


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

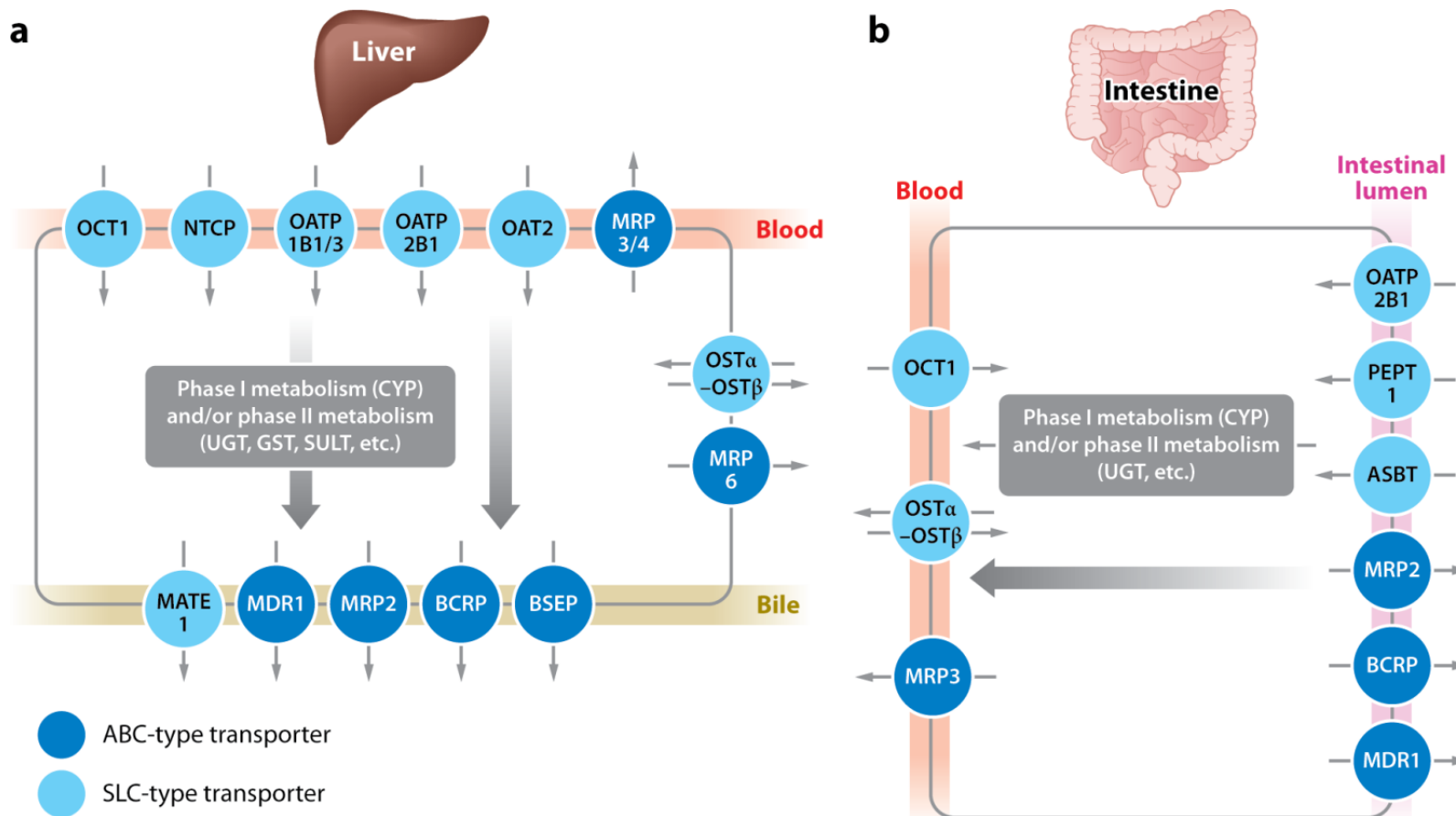
Virginie Ancrenaz, PhD
Service de Pharmacologie et Toxicologie Cliniques, HUG

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**
- 

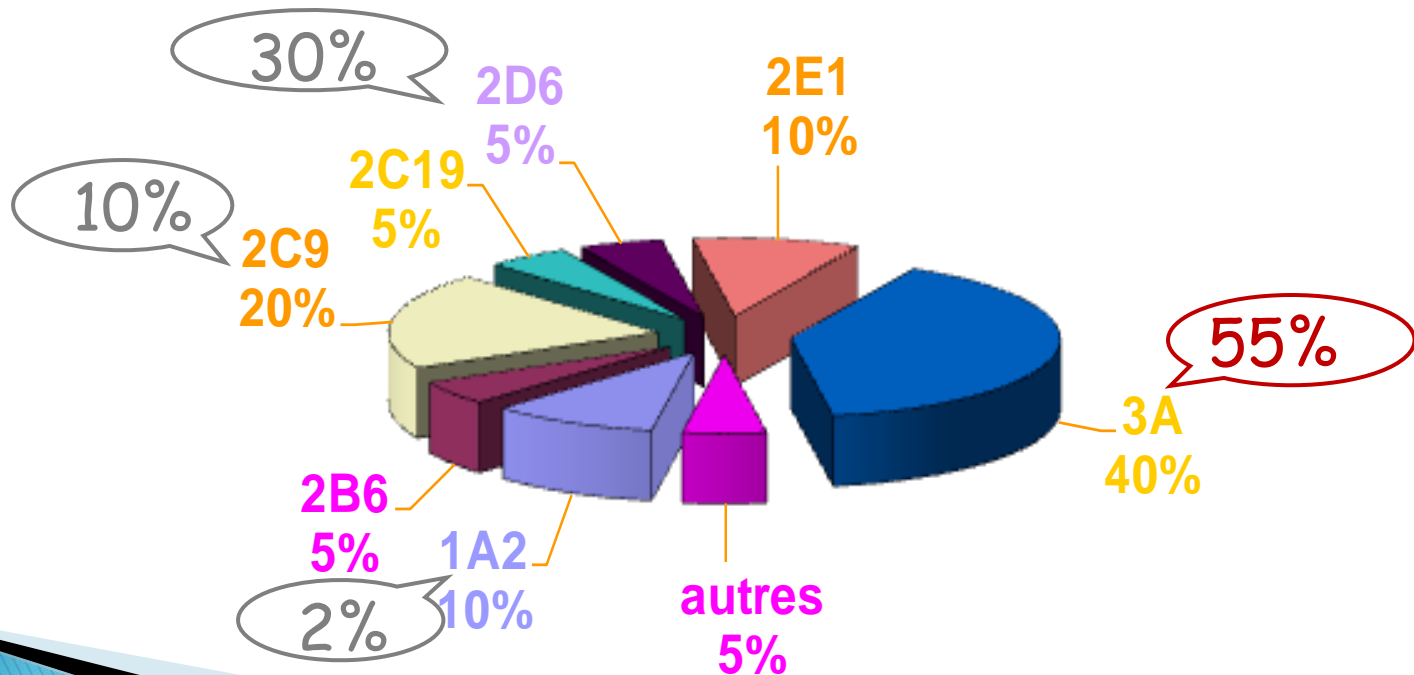
Introduction



Introduction



► Les cytochromes P450:

- Hémoprotéines, 18 familles et 44 sous-familles
- Particulièrement présentes et diversifiées dans le foie
- Rôle dans détoxification 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*

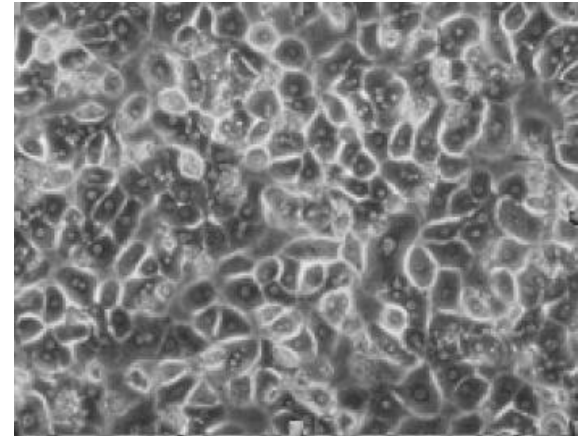
Les méthodes de l'étude de l'activité des CYP *in vitro*

Technique	Avantages	Inconvénients
Coupes de foie	<ul style="list-style-type: none">- bonne représentation de la situation in vivo- enzymes de phase I et phase II	<ul style="list-style-type: none">- Diminution rapide des niveaux de CYP- disponibilité de tissus humains
Hepatocytes	<ul style="list-style-type: none">- modèle proche de la situation in vivo- maintenus quelques jours en culture	<ul style="list-style-type: none">- préparation à partir du tissu hépatique frais- disponibilité de tissus humains
Lignées cellulaires	<ul style="list-style-type: none">- Culture cellulaire simple- Durée de vie non-limitée- Etudes d'induction possibles	<ul style="list-style-type: none">- Onéreux- Temps de préparation relativement long
Microsomes du foie humain	<ul style="list-style-type: none">- Faciles à préparer- simple utilisation- stockés à -80 C pendant plusieurs années	<ul style="list-style-type: none">- Faible activité des enzymes de phase II- Incubations courtes- pas pour les études d'induction
Cellules recombinantes	<ul style="list-style-type: none">- Identification et confirmation de l'implication des isozymes individuels	

Les hépatocytes primaires et lignées cellulaires

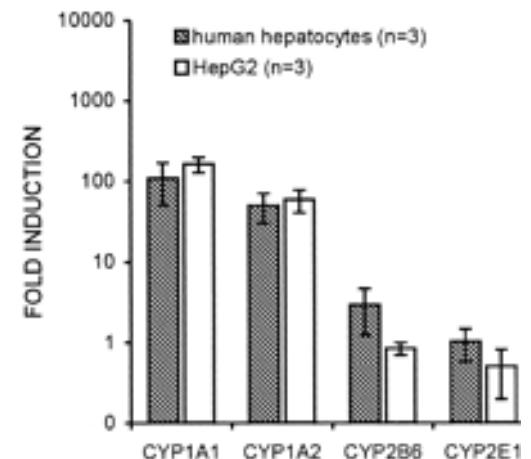
▶ Hépatocytes primaires

- 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

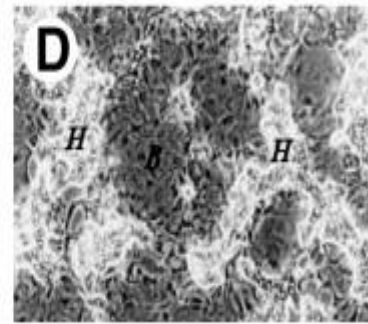
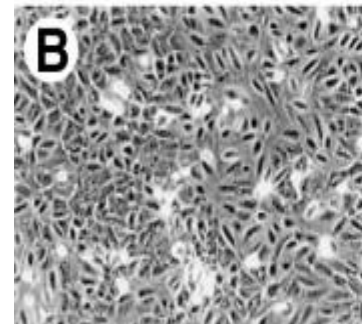
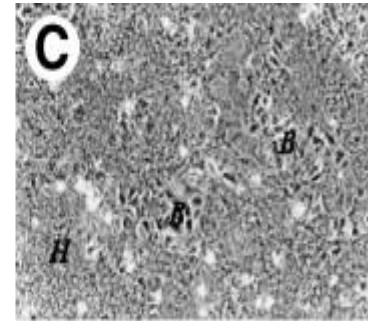
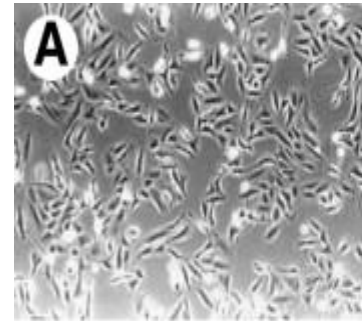
- Issues d'un carcinome hépatocellulaire
- Largement utilisées
- Alternative aux cultures d'hépatocytes primaires
- Activités métaboliques faibles (faible expression des CYP et des transporteurs) (*Wilkening DMD 2003*)



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 hepaRG ont des activités cytochromiques élevées et expriment la plupart des récepteurs nucléaires et des transporteurs



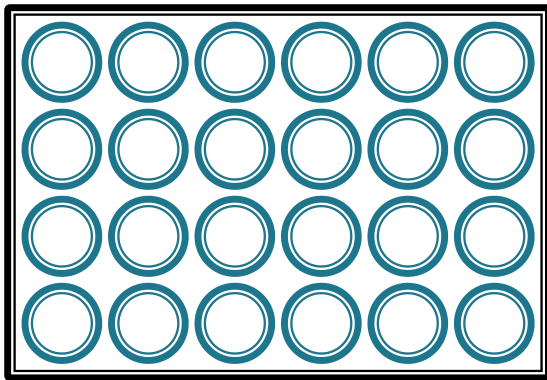
Les lignées cellulaires hépatiques

Enzyme	Substrate	Marker Metabolite	Donor	Specific Activity (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	6 α -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	6 β -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

