HAMON M., FERRIER D., PROGNON P., Chimie Analytique : méthode de séparation, Ed. Masson : Paris **1999**

MARKOVICH R.J., STEVENS J.M., PIDGEON C., Fourier transform infrared assessed of membrane lipids immobilized artificial membrane surfaces, *Anal. Chem.*, **1991a**, 63 : 1851-1890

MARKOVICH R.J., QIU X., NICHOLS D.E., PIDGEON C., INVERGO B., ALVAREZ F.M., Silica subsurface amine effect on the chemical stability and chromatographic properties of the end capped immobilized artificial membrane surfaces, *Anal. Chem.*, **1991b**, 63 : 1851-1860

- MELANDER W., HORVATH C.S., In *High-Performance Liquid Chromatography; Advances and perspectives*, Vol. 2, Ed. Academic Press : New York, **1986**
- MELANDER W., HORVATH C.S., Thermodynamics of hydrophobic Absorption, « in *Activated Carbon Adsorption of Organics from the Aqueous Phase*, Ed. McGuire M.J., Suffett I.H., *Ann. Arbor. Science*, **1980**
- MEIER-ABT F., MOKRAB Y., MIZUGUCHI K., Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode, *J. Membr. Biol.*, **2005**, 208 : 213-227
- MIKKAICHI T., SUZUKI T., TANEMOTO M., ITO S., ABE T., The Organic Anion Transporter (OATP) Family, *Drug Metab. Pharmacokin.*, **2004**, 19 : 171-179
- MOADDEL R., LU L., BAYNHAM M., WAINER I.W., Immobilized receptor- and transporter-based liquid chromatographic phases for on-line pharmacological and biochemical studies: a mini-review, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2002**, 768 : 41-53
- MOADDEL R., WAINER I.W., The preparation and development of cellular membrane affinity chromatography columns, *Nature Protocols*, **2009**, 4 : 197-205
- NAKAI D., NAKAGOMI R., FURUTA Y., TOKUI T., ABE T., IKEDA T., NISHIMURA K., Human liver-specific organic anion transporter, LST-1, mediates uptake of pravastatin by human hepatocytes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2001**, 297 : 861-867
- NAKAJIMA T., TANAKA N., SUGIYAMA E., KAMIJO Y., HARA A., HU R., LI G., LI Y., NAKAMURA K., GONZALEZ F.J., AOYAMA T., Cholesterol-lowering effect of bezafibrate is independent of peroxisome proliferator-activated receptor activation in mice, *Biochem. Pharmacol.*, **2008**, 76 : 108-119

NIEMI M., SCHAEFFELER E., LANGD T., FROMMA M.F., NEUVONEN M., KYRKLUND C., BACKMAN J.T., KERB R., SCHWAB M., NEUVONEN P.J., EICHELBAUM M., KIVISTÖ K.T., High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLC01B1), *Pharmacogenetics*, **2004**, 14 : 429-440

NISHIZATO Y., IEIRI I., SUZUKI H., KIMURA M., KAWABATA K., HIROTA T., TAKANE H., IRIE S., KUSUHARA H., URASAKI Y., URAE A., HIGUCHI S., OTSUBO K., SUGIYAMA Y., Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes : consequences for pravastatin pharmaco-kinetics, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2003**, 73 : 554-565

OMS (Organisation Mondiale de la Santé), *Maladies cardio-vasculaires*, **2009**

PANDIT N.K., *Introduction to the pharmaceutical sciences*, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, **2007**

PARRA J.L., REDDY K.R., Hepatotoxicity of hypolipidemic drugs, *Clin. Liver Dis.*, **2003**, 7 : 415-453

PIDGEON C., MARCUS C., ALVAREZ F., Immobilized artificial membrane chromatography : surface chemistry and applications, In : *Applications of Enzyme Biotechnology*, Kelly J.W., Baldwin T.O. Eds : Plenum Press : New York, **1991**

PIDGEON C., ONG S., LIU H., QUI X., PIDGEON M., DANTZID A.H., MUNROE J., HORNBACK W.J., KASHER J.S., GLUNK L., SZCHZERBA T., IAM chromatography : an in vitro screen for predicting drug permeability, *J. Med. Chem.*, **1995**, 41 : 853-863

PIDGEON C., VENKATARAM U.V., Immobilized artificial membrane chromatography : supports composed of membrane lipids, *Anal. Biochem.*, **1989**, 176 : 36-47

