

# **Méthodes *in vitro* et *in vivo* d'évaluation de l'activité des CYPs**

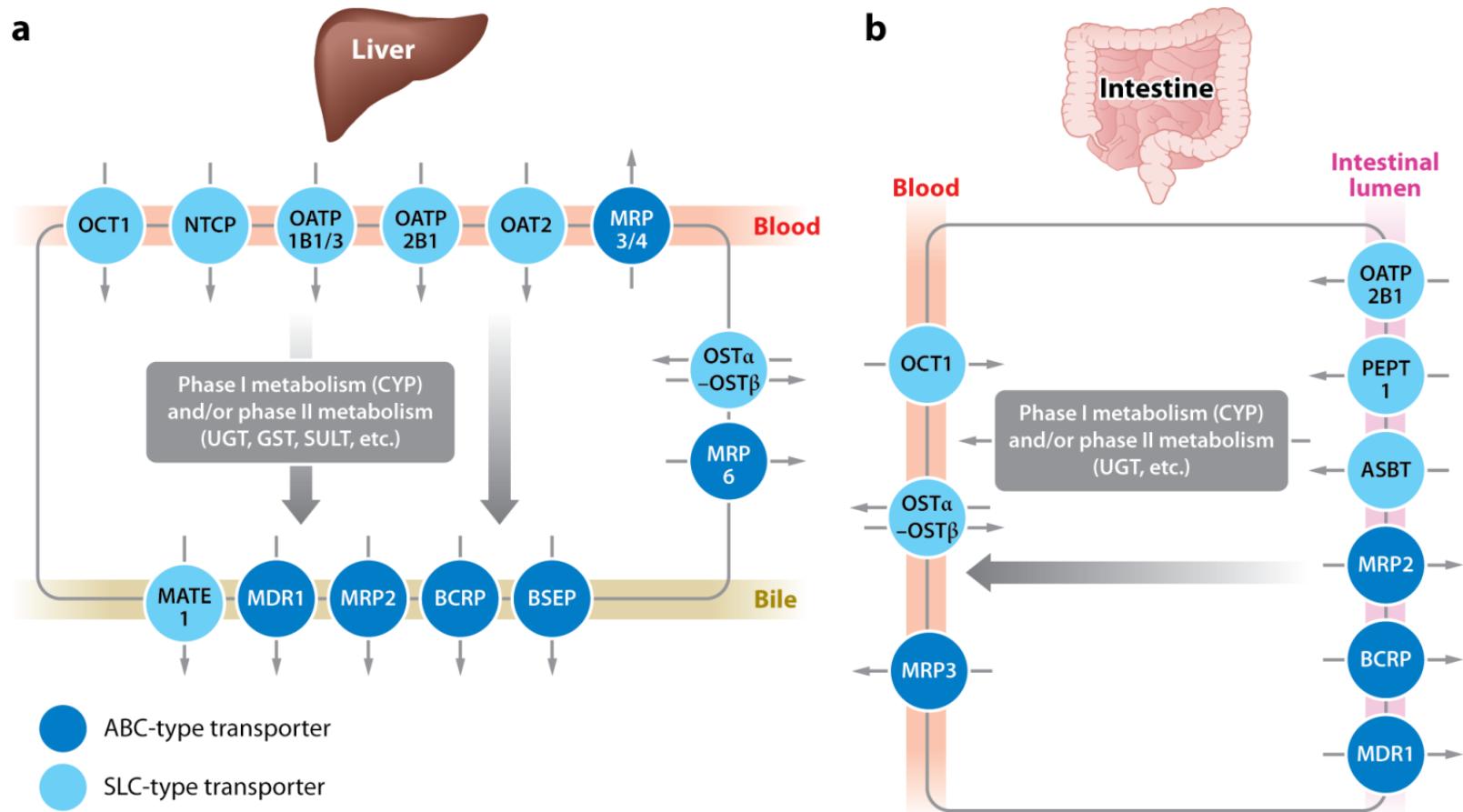
Virginie Acrenaz, PhD  
Service de Pharmacologie et Toxicologie Cliniques, HUG

Colloque Vaud-Genève  
Jeudi 6 juin 2013

# Plan

- ▶ **Introduction**
- ▶ **Méthodes *in vitro***
  - Cellules
  - Microsomes
  - Supersomes
- ▶ **Méthodes *in vivo***
  - Génotypage / Phénotypage
  - Micrococktail de phénotypage
- ▶ **Conclusion / Perspectives**

# Introduction

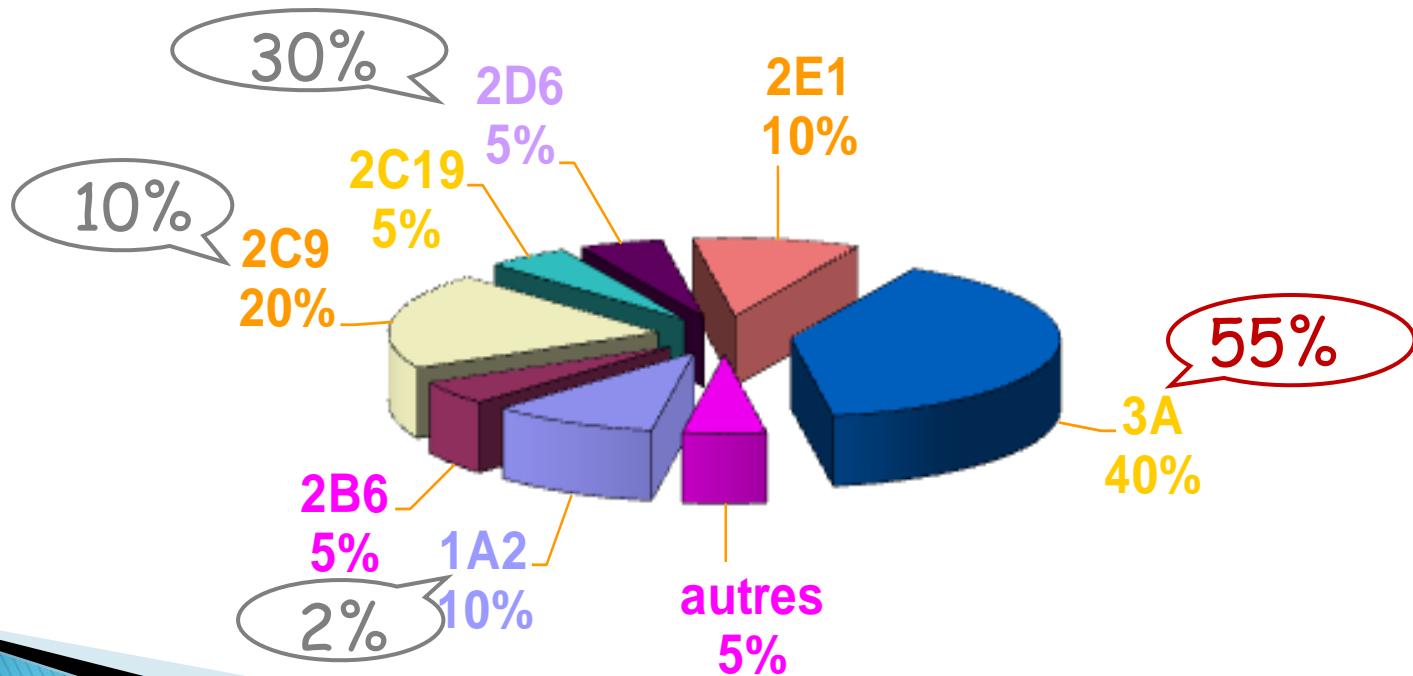


Yoshida K, et al. 2013.  
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 53:581–612

# Introduction

## ► Les cytochromes P450:

- Hémoprotéines, 18 familles et 44 sous-familles
- Particulièrement présentes et diversifiées dans le foie
- Rôle dans détoxicification et synthèse
- Importance dans le métabolisme de phase I, les interactions médicamenteuses et la variabilité interindividuelle de réponse à certains traitements