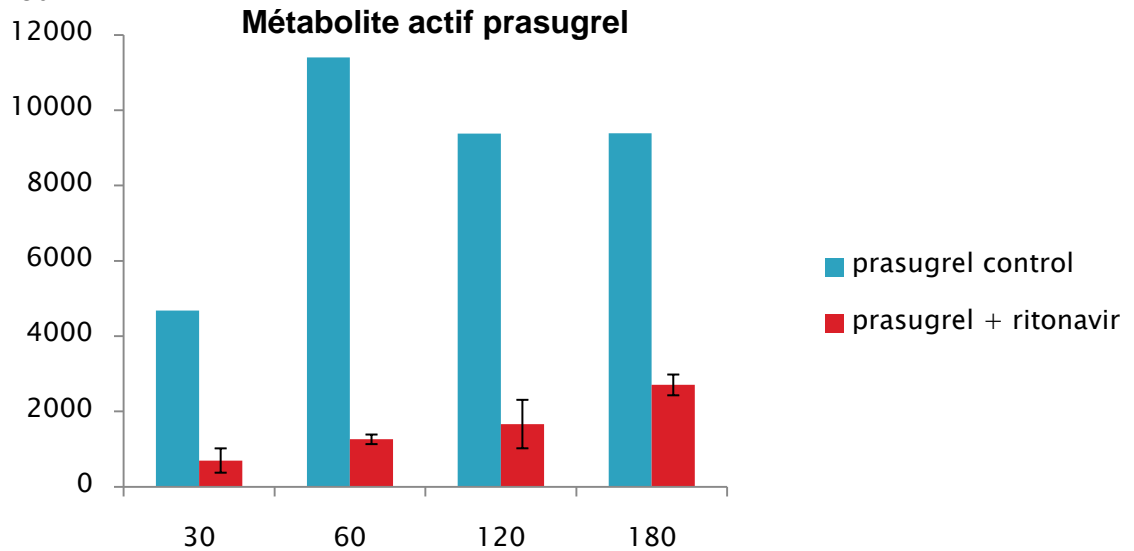
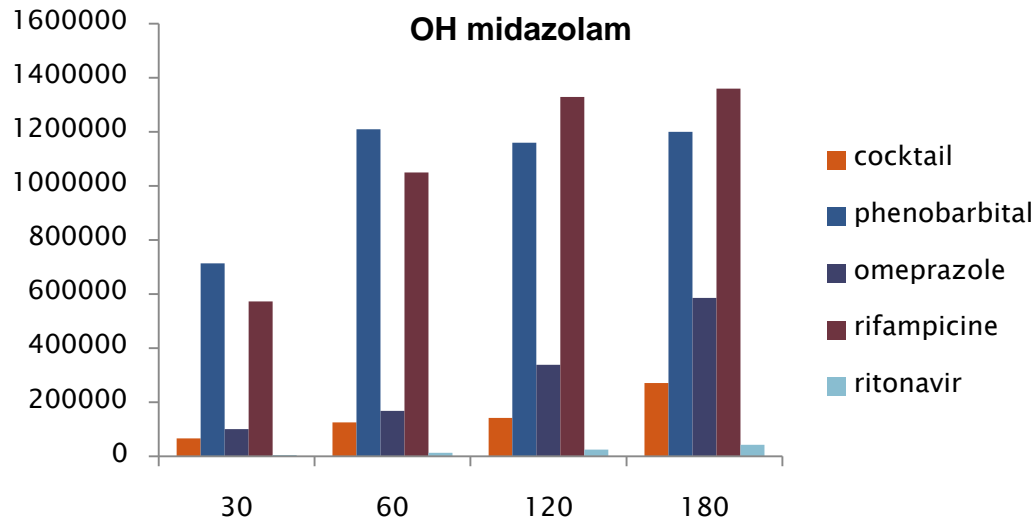
Dans les microsomes, une inhibition du CYP3A4 par le ritonavir a été démontrée

Utilisation d'une lignée de cellules hépatiques différenciées 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