- PRZYBYLO M., BOROWIK T., LANGNER M., Application of liposome based sensors in high-throughput screening systems, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2007, 10 : 441-450
- RANATUNGA R., VITHA M.F., CARR P.W., Mechanistic implications of the equality of compensation temperatures in chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2002, 946 : 47-49
- RAYSSIGUIER Y., GUEUX E., BUSSIÈRE L., DURLACH J., MAZUR A., Dietary magnesium affects susceptibility of lipoproteins and tissues to peroxidation in rats, *J. Am. Coll. Nutr.*, 1993, 12 : 133-137
- ROSANOFF A., SEELIG M.S., Comparison of mechanism and functional effects of magnesium and statin pharmaceuticals, *J. Am. Coll. Nutr.*, 2004, 23 : 501-505
- RHEE D., MAKKOVICH R., CHAE W.G., QUI X., PIDGEON C., Chromatographic surfaces prepared from lyso phosphatidylcholine ligands, *Anal. Chem.*, 1991, 63 : 1851-1890
- ROBERTSON J.D., The ultrastructure of cell membranes and their derivatives, *Biochemical Society Symposia*, 1959, 16 : 3-43
- SARR F.S., ANDRÉ C., GUILLAUME Y.C., Statins (HMG-coenzyme A reductase inhibitors)-biomimetic membrane binding mechanism investigated by molecular chromatography, *J. Chromatogr. B*, 2008, 868 : 20-27
- SARR F.S., GUILLAUME Y.C., ANDRÉ C. Magnesium cation effect on passive diffusion of statin molecules: Molecular chromatography approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, 47 : 651-657
- SARR F.S., ANDRÉ C., GUILLAUME Y.C., A novel biochromatographic Oatp2 column to study the transmembrane transport of statins, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, 52 : 93-98

SIMON F.R., FORTUNE J., IWAHASHI M., GARTUNG C., WOLKOFF A., SUTHERLAND E., Ethinyl estradiol cholestasis involves alterations in expression of liver sinusoidal transporters, *Am. J. Physiol.*, **1996**, 271 : 1043-1052

SINGER S.J., NICOLSON G.L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **1972**, 175 : 720-731

STAUDINGER J., LIU Y., MADAN A., HABEEBU S., KLAASSEN C.D., Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor, *Drug Metab. Dispos.*, **2001**, 29 : 1467-1472

TAILLARDAT-BERTSCHINGER A., CARRUPT P.A., BARBATO F., TESTA B., Immobilized artificial membrane (IAM)-HPLC in drug research, *J. Med. Chem.*, **2003**, 55 : 655-665

TALBERT R.L., Safety issues with statin therap., *J. Am. Pharm. Assoc.*, **2006**, 46 : 479-490

TANFORD C., The hydrophobic effect, Ed. *Wiley Inter Science* : New York, **1973**

TIMASHEFF S.N., LEE J.C., PITTZ E.P., TWEEDY N.J., The interaction of tubulin and other proteins with structure-stabilizing solvents, *J. Colloid. Interface Sci.*, **1976**, 55 : 658-675

TIRONA R.G., KIM R.B., Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP), *Advanced drug delivery reviews*, **2002**, 54 : 1343-1352

TIRONA R.G., LEAKE B.F., MERINO G., KIM R.B., Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European and African- Americans, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276 : 35669-35675

TRUJILLO C.A., MAJUMDER P., GONZALEZ F.A., MOADDEL R., ULRICH H., Immobilized P2X(2) purinergic receptor stationary phase for chromatographic determination of pharmacological properties and drug screening, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 44 : 701-710

TURNCLIFF R.Z., MEIER P.J., BROUWER K.L.R., Effect of dexamethasone treatment on the expression and function of transport proteins in sandwich-cultured rat hepatocytes, *Drug Metab. Dispo.*, **2004**, 32 : 834-839

VAN OSS C.A.J., GOOD R.J., CHAUDHURY M.K., The role of van der Waals Forces and Hydrogen Bonds in Hydrophobic Interactions Between Biopolymers and Low Energy Surfaces, *J. Colloid. Interface Sci.*, **1986**, 111 : 378-392

VAN OSS C.A.J., CHAUDHURY M.K., GOOD R.J., Monopolar Surfaces. *Adv. Colloid. Interface Sci.*, **1987**, 28 : 35-49

VAN OSS C.A.J., Forces interfaciales en milieux aqueux, Ed. *Masson* : Paris, **1996**