# Introduction

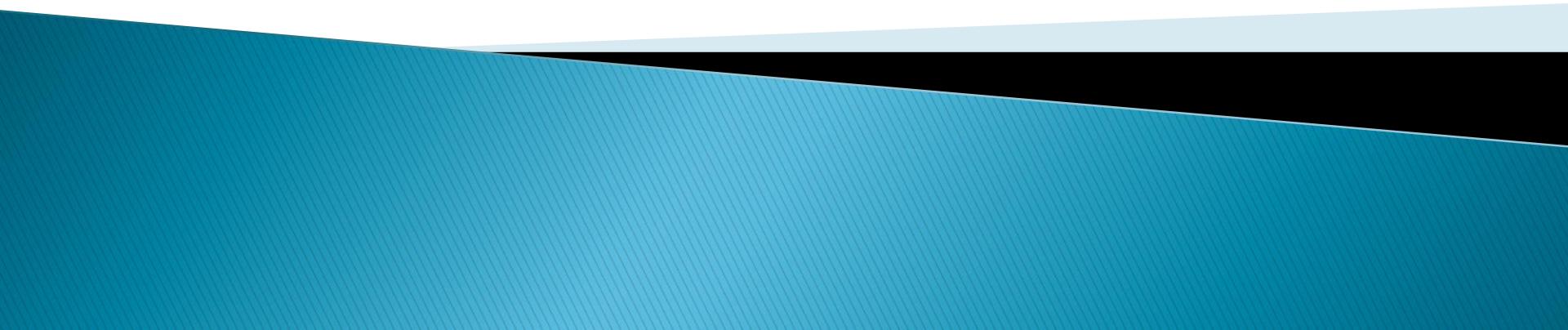
## ▶ Inhibition des CYP:

- Inhibition du métabolisme = augmentation du produit actif  
➡ Effets indésirables / toxicité  
(ex: amiodarone et acenocoumarol / CYP2C9)
- Inhibition d'une bioactivation en métabolite actif  
➡ Diminution de l'effet car diminution du métabolite  
(ex: ritonavir et prasugrel / CYP3A4)

## ▶ Induction des CYP:

- Induction du métabolisme = diminution du produit actif  
➡ Inefficacité  
(ex: ethinylestradiol et millepertuis / CYP3A4)
- Induction de la bioactivation en métabolite actif / toxique  
➡ Augmentation des EI / toxicité

# Méthodes *in vitro*



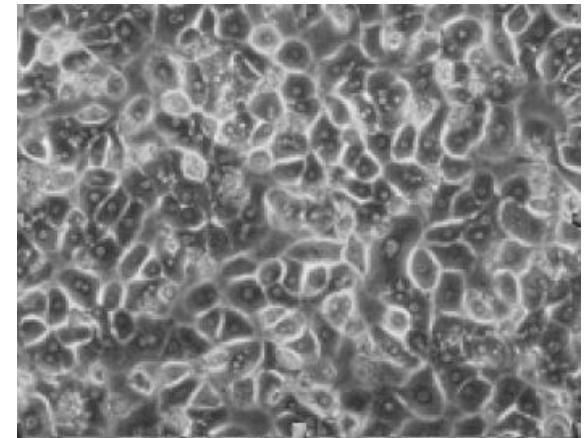
# Les méthodes de l'étude de l'activité des CYP *in vitro*

Technique	Avantages	Inconvénients
Coupes de foie	- bonne représentation de la situation <i>in vivo</i> - enzymes de phase I et phase II	- Diminution rapide des niveaux de CYP - disponibilité de tissus humains
Hepatocytes	- modèle proche de la situation <i>in vivo</i> - maintenus quelques jours en culture	- préparation à partir du tissus hépatique frais - disponibilité de tissus humains
Lignées cellulaires	- Culture cellulaire simple - Durée de vie non-limitée - Etudes d'induction possibles	- Onéreux - Temps de préparation relativement long
Microsomes du foie humain	- Faciles à préparer - simple utilisation - stockés à -80 °C pendant plusieurs années	- Faible activité des enzymes de phase II - Incubations courtes - pas pour les études d'induction
Cellules recombinantes	- Identification et confirmation de l'implication des isozymes individuels	

# Les hépatocytes primaires et lignées cellulaires

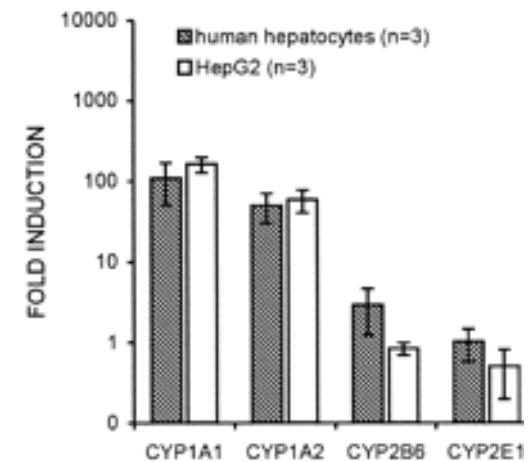
## ▶ Hépatocytes primaires

- Gold standard
- Durée de vie limitée à quelques jours
- Variabilité interindividuelle importante
- Disponibilité de foies humains frais limitée
- Complexité de la procédure d'isolation des hépatocytes



## ▶ HepG2

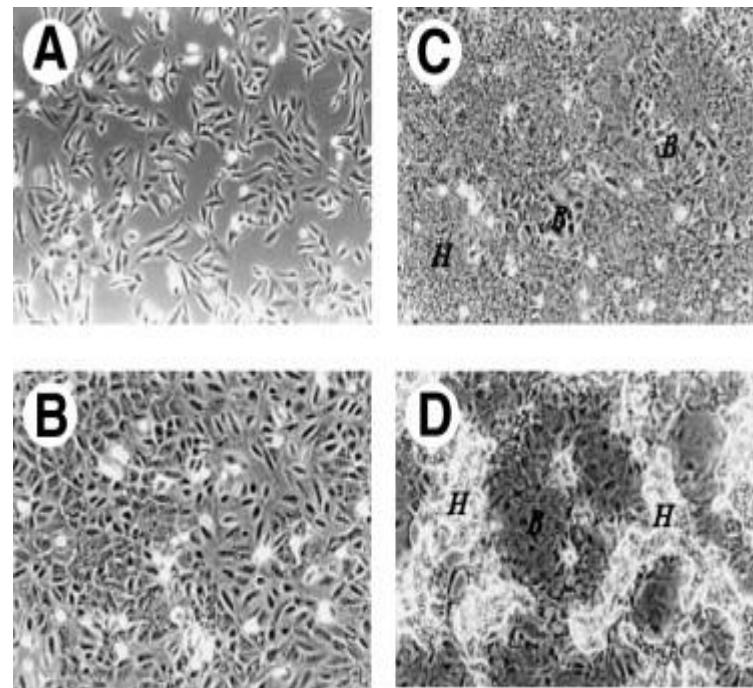
- Issues d'un carcinome hépatocellulaire
- Largement utilisées
- Alternative aux cultures d'hépatocytes primaires
- Activités métaboliques faibles (faible expression des CYP et des transporteurs) (*Wilkening DMD 2003*)



# Les lignées cellulaires hépatiques

## ► Cellules HepaRG

- Lignée cellulaire dérivée d'une tumeur hépatique
- Lignée de cellules bipotentes pouvant se différencier en cellules biliaires ou hépatiques
- Bonne alternative à l'utilisation des hépatocytes primaires
- Contrairement à HepG2 ou d'autres lignées cellulaires, les cellules hepRG ont des activités cytochromiques élevées et expriment la plupart des récepteurs nucléaires et des transporteurs