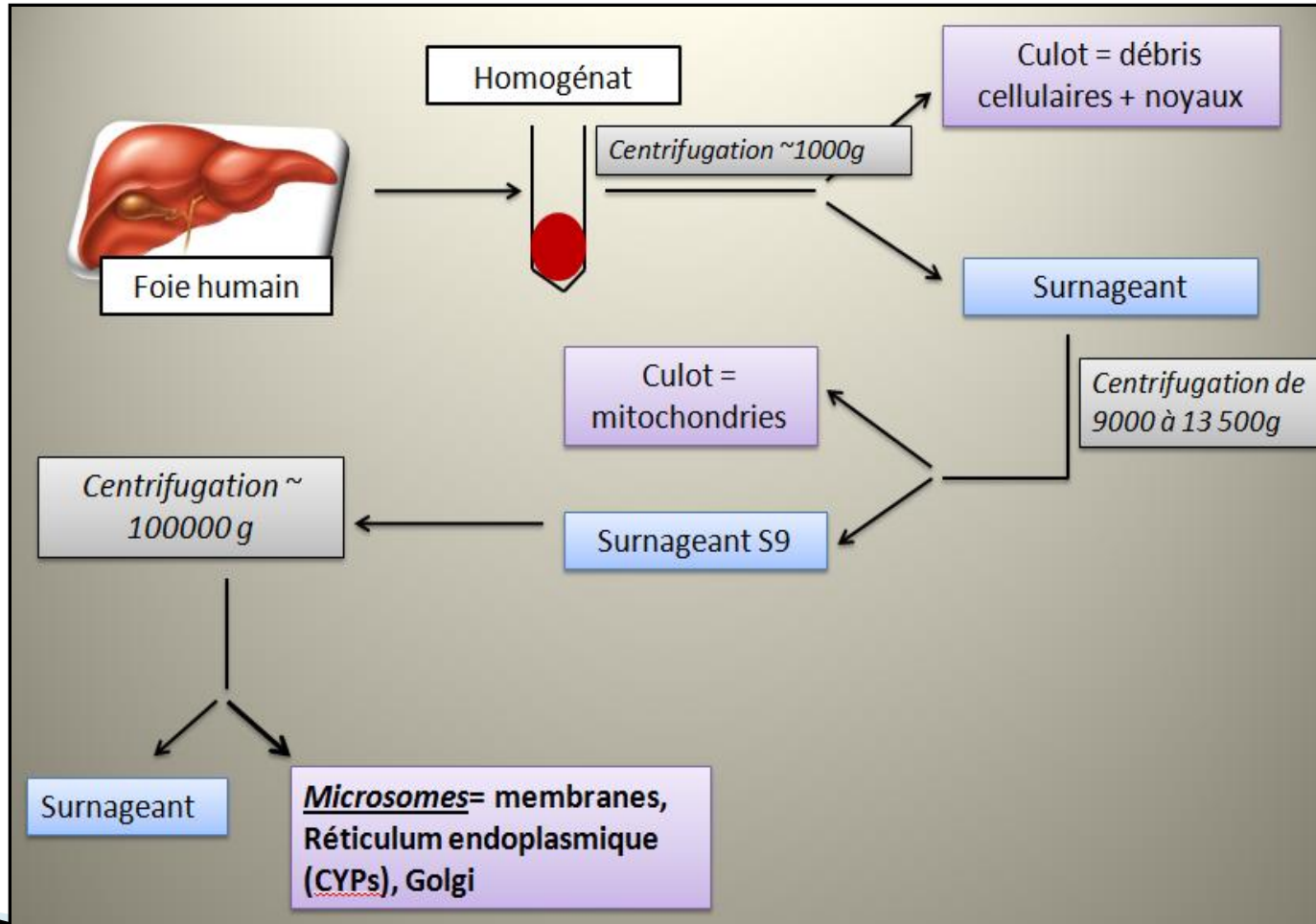


Inhibition du CYP3A4/ du métabolisme du prasugrel par le ritonavir

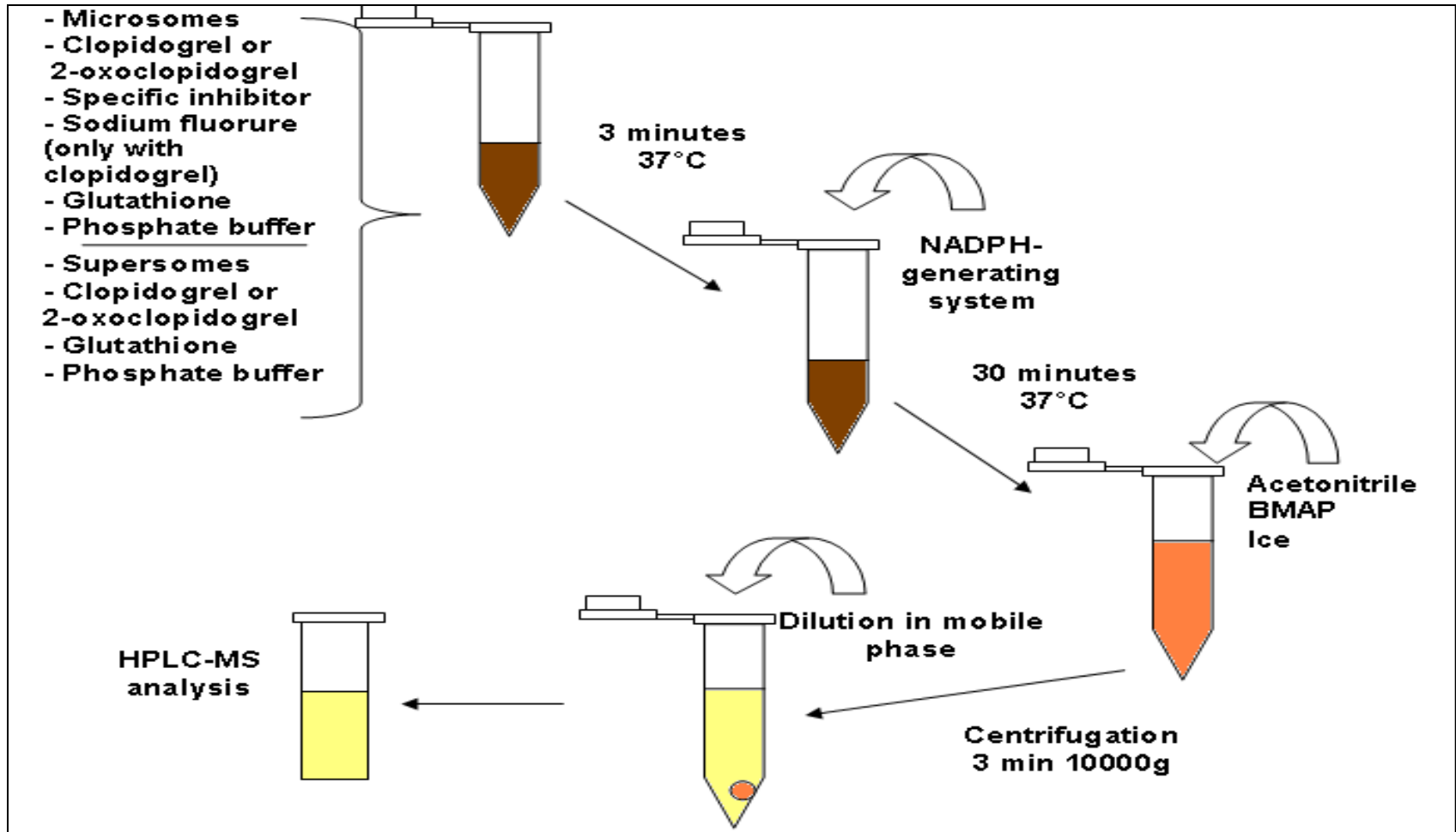
Les microsomes de foie humain

- ▶ 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

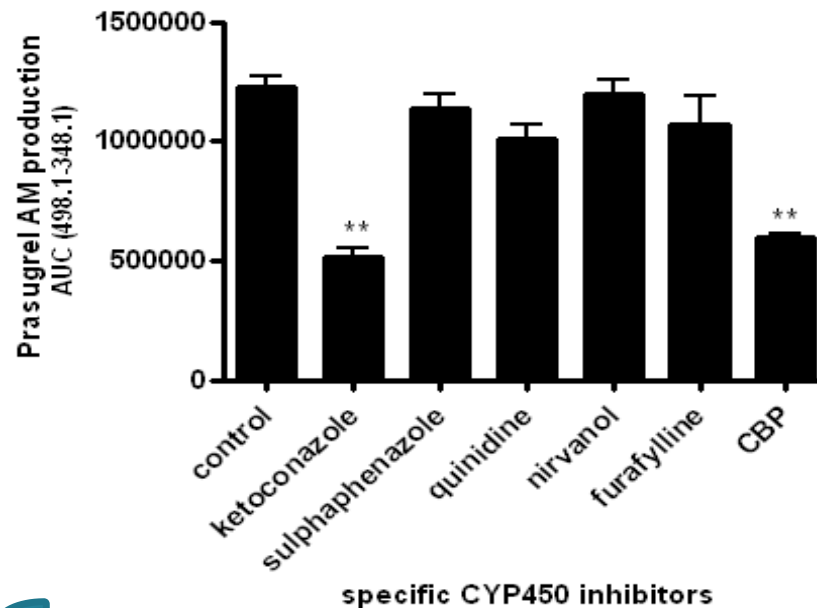


Les microsomes de foie humain

► Applications

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

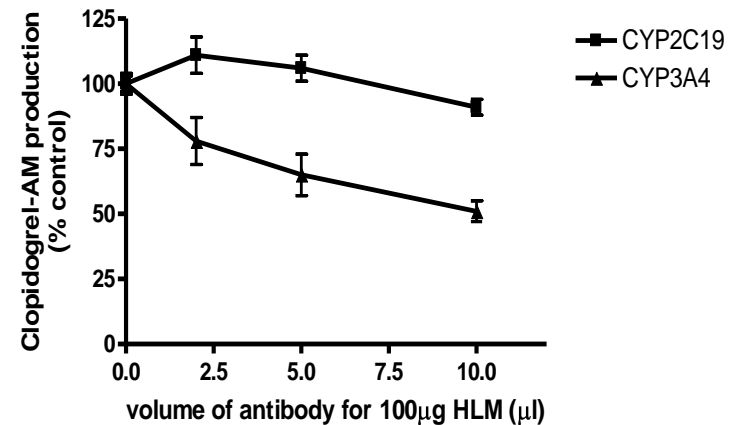
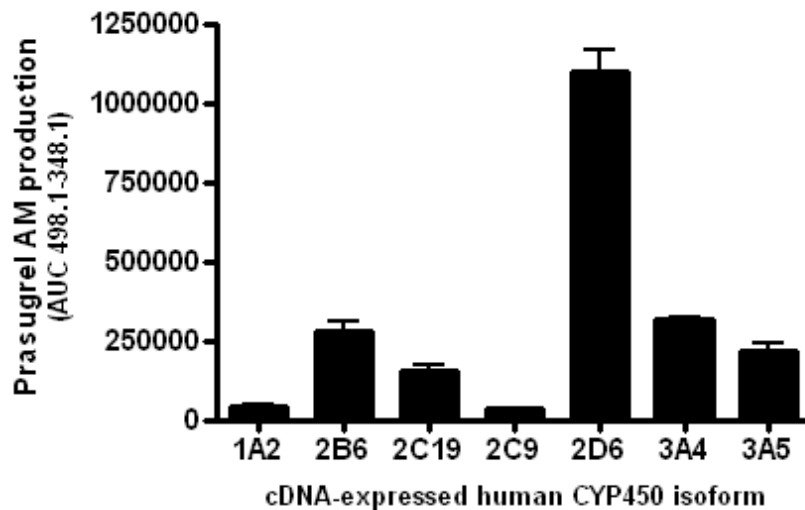