VAVRICKA S.R., JUNG D., FRIED M., GRUTZNER U., MEIER P.J. et KULLAK-UBLICK G.A., The human organic anion transporting polypeptide 8 (SLCO1B3) gene is transcriptionally repressed by hepatocyte nuclear factor 3beta in hepatocellular carcinoma, *J. Hepatol.*, **2004**, 40 : 212-218

VON OEPEN B., KÖRDEL W., KLEIN W., Sorption of nonpolar and polar compounds to soils : processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD-guideline 106, *Chemosphere*, **1991**, 22 : 285-304

YANG C.Y., CAI S.J., LIU H., PIDGEON C., Immobilized Artificial Membrane - Screens for drug Membrane Interactions, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1996**, 23 : 229-265

YANG G., LIN R., HU Z., ZHANG J., HAN C., HE L., WANG W., Establishment of the model CD40 cell membrane chromatography and its chromatographic characteristics, *Chromatographia*, **2008**, 67 : 829-831

YU W., YUAN B., DENG X., HE L.C., YOUYI Z., QIDE H., The preparation of HEK293 α_{1A} or HEK293 α_{1B} cell membrane stationary phase and the chromatographic affinity study of ligands of α_1 adrenoceptor, *Anal. Biochem.*, **2005**, 339 : 198-205

ZHENG A., YUAN B., ZHU F., ZHAO L., HE L.C., YANG G., Cell membrane chromatography correlated with functional assay for ligand- β -receptor affinities, *Chromatographia*, **2009**, 69 : 1373-1377

ANNEXE

LISTE DES TRAVAUX RELEVANT DE LA THESE

❖ Publications internationales à comité de lecture

SARR F.S., ANDRÉ C., GUILLAUME Y.C.

Statins (HMG-coenzyme A reductase inhibitors)-biomimetic membrane binding mechanism investigated by molecular chromatography.

Journal of Chromatography B, **2008**, 868 : 20-27

SARR F.S., GUILLAUME Y.C., ANDRÉ C.

Magnesium cation effect on passive diffusion of statin molecules: Molecular chromatography approach.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2008**, 47 : 651-657

SARR F.S., ANDRÉ C., GUILLAUME Y.C.

A novel biochromatographic Oatp2 column to study the transmembrane transport of statins

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2010**, 52 : 93-98

SARR F.S., GUILLAUME Y.C., BERTHELOT A., ANDRÉ C.

Magnesium effect on the interaction of Statin Molecules with an Immobilized Phosphatidylcholine Monolayer.

Résumé publié dans Magnesium Research: Organisme officiel de la Société internationale pour le Développement des Recherches sur le Magnésium (SDRM), Ed. John Libbey, Décembre 2007, Volume 20 numéro 4, pp 277

❖ **Publication internationale soumise à comité de lecture**

SARR F.S., GUILLAUME Y.C., THOMASSIN M., ANDRÉ C.

Biochromatographic framework for analysing calcium chloride salt effect on statin passive diffusion to an Immobilized Artificial Membrane (IAM).

Submitted to *Anal Chim Acta*

❖ **Congrès national et international**

SARR F.S., GUILLAUME Y.C., BERTHELOT A., ANDRÉ C.

Magnesium effect on the interaction of Statin Molecules with an Immobilized Phosphatidylcholine Monolayer.

VI symposium de Magnesium Research, 26-27 Décembre 2007, Iasi, Romania

SARR F.S., GUILLAUME Y.C., RICHERT L., ANDRÉ C.

Mécanisme de liaison d'une série de statines avec une membrane artificielle immobilisée (MAI).

Forum des Jeunes Chercheurs, 14-15 Juin 2007 Dijon

SARR F.S., GUILLAUME Y.C., RICHERT L., ANDRÉ C.

Effet du magnésium sur la diffusion passive d'une série de statines sur une Membrane Artificielle Immobilisée (MAI).

Forum des Jeunes Chercheurs, 12-13 Juin 2008 Besançon, France

SARR F.S., GUILLAUME Y.C., RICHERT L., ANDRÉ C.

Etude de la diffusion d'une série de statines à travers la membrane cellulaire par une approche biochromatographique.