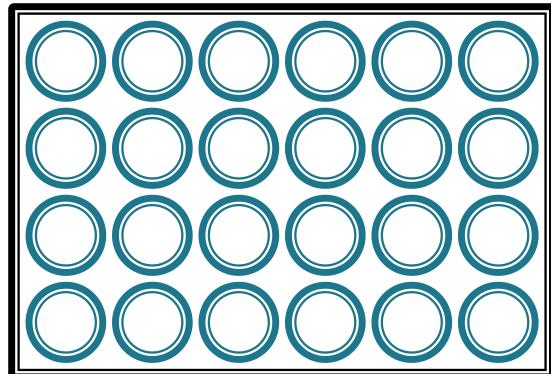
# Les lignées cellulaires hépatiques

Enzyme	Substrate	Marker Metabolite	Specific Activity		
			Donor	(pmol/min*million cells)	Std Dev
CYP1A2	Phenacetin	Acetaminophen	HepaRG PHH (N=52)	2.78 0.072-40.3	0.73
CYP2A6	Coumarin	7-Hydroxycoumarin	HepaRG PHH (N=9)	0.85 0.12-9.87	0.16
CYP2B6	Bupropion	Hydroxybupropion	HepaRG PHH (N=52)	17.9 0.21-13.1	2.21
CYP2C8	Paclitaxel	6α-Hydroxypaclitaxel	HepaRG PHH (N=7)	0.22 0.064-0.24	0.04
CYP2C9	Diclofenac	4'-Hydroxydiclofenac	HepaRG* PHH (N=3)	3.94 8.44-31.2	0.38
CYP2C19	Mephenytoin	4'-Hydroxymephenytoin	HepaRG PHH (N=13)	1.52 0.10-23.5	0.41
CYP2D6	Dextromethorphan	Dextrorphan	HepaRG** PHH (N=2)	0.40 3.93-14.0	0.06
CYP3A4	Testosterone	6β-Hydroxytestosterone	HepaRG PHH (N=52)	248 1.47-178	50.9
CYP3A4	Midazolam	1-Hydroxymidazolam	HepaRG PHH (N=0)	28.4 NA	2.39
FMO	Benzydamine	Benzydamine N-oxide	HepaRG PHH (N=0)	17.3 NA	1.74
UGT	7-Hydroxycoumarin	7-Hydroxycoumarin Glucuronide	HepaRG PHH (N=0)	346 NA	49.7
SULT	7-Hydroxycoumarin	7-Hydroxycoumarin Sulfate	HepaRG PHH (N=0)	9.23 NA	2.92

# Les lignées cellulaires hépatiques – exemple hepaRG

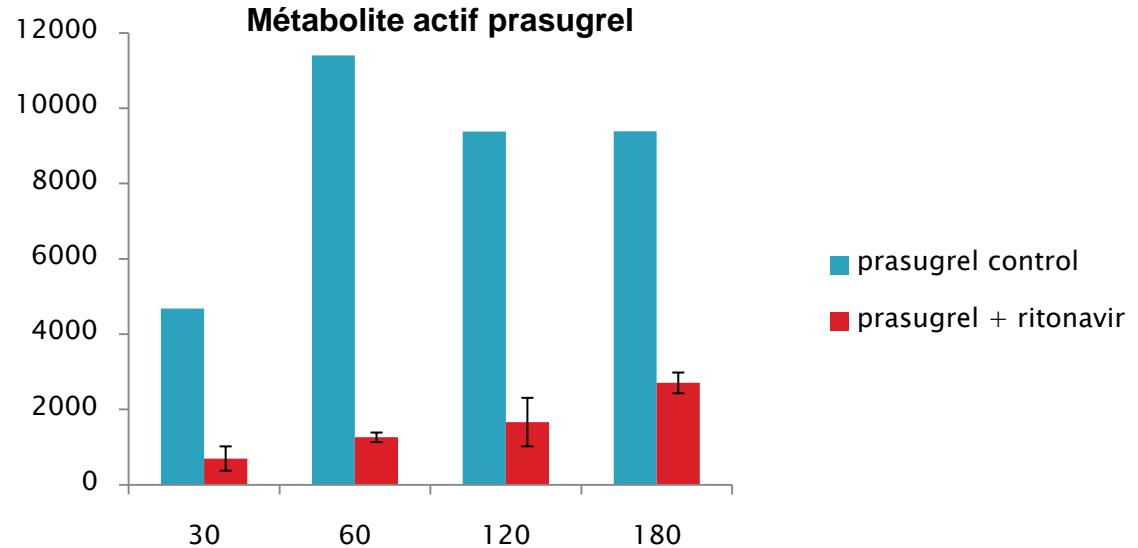
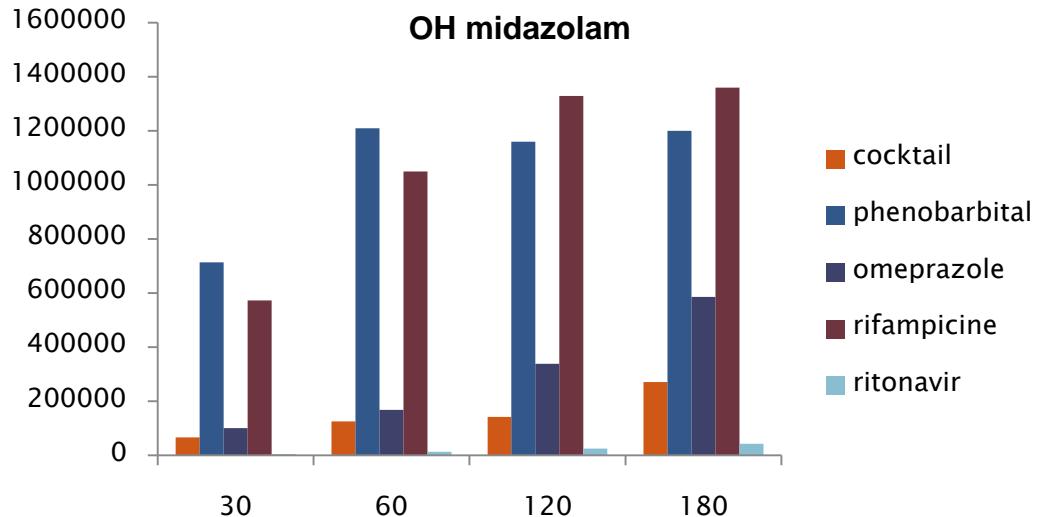
Dans les microsomes, une inhibition du CYP3A4 par le ritonavir a été démontrée

➡ Utilisation d'une lignée de cellules hépatiques différencierées très semblables à des hépatocytes humains qui expriment les différents cytochromes d'intérêt (HepaRG®) pour voir si le ritonavir produit une induction des cytochromes:



- Les cellules sont mises en culture
- Les inducteurs sont ensuite ajoutés pendant 3 jours
- Les substrats spécifiques des CYPs sont mis dans le milieu
- Le milieu est prélevé à intervalles de temps réguliers pendant 3 heures pour mesurer la production des métabolites