► Exemple: métabolisme du prasugrel



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

Administration de substrats tests des CYP



Récolte des urines ou prélèvement de sang



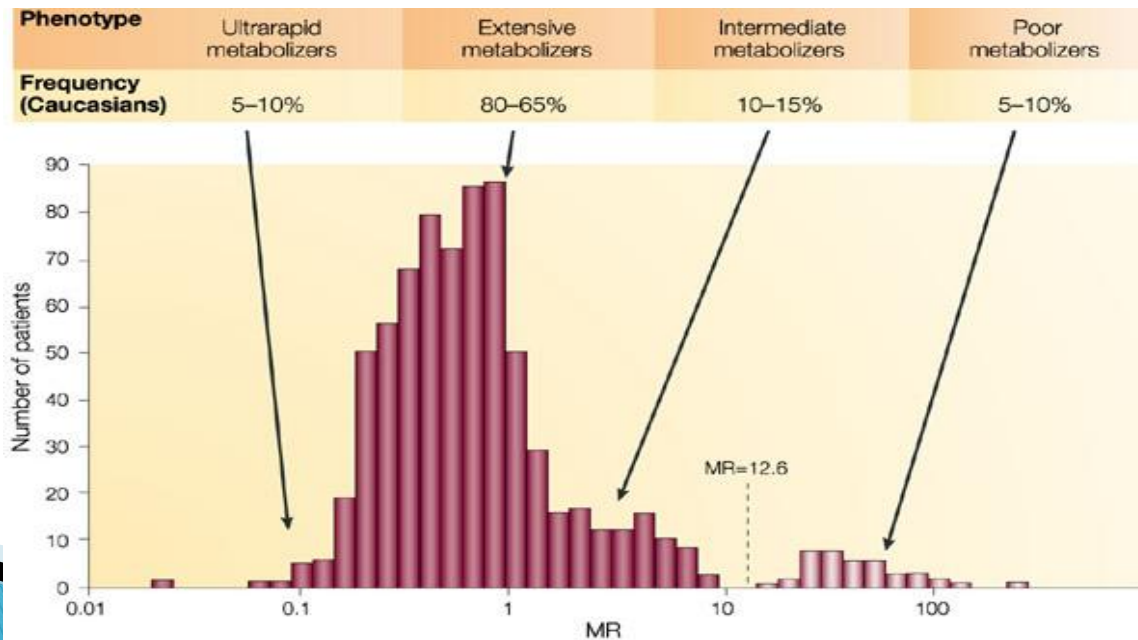
Mesure des concentrations de substrat et de métabolite



Etablissement d'un rapport métabolique



Détermination du phénotype

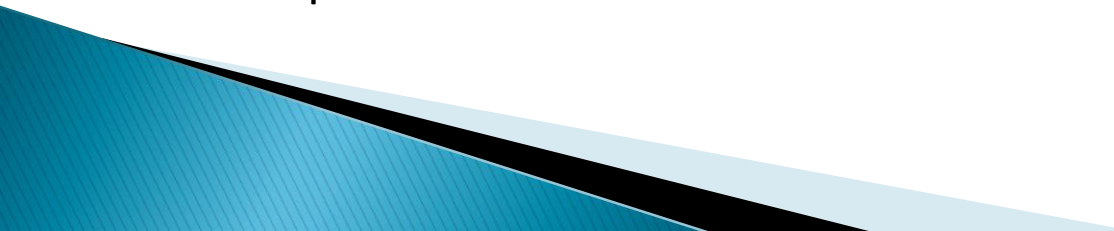


Avantages et limitations du phénotypage

▶ Avantages:

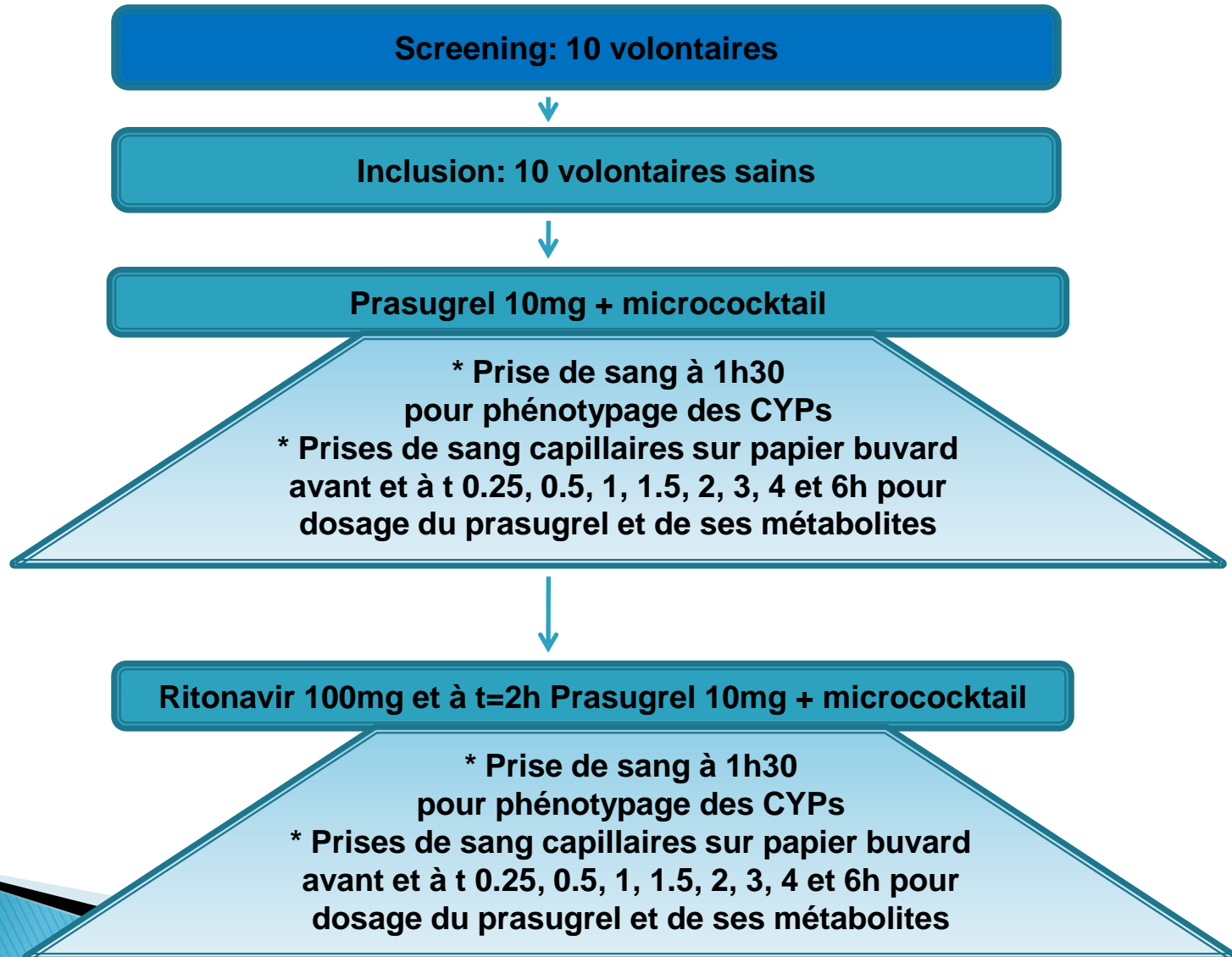
- Mesure de l'activité des CYP à un moment donné
- Individualisation thérapeutique

▶ Limitations:

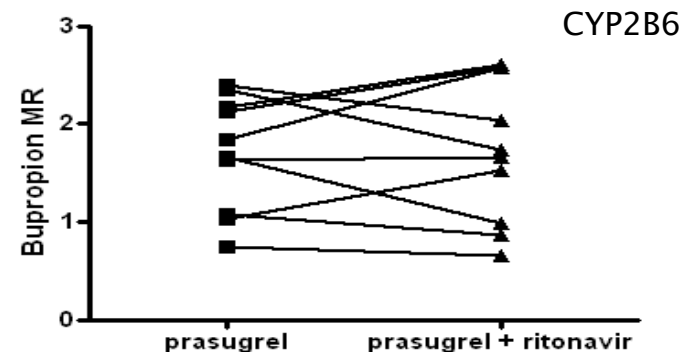
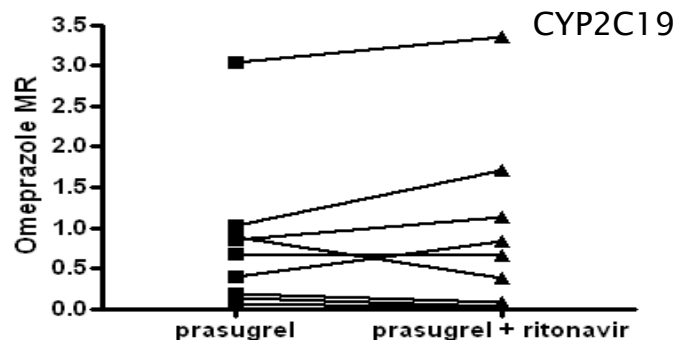
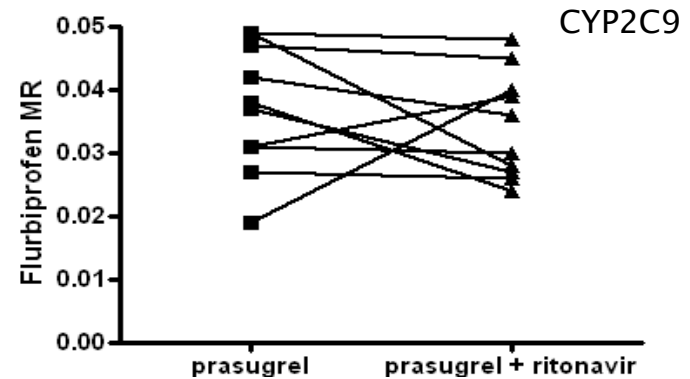
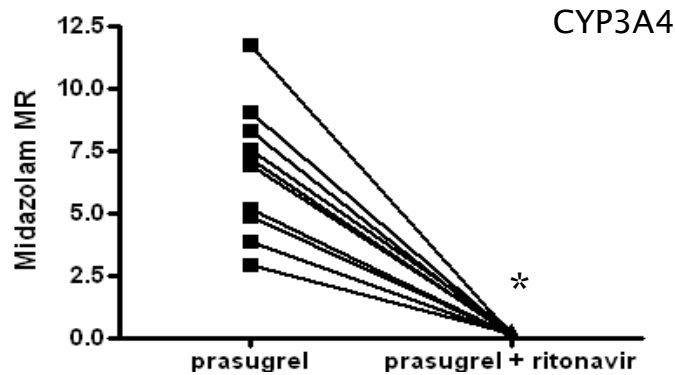
- Difficulté d'interprétation lors de co-administration avec d'autres médicaments
 - Personnes avec insuffisance rénale ou hépatique
 - Manque d'études définissant des valeurs seuils
- 