IFR133, 5 Novembre 2009 Besançon, France

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Différence entre la structure chimique des statines de type I et II. Page 22
- Figure 2 :** Structures chimiques des statines (STCOOH), de leur pharmacophore et de l'HMG-CoA. Page 24
- Figure 3 :** Mécanisme d'action des statines sur la voie de synthèse du cholestérol et des isoprénoïdes (d'après LUDMAN et al. 2009. Page 26
- Figure 4 :** Interactions entre la simvastatine (statine de type I) et les résidus acides aminés de l'HMGR (d'après ISTVAN 2003). Page 27
- Figure 5 :** Structure d'un phospholipide membranaire (d'après CAMPBELL et al. 2004). Page 31
- Figure 6 :** Représentation de la membrane plasmique avec sa mosaïque fluide (d'après <http://med.tn.tudelft.nl/~hadley/nanoscience/week4/4.html>). Page 33
- Figure 7 :** Vue antérieure du foie et structure des hépatocytes avec ses différents domaines (Keller 2004). Page 35
- Figure 8 :** Représentation des différents modes de transports des substances à travers la membrane plasmique. Page 36
- Figure 9 :** Représentation schématique de la diffusion simple. Page 38
- Figure 10 :** Modélisation de la membrane biologique. Page 39
- Figure 11 :** Représentation d'un liposome. Page 40
- Figure 12 :** Etude du transport passif d'un xénobiotique à travers un fluorosome. Page 41
- Figure 13 :** Représentation schématique du transport actif. Page 44
- Figure 14 :** Représentation schématique de la répartition des transporteurs hépatiques chez l'Homme et chez le rongeur (d'après LE VEE 2006). Page 46
- Figure 15 :** Structure de l'Oatp1 avec ses 12 domaines transmembranaires (TMs). Page 49
- Figure 16 :** Représentation schématique du mécanisme de type rocker-switch. Page 50
- Figure 17 :** Représentation schématique d'une Chromatographie Liquide Haute Performance. Page 55
- Figure 18 :** La modélisation de la membrane plasmique en MAI (d'après YANG et al.1996). Page 57
- Figure 19 :** Les différentes phases stationnaires MAIs. Page 59

- Figure 20 :** Représentation d'une image idéale (A) et d'une micrographie réelle de la CMC (B) (d'après HE et al. 2007). Page 60
- Figure 21 :** La surface caractéristique d'une CMC_{ECV304}
Spectres d'énergie de la CMC_{ECV304} (a) et de la silice pure (b); Micrographes à balayage électronique de la CMC_{ECV304} (c) ($\times 5000$) et de la silice pure (d) ($\times 5000$) (d'après LI et HE 2007). Page 61
- Figure 22 :** Représentation d'un chromatogramme. Page 62
- Figure 23 :** Libération de ν molécules d'eau lors du processus de liaison du ligand sur la phase stationnaire (d'après ANDRÉ 2005). Page 67
- Figure 24 :** Immobilisation de l'Oatp2 sur des particules de silice propylamine par le DSC. Page 78
- Figure 25 :** Détection des protéines membranaires par le réactif de Pierce. Page 84
- Figure 26 :** Chromatogramme obtenu pour la fluvastatine à 25°C (phase mobile : méthanol/tampon phosphate, 30/70 v/v et pH=7,0). Page 88
- Figure 27 :** Variation des valeurs de $\log k'$ de la pravastatine à 25°C en fonction du pourcentage de méthanol Φ dans le milieu d'étude. Page 89
- Figure 28 :** Comparaison entre les valeurs de $\log k'_{w-MAI}$ à 37°C et la CI 50 des statines. Page 91
- Figure 29 :** Courbe du $\log k'$ de la simvastatine en fonction du pH à 25°C. Page 92
- Figure 30 :** Variation du n_H^+ des statines en fonction du pH à la température de 25°C. Page 95
- Figure 31 :** Courbe de van't Hoff de la fluvastatine pour différentes valeurs de pH. Page 96
- Figure 32 :** Variation de l'enthalpie de l'association fluvastatine-MAI en fonction du pH. Page 98
- Figure 33 :** Variation de l'entropie de l'association fluvastatine-MAI en fonction du pH. Page 98
- Figure 34 :** Compensation enthalpie-entropie des statines à tous les pH du milieu d'étude. Page 100
- Figure 35 :** Variation des $\ln k'$ des statines à 35°C en fonction de PMg^{2+} ($-\log c$) dans le milieu d'étude. Page 102
- Figure 36 :** Variation de l'enthalpie de la mévastatine et de la fluvastatine en fonction du logarithme de la concentration en magnésium (PMg^{2+}). Page 104
- Figure 37 :** Variation de l'entropie de la mévastatine et de la fluvastatine en fonction du logarithme de la concentration en magnésium (PMg^{2+}). Page 104