# Les lignées cellulaires hépatiques – exemple hepaRG

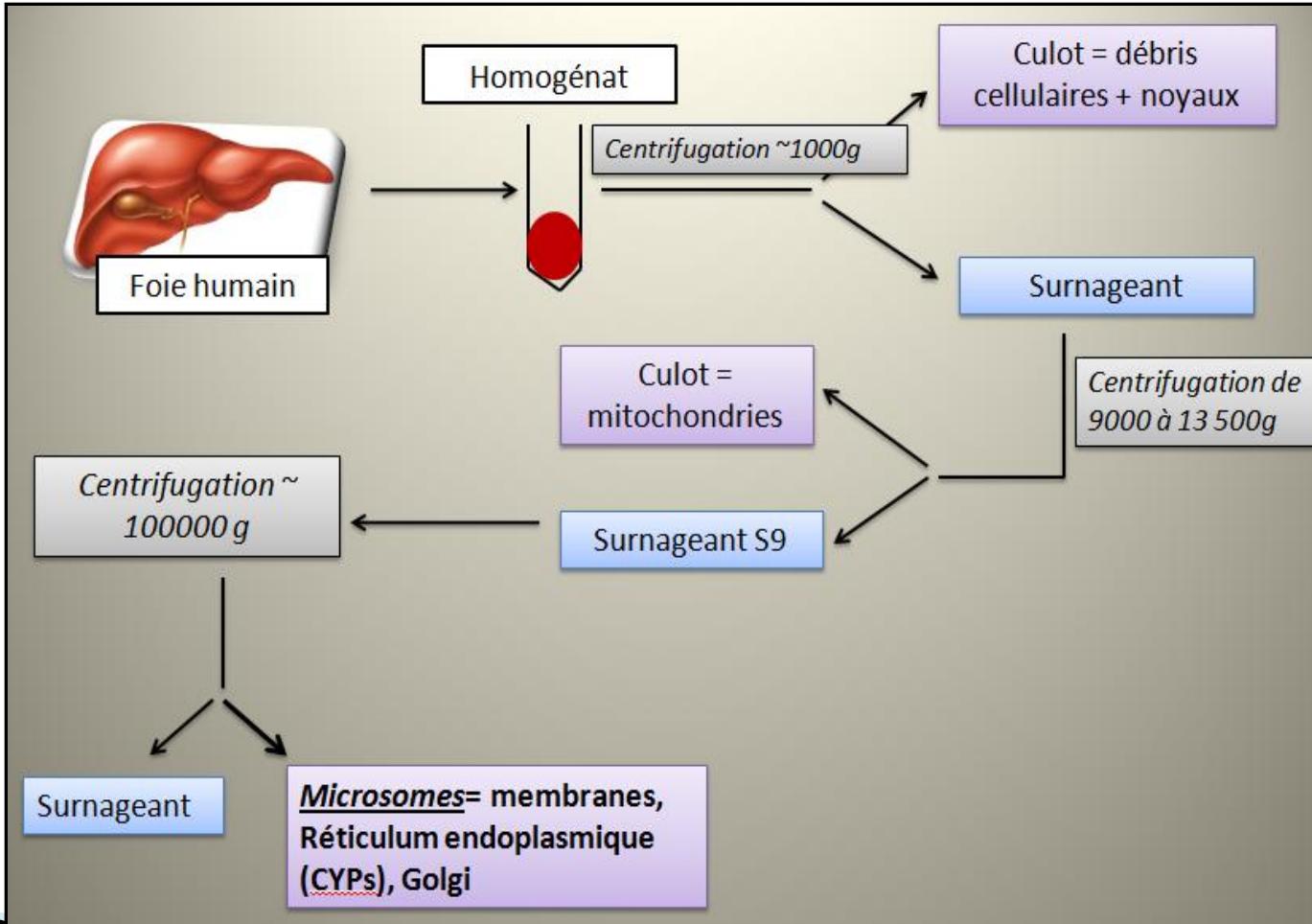


Inhibition du CYP3A4/ du métabolisme du prasugrel par le ritonavir

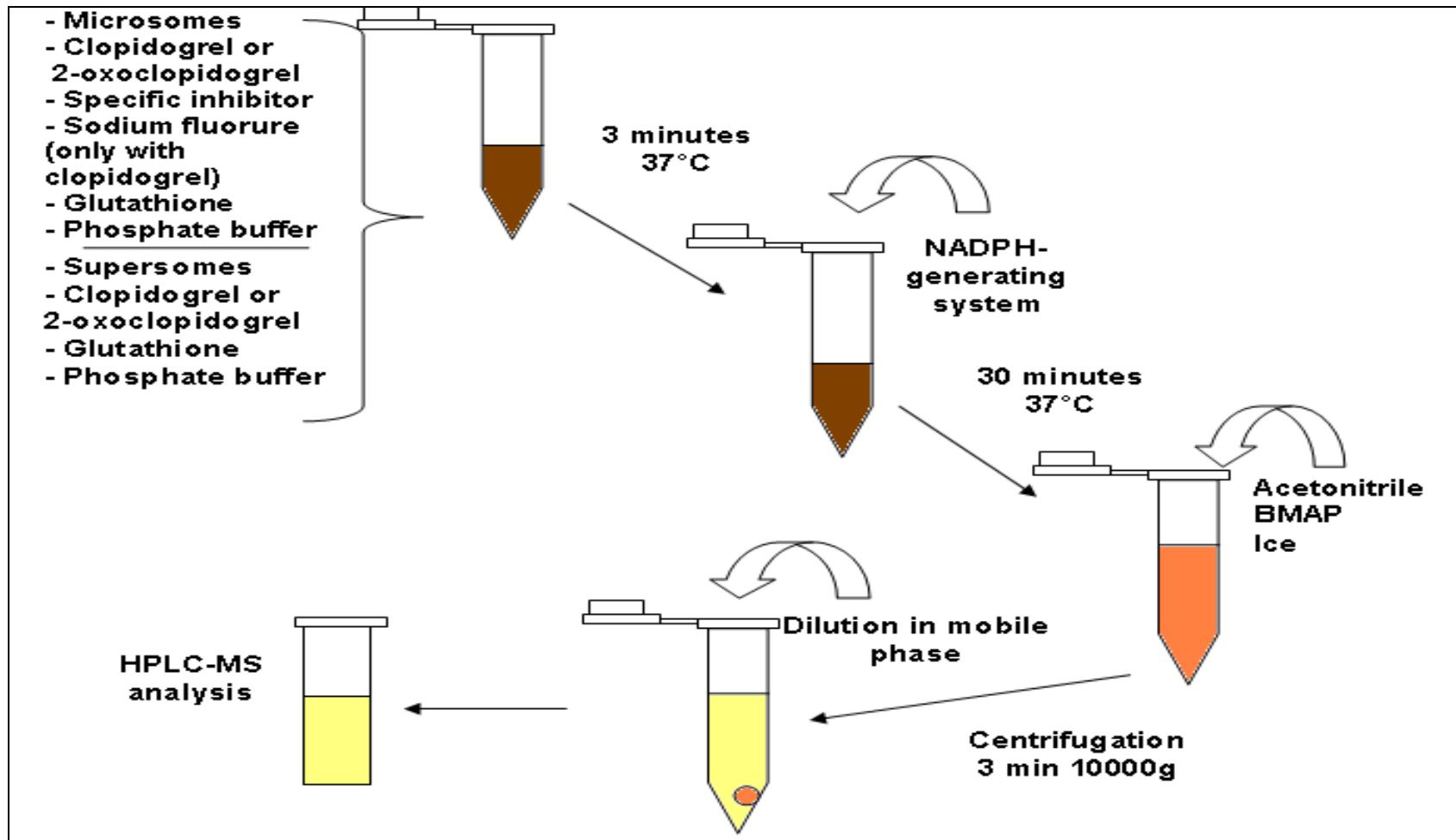
# Les microsomes de foie humain

- ▶ Les microsomes hépatiques sont des vésicules du réticulum endoplasmique qui sont préparés par ultracentrifugations successives, contenant ainsi les CYPs et les UGT.
- ▶ Modèle le plus utilisé pour l'étude des cytochromes impliqués dans le métabolisme des médicaments
- ▶ Simples d'utilisation et relativement peu chers
- ▶ Les microsomes représentent le modèle *in vitro* recommandé par la FDA pour les études de métabolisme et d'interaction

# Les microsomes de foie humain



# Les microsomes de foie humain - exemple

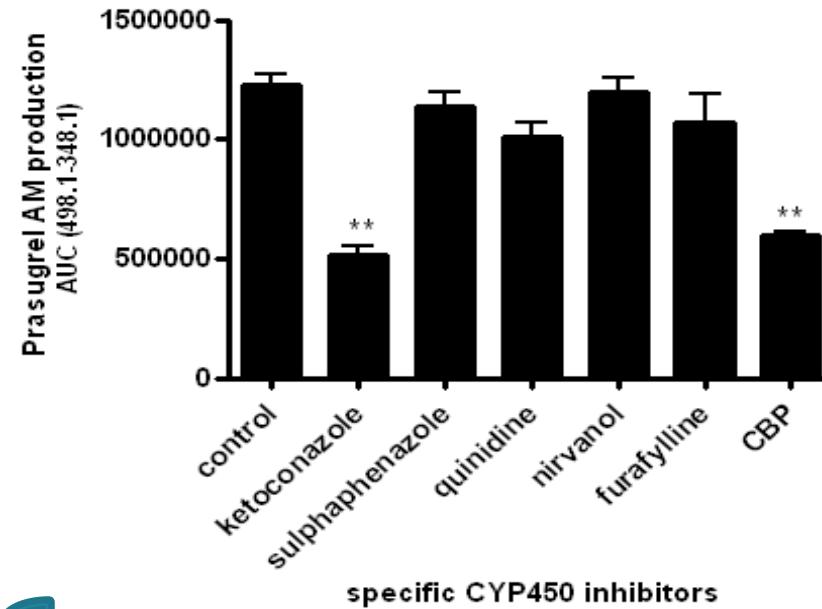


# Les microsomes de foie humain

## ► Applications

- Détermination des CYP impliqués
- Détermination des paramètres pharmacocinétiques
- Etude des IM