Phénotypage – Exemples d'utilisation

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



Phénotypage – Exemples d'utilisation



Midazolam MR ➔ 97.8 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, $p = 0.58$)

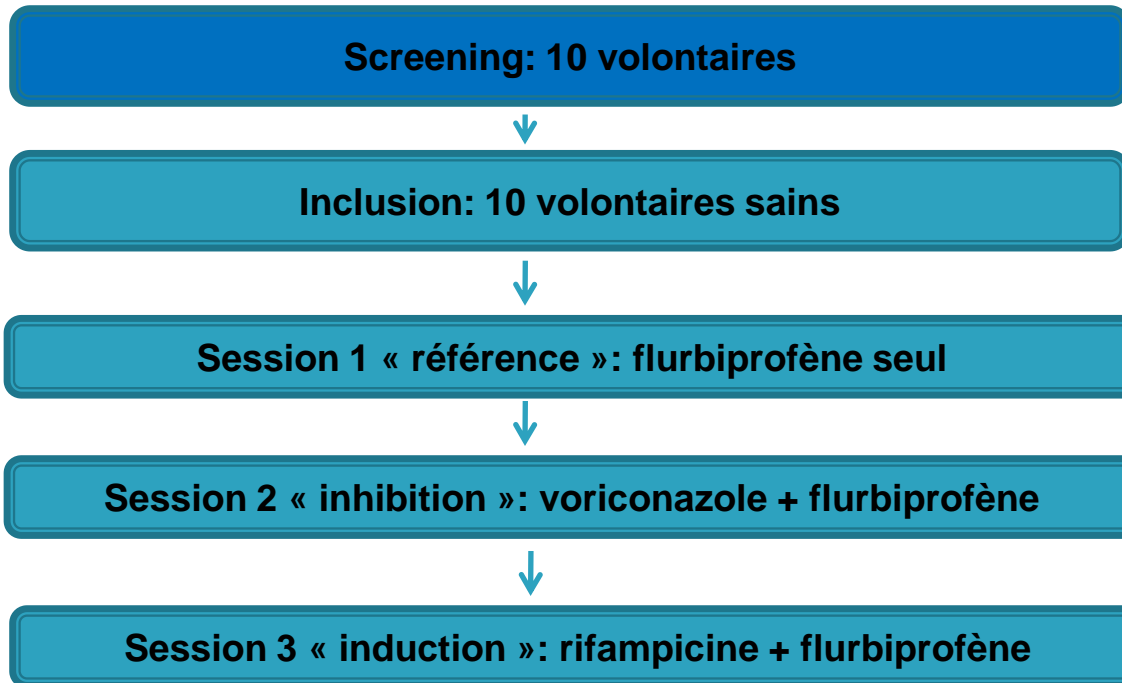
Bupropion MR (Mean ratio: 1.02, CI95: 0.85; 1.19, $p = 0.88$)

Pas d'influence
du ritonavir

➤ **Le ritonavir a fortement inhibé le CYP3A4/5**

Phénotypage – Exemples d'utilisation

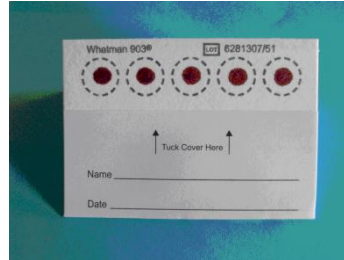
Etude clinique: détermination du rapport métabolique du flurbiprofène par la méthode DBS