- Figure 38 :** Variation des $n_{Mg^{2+}}$ de la fluvastatine et de la simvastatine en fonction de la température (T) de la colonne. Page 107
- Figure 39 :** Compensation enthalpie-entropie pour toutes les statines et pour toutes les concentrations de magnésium. Page 108
- Figure 40 :** Variation de la diffusion passive (représentée par k') des statines en fonction de la concentration en calcium ($[Ca^{2+}]$) dans le milieu d'étude à $pH = 7,0$. Page 110
- Figure 41 :** Comparaison des valeurs de la diffusion passive (k') de la pravastatine à $35^{\circ}C$ en fonction des concentrations de Mg^{2+} et de Ca^{2+} (c) dans le milieu d'étude à $pH = 7,0$. Page 112
- Figure 42 :** Compensation enthalpie-entropie des statines pour toutes les concentrations de Mg^{2+} et de Ca^{2+} dans le milieu d'étude. Page 112
- Figure 43 :** Chromatogrammes obtenus pour la pravastatine (a) et la mévastatine (b) à $10^{\circ}C$ (phase mobile : tampon phosphate 0,05 mM, 0 mM Mg^{2+} , $pH=7,4$ et débit : 0,3 ml/min). Page 115
- Figure 44 :** Variation des valeurs de $\ln k'$ des xénobiotiques en fonction des concentrations de magnésium (c) dans le milieu d'étude. Page 115
- Figure 45 :** Variation des valeurs de l'enthalpie des xénobiotiques en fonction des concentrations en magnésium (c) dans le milieu d'étude. Page 117
- Figure 46 :** Variation des $n_{Mg^{2+}}$ de l'atorvastatine, de la rifamycine et de la pravastatine en fonction de la température (T) de la colonne. Page 118
- Figure 47 :** Compensation enthalpie-entropie pour tous les xénobiotiques et pour toutes les concentrations de magnésium. Page 119
- Figure 48 :** Expression de l'ARNm de l'Oatp2 par PCR après 72 h de traitement des cultures d'hépatocytes avec des composés inducteurs de référence (DEX, PCN et BEZA). Page 122
- Figure 49 :** Chromatogrammes de la fluvastatine obtenus avec les différentes colonnes CMC à $37^{\circ}C$ (phase mobile : tampon phosphate 0,05 mM, $pH=7,4$ et débit : 0,3 ml/min). Page 124
- Figure 50 :** Comparaison des valeurs de la rétention des xénobiotiques sur les quatre CMC. Page 125
- Figure 51 :** Effet de la concentration en rifamycine (c) sur la diffusion facilitée des statines sur la CMC_{DEX} à $37^{\circ}C$. Page 126
- Figure 52 :** Corrélation entre les valeurs de la diffusion facilitée (représentée par k') des xénobiotiques sur la colonne Oatp2 et la CMC_{DEX}. Page 127

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les données pharmacologiques et la comparaison de l'efficacité des statines
Page 28

Tableau 2 : Diffusion passive (représentée par k') des statines à $\text{pH} = 7,0$ et à $T = 25^\circ\text{C}$.
Page 87

Tableau 3 : Valeurs des logs P et $k'_{w\text{-MAI}}$ des statines
* Données obtenues sur PubChem <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pccompound>
Page 89

Tableau 4 : Valeurs des pKa des molécules de statine. Page 93

Tableau 5 : Valeurs du pH du milieu d'étude où $n_{\text{H}^+} = 0$ à la température de 25°C . Page 95

Tableau 6 : Valeurs des paramètres thermodynamiques des statines à chaque pH . Page 97

Tableau 7 : Valeurs du nombre de magnésium ($n_{\text{Mg}^{2+}}$) exclu lors de l'association statine-MAI à différentes températures de la colonne. Page 106

Tableau 8 : Valeurs des k' et des paramètres thermodynamiques de la liaison statine-MAI à différentes concentrations de Ca^{2+} dans le milieu d'étude. Page 109

Tableau 9 : Valeurs des k' et des paramètres thermodynamiques de la liaison statine-MAI à différentes concentrations de Mg^{2+} dans le milieu d'étude. Page 111

Tableau 10 : Expression des ARNm CYP3A1, CYP4A1 et Oatp2 par PCR quantitative après 48 h de traitement des cultures d'hépatocytes avec des composés inducteurs de référence (DEX, PCN et BEZA). Page 121

Tableau 11 : Valeurs de la rétention des xénobiotiques sur les quatre CMC. Page 124