## ► Exemple: métabolisme du prasugrel



Implication principale des CYP3A et CYP2B6 dans le  
métabolisme du prasugrel

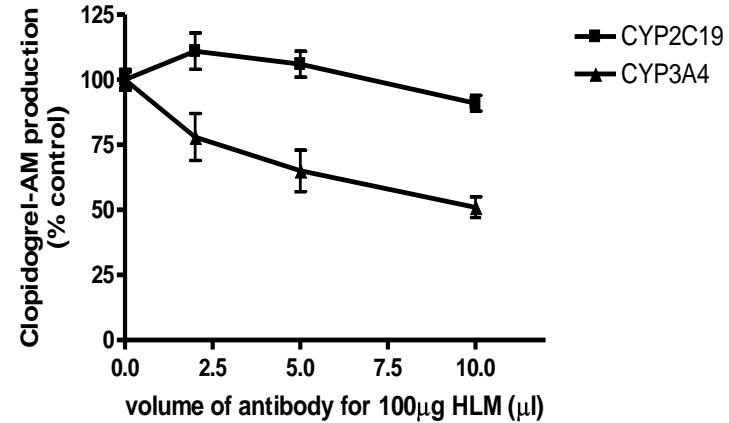
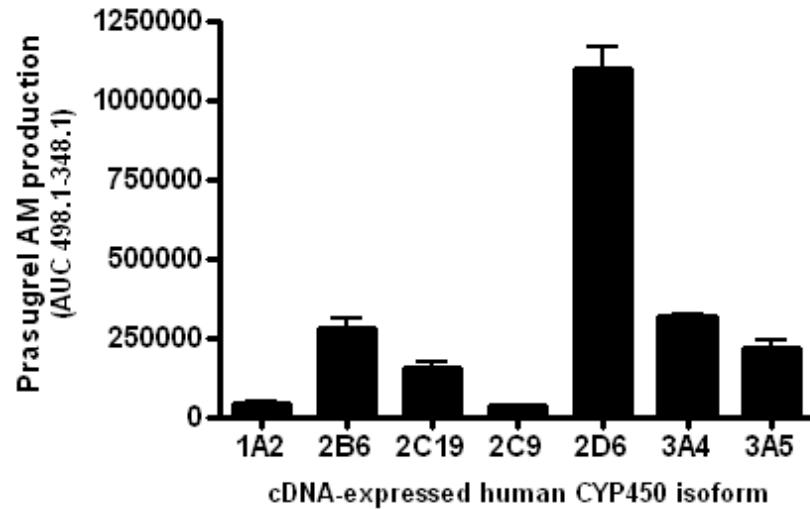
# Les cytochromes recombinants et les anticorps

## ▶ Les cytochromes recombinants:

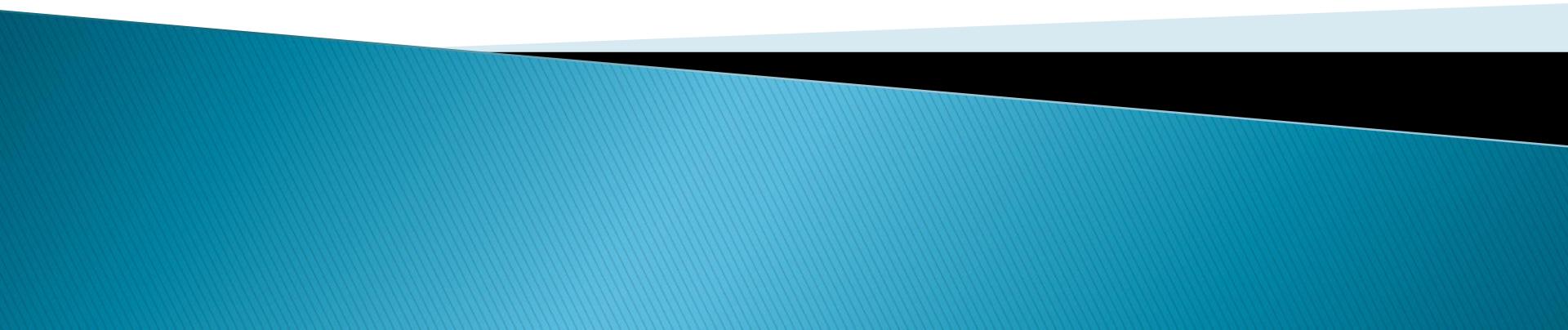
- Complètent et confirment les informations obtenues avec les microsomes
- Renseignent sur l'implication relative des CYP

## ▶ Les anticorps:

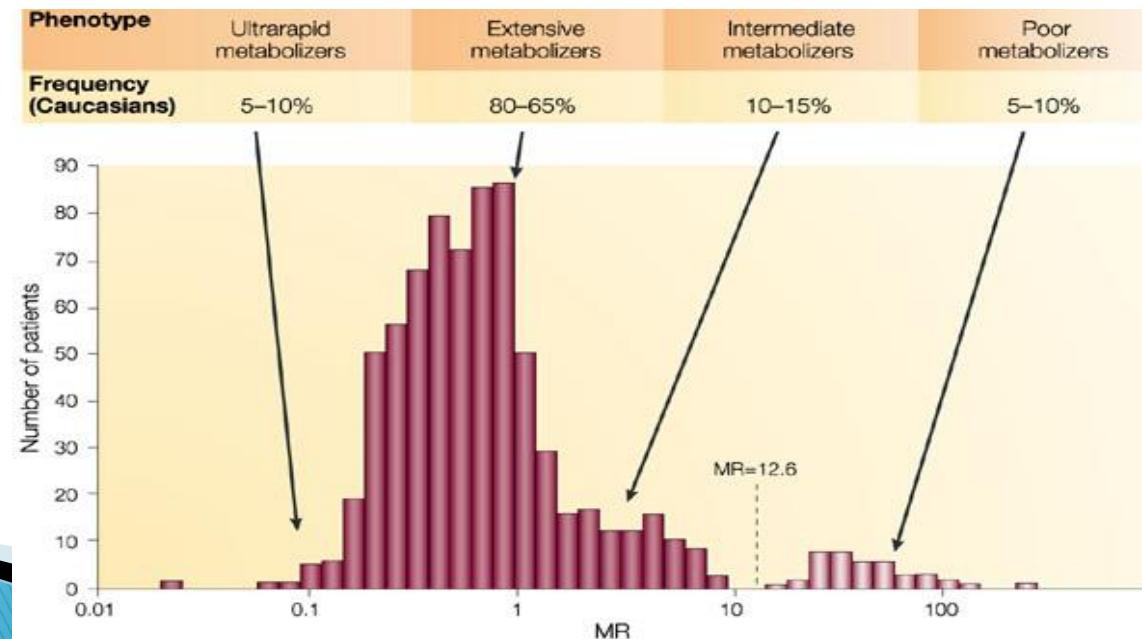
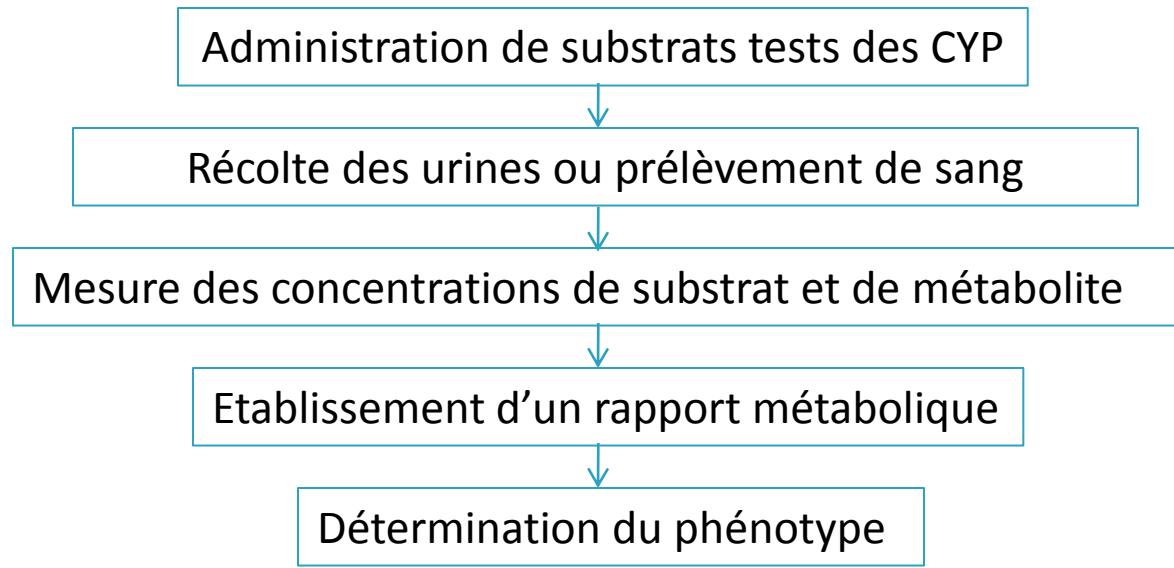
- Surtout utiles pour les cytochromes dont les inhibiteurs sont moins spécifiques