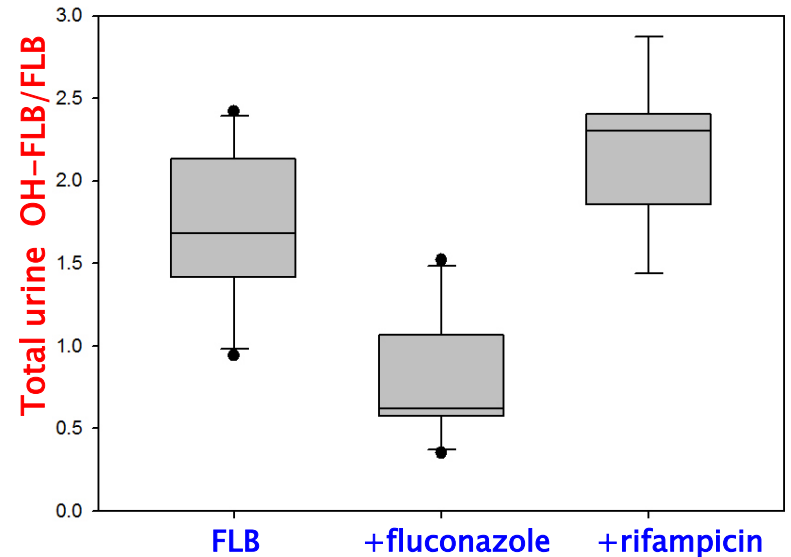
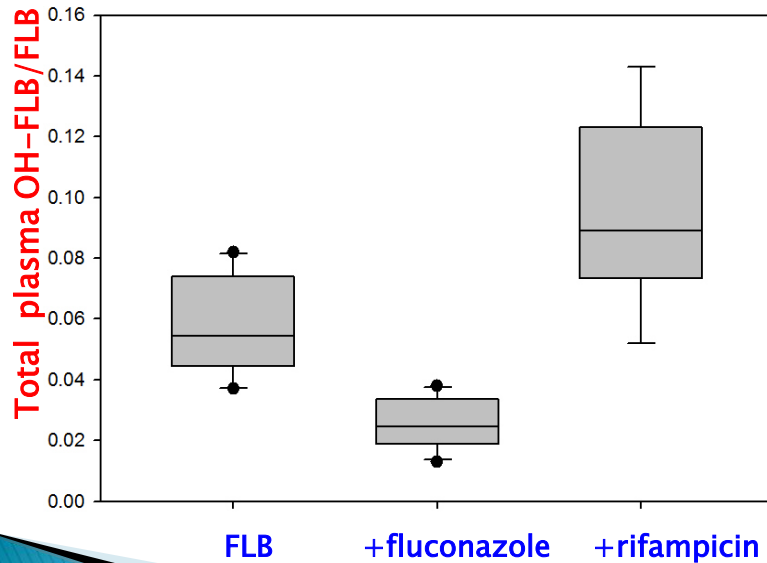
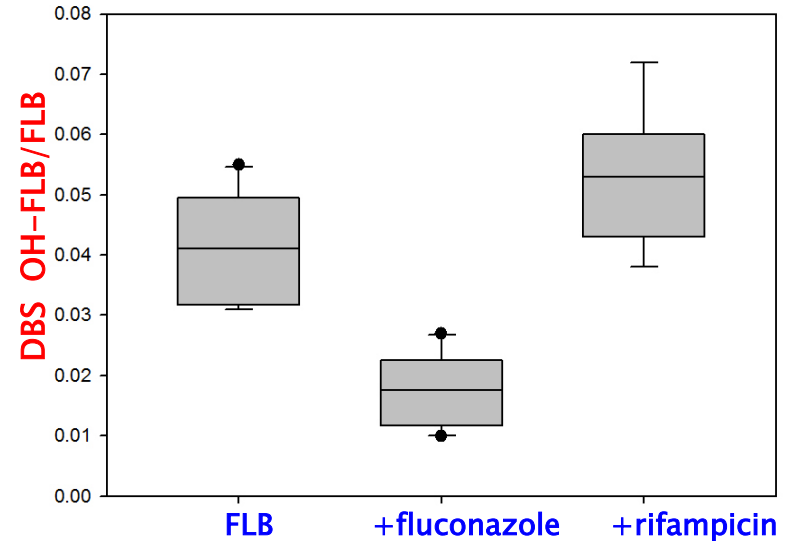
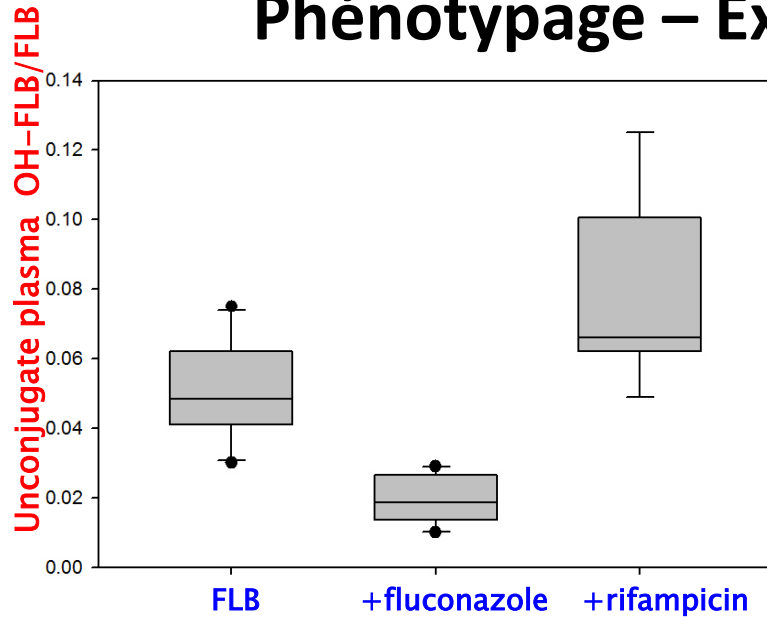
•Prises de sang capillaires sur papier buvard
et prises de sang veineux à t 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 et 8h

•Collecte d'urines sur 8h

Phénotypage – Etude en cours



Phénotypage – Exemples d'utilisation



Phénotypage – Exemples d'utilisation

Screening: 18 volontaires



Inclusion: 10 volontaires sains



Session 1 « référence »: cocktail seul



Session 2 « inhibition »: fluvoxamine/voriconazole + cocktail



Session 3 « inhibition » : quinidine + cocktail



Session 4 « induction » : rifampicine + cocktail

•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

Cocktail:

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

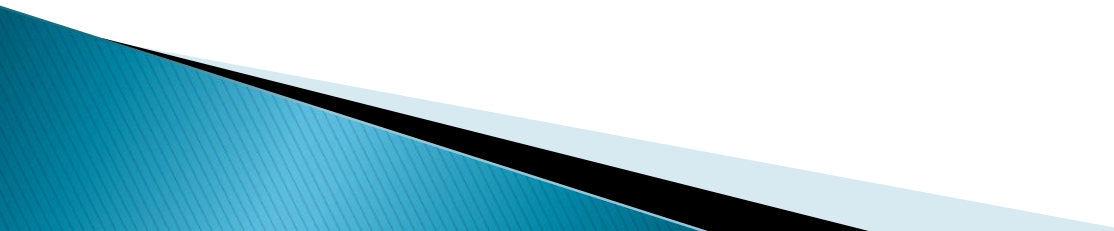
Inhibiteurs :

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

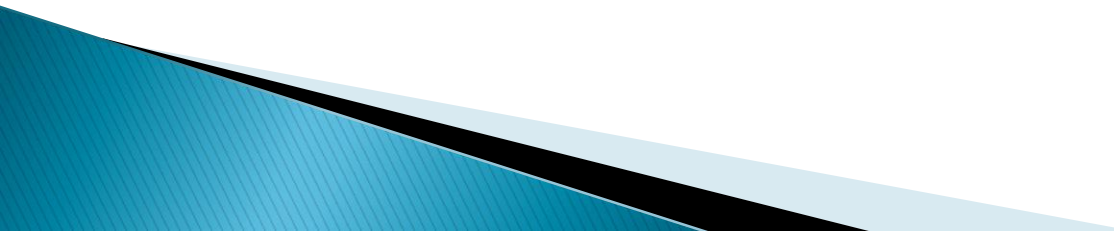
Inducteur:

Rifampicine


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