# Méthodes *in vivo*



# Principe du phénotypage



# Avantages et limitations du phénotypage

## ► Avantages:

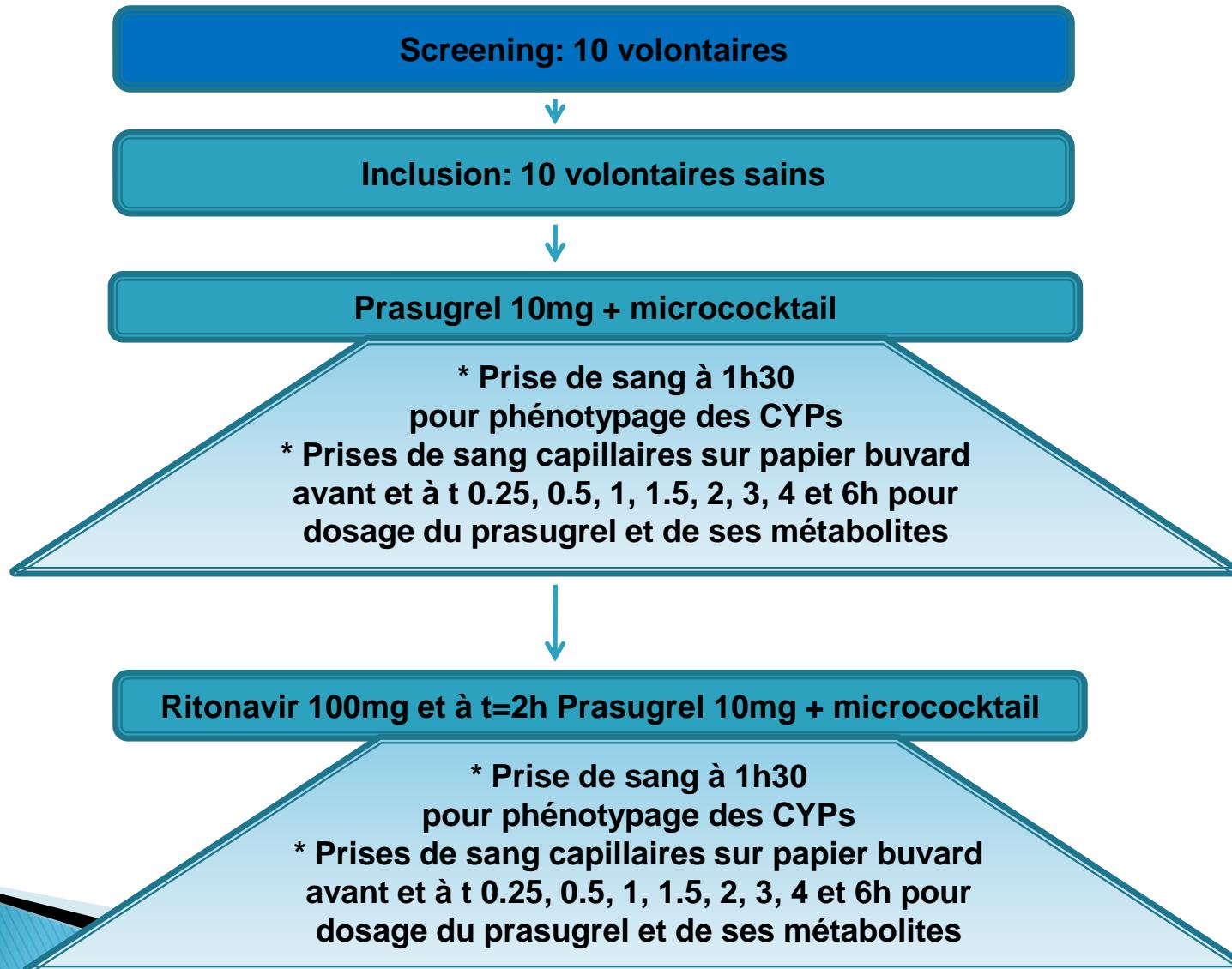
- Mesure de l'activité des CYP à un moment donné
- Individualisation thérapeutique

## ► Limitations:

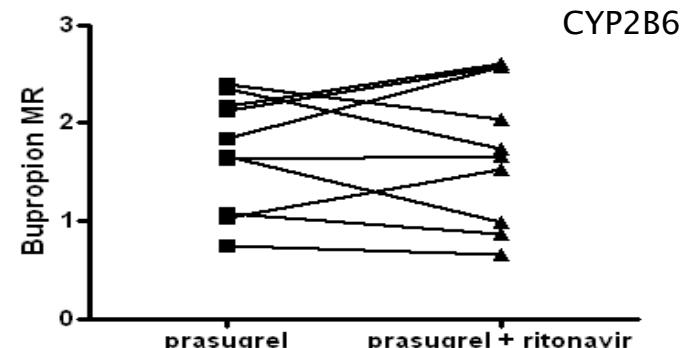
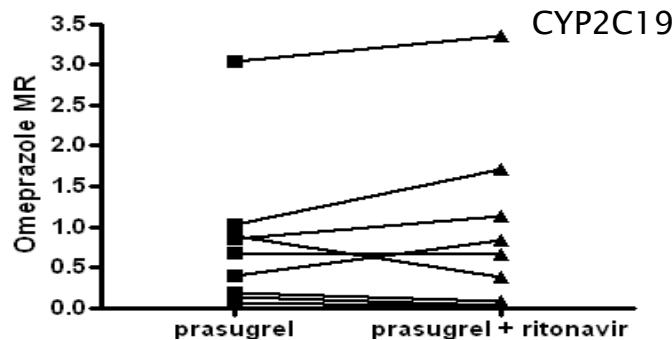
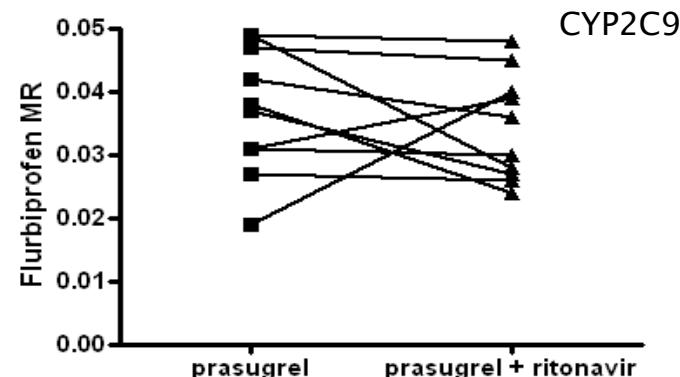
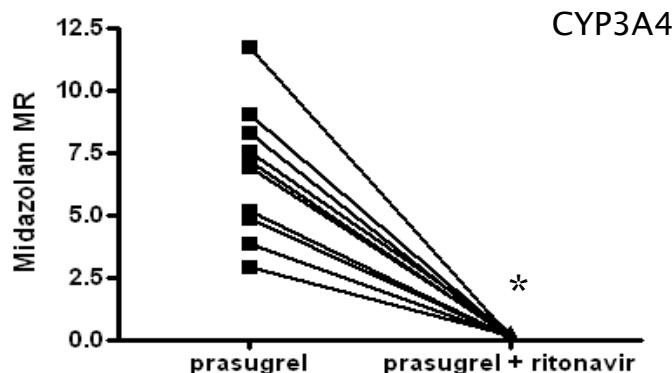
- Difficulté d'interprétation lors de co-administration avec d'autres médicaments
- Personnes avec insuffisance rénale ou hépatique
- Manque d'études définissant des valeurs seuils

# Phénotypage – Exemples d'utilisation

Etude clinique: interaction entre le prasugrel et le ritonavir chez le volontaire sain



# Phénotypage – Exemples d'utilisation



**Midazolam MR  $\downarrow 97.8\text{ 1.4\%}$  (Mean ratio: 0.02, CI95: 0.01; 0.03,  $p < 0.001$ )**

Omeprazole MR (Mean ratio: 0.92, CI95: 0.49; 1.35,  $p = 0.59$ )

Flurbiprofen MR (Mean ratio: 1, CI95: 0.78; 1.26,  $p = 0.58$ )

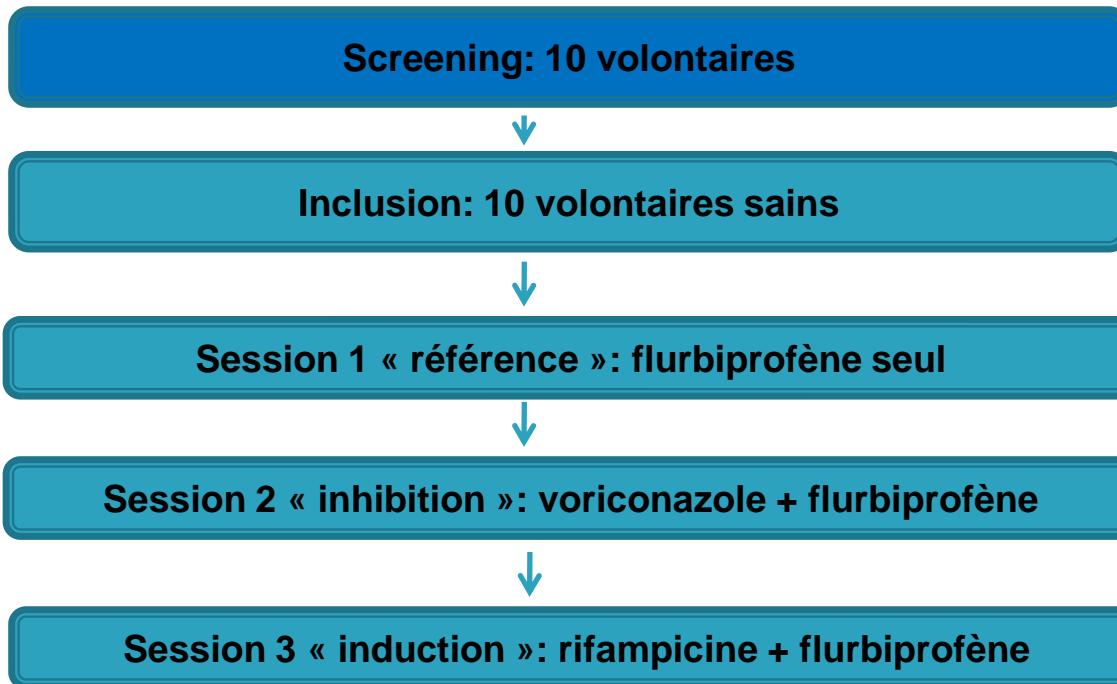
Bupropion MR (Mean ratio: 1.02, CI95: 0.85; 1.19,  $p = 0.88$ )

Pas d'influence  
du ritonavir

➤ Le ritonavir a fortement inhibé le CYP3A4/5

# Phénotypage – Exemples d'utilisation

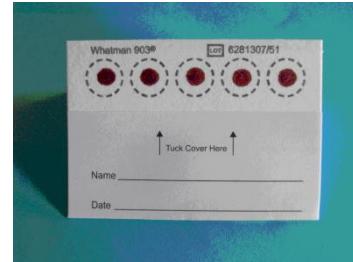
Etude clinique: détermination du rapport métabolique du flurbiprofène par la méthode DBS



• Prises de sang capillaires sur papier buvard  
et prises de sang veineux à t 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 et 8h

• Collecte d'urines sur 8h

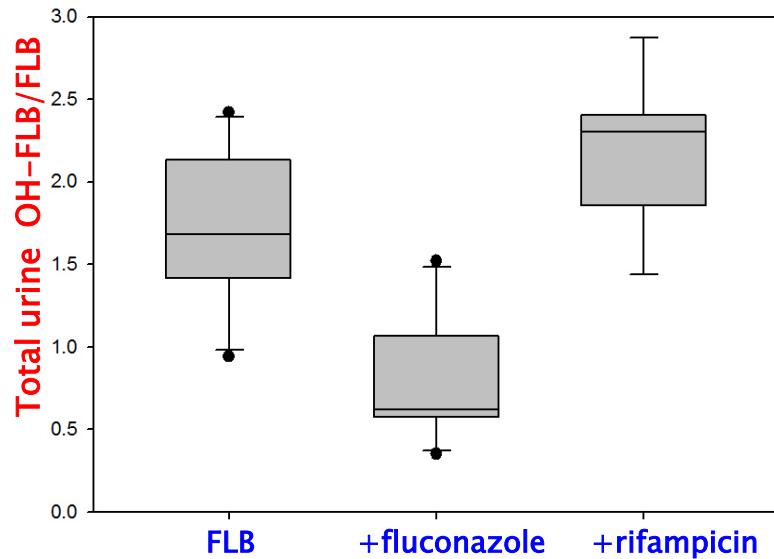
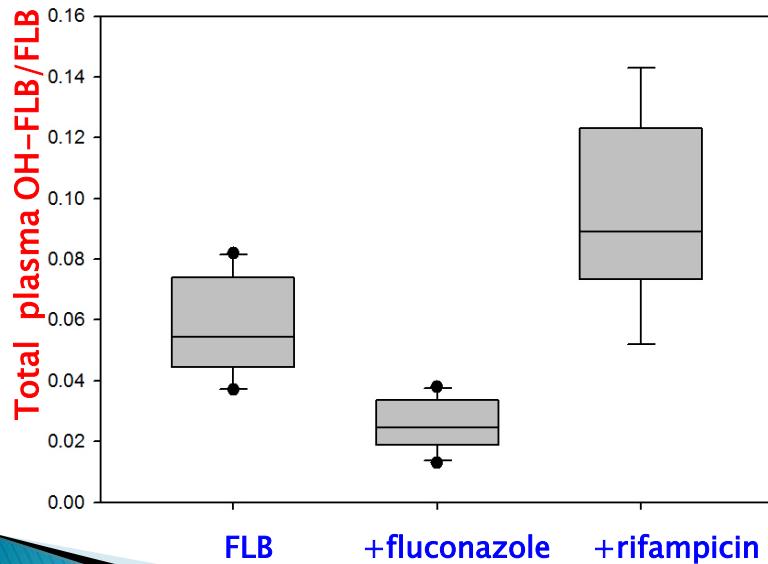
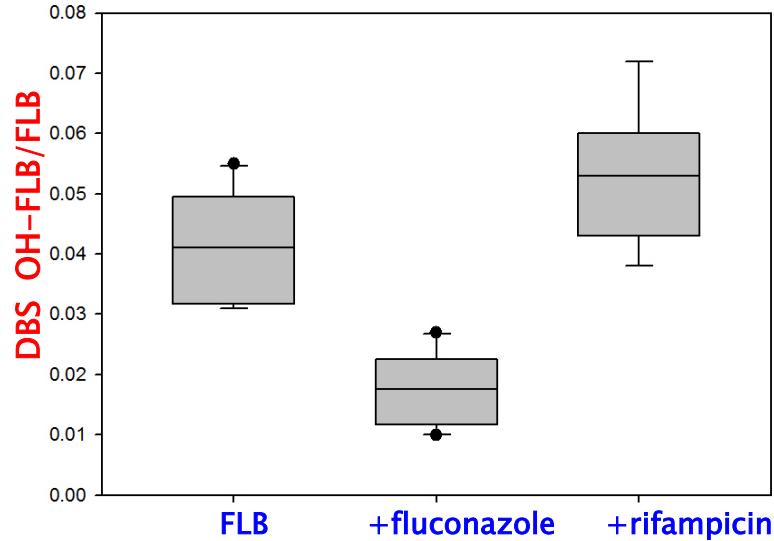
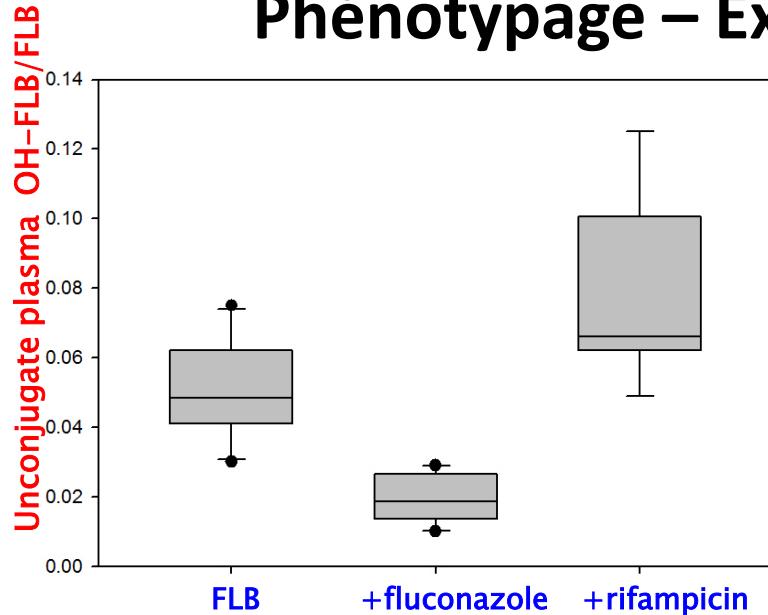
# Phénotypage – Etude en cours



MeOH



# Phénotypage – Exemples d'utilisation



# Phénotypage – Exemples d'utilisation

## Cocktail:

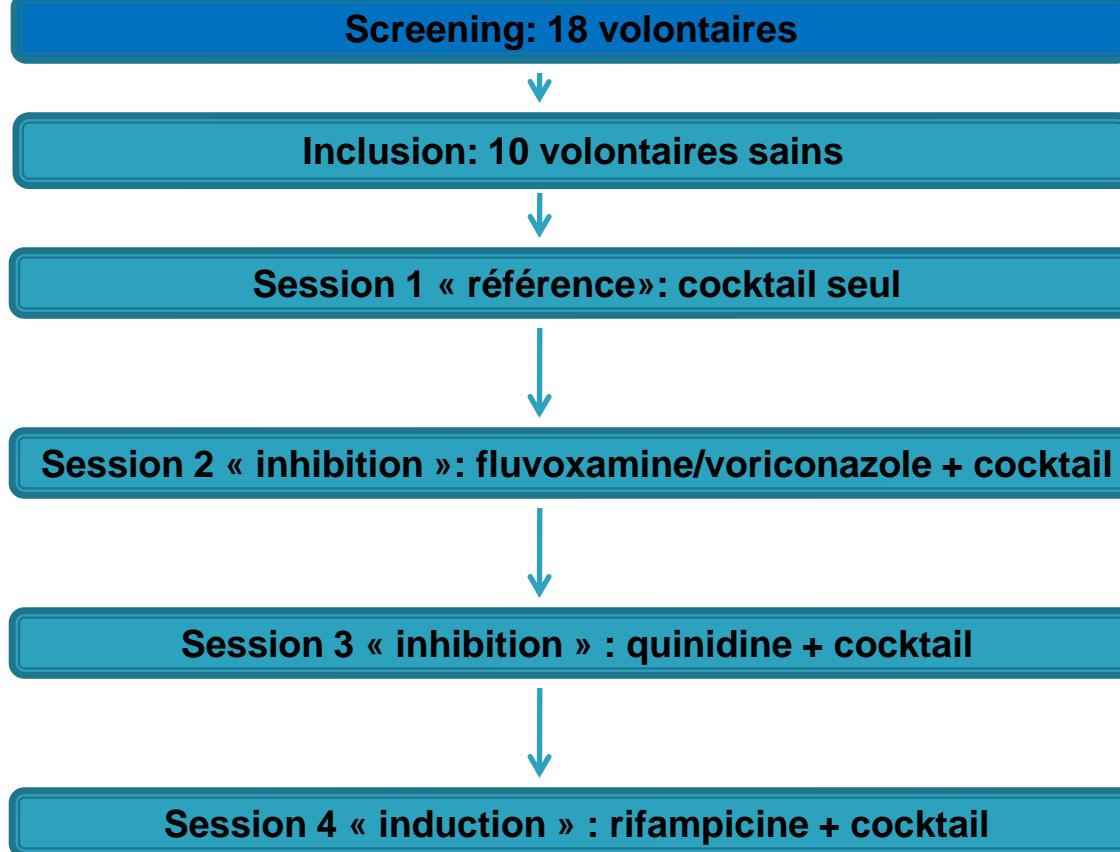
bupropion 25 mg  
flurbiprofène 25 mg  
oméprazole 5 mg  
dextrométhorphan 10mg  
midazolam 1 mg  
fexofènadine 25 mg  
café ou Coca

## Inhibiteurs :

Fluvoxamine:  
1A2/2C9/2C19/P-gp  
Voriconazole:  
2B6/2C9/2C19/3A4  
Quinidine:  
2D6/P-gp

## Inducteur:

Rifampicine



•Prises de sang capillaires sur papier buvard  
et prises de sang veineux à t 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 et 8h

•Collecte d'urines sur 8h

## Phénotypage – Perspectives

- ▶ Validation du cocktail chez différentes populations de patients
- ▶ Recherche de nouveaux substrats plus spécifiques
- ▶ Proposer un phénotypage en micrococktail sur papier buvard en routine
- ▶ Faciliter la mesure de l'activité des CYPs dans les études cliniques (interactions,...)

# Génotypage

- ▶ Consiste à rechercher des mutations, délétions ou duplications par des techniques de biologie moléculaire
- ▶ Permet l'identification du génotype du patient mais ne renseigne pas sur la fonctionnalité des CYPs
- ▶ Données manquantes sur la corrélation entre génotype et phénotype

# Conclusions

- ▶ Les microsomes hépatiques et les hépatocytes primaires restent les gold standard pour les autorités d'enregistrement mais grand intérêt pour les lignées cellulaires
- ▶ La nouvelle lignée cellulaire HepaRG pourrait faciliter la caractérisation des voies métaboliques des nouveaux médicaments
- ▶ L'approche du micrococktail pour le phénotypage permet d'éviter les effets indésirables dues aux substances-test à hautes doses
- ▶ La simplification du phénotypage et sa validation en routine permettraient une individualisation des traitements et faciliteraient la compréhension des IM in vitro/in vivo et les atteintes d'organes

**Merci pour votre attention**