



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

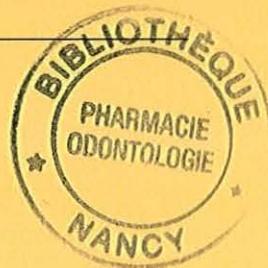
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ph N 600 / 7
Double

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I
2002

FACULTE DE PHARMACIE



**INDUCTION DU METABOLISME (CYP 3A DÉPENDANT)
DE LA METHADONE
PAR LA METHAQUALONE ET LA DIPHENHYDRAMINE**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 29 janvier 2002

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Elodie LANCERAUX**
née le 14 Août 1975

Membres du jury

Président : Professeur Anne-Marie BATT

Juges : Dr. Luc FERRARI, Maître de conférences
Dr. Chin B. EAP, Privat-Docent et Maître d'Enseignement et de Recherche

BU PHARMA-ODONTOL



D

104 059375 5

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I pph0503538
2002

DB 15836

FACULTE DE PHARMACIE



**INDUCTION DU METABOLISME (CYP 3A DEPENDANT)
DE LA METHADONE
PAR LA METHAQUALONE ET LA DIPHENHYDRAMINE**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 29 janvier 2002

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Elodie LANCERAUX**
née le 14 Août 1975

Membres du jury

Président : Professeur Anne-Marie BATT

Juges : Dr. Luc FERRARI, Maître de conférences
Dr. Chin B. EAP, Privat-Docent et Maître d'Enseignement et de Recherche

Membres du personnel enseignant 2001/2002

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Anne ROVEL

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Responsable de la filière officine

Gérald CATAU

Responsable de la filière industrie

Jeffrey ATKINSON

**DOYENS HONORAIRES**

M. BERNANOSE André

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mle BESSON Suzanne

Mle GIRARD Thérèse

M. LECTARD Pierre

M. MARTIN Jean-Armand

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEURS EMERITES

M. HOFFMAN Maurice

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie cardiovasculaire
M	AULAGNER Gilles	Pharmacie clinique
M.	BAGREL Alain	Biochimie
Mle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé publique
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Immunopathologie et organisation animale
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Mathématiques, physique et audioprothèse
Mle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie clinique
M.	HENRY Max	Botanique, mycologie
M.	JACQUE Michel	Pharmacologie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie, orthopédie, Maintien à Domicile
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Chimie
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique
M.	REGNOUF de VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie, parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Biologie et pharmacologie moléculaire
M.	SIMON Jean Michel	Droit officinal, législation pharmaceutique
M.	VIGNERON Claude	Hématologie, physiologie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme GRISON Geneviève

Pratiques officinales

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M.	COLLIN Jean François	Santé publique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie et Conseils vétérinaires
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mle	FONS Françoise	Biologie végétale et Mycologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme	HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Mycologie - Botanique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie - Botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M.	JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Communication scientifique – Communication et santé
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	POCHON Marie France	Chimie physique générale
Mme	ROVEL Anne	Histologie - Physiologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR AGREGE

M. COCHAUD Christophe

Anglais

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Mycologie
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie - Phytothérapie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Ce travail a été réalisé : à l'INSERM U 525 (équipe 4)
Faculté de pharmacie
30 rue Lionnois
54 000 NANCY

Responsable :Mme Sophie VISVIKIS

A mes juges,

Mademoiselle le Professeur Anne-Marie BATT,

qui a accepté la présidence de cette thèse.

Merci pour votre écoute et votre disponibilité.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Docteur Luc FERRARI,

qui a accepté de diriger ce travail.

Merci pour votre accueil, vos conseils et pour la liberté que vous m'avez laissée pour mener à bien ce travail.

Veuillez trouver ici l'expression de mon entière reconnaissance

Docteur Chin B. EAP,

qui me fait l'honneur de juger ce travail.

Que ce travail soit le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

A Céline et Christine,

Merci pour votre aide et pour votre bonne humeur, souvenirs de bons moments passés ensemble au laboratoire.

A toute l'équipe de l'INSERM U525,

Merci pour son accueil

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	1
---------------------	----------

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	2
----------------------------------	----------

Rappels sur le métabolisme des médicaments	2
---	----------

1 Les cytochromes P450 hépatiques	5
1.1 La sous-famille CYP 1A	10
1.2 La sous-famille CYP 2C	11
1.3 Le CYP 2D6	13
1.4 Le CYP 2E1	15
1.5 La sous-famille CYP 3A	16
2 Induction des cytochromes P450	19
2.1 Généralités	21
2.2 Cas particulier du CYP 3A	27
2.3 Implication du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'induction de CYP3A	31
2.4 Implication du récepteur CAR dans l'induction du CYP 3A	34

CHAPITRE 2 : LES MEDICAMENTS MIS EN JEU	36
--	-----------

1 La méthqualone	36
1.1 Présentation	36
1.2 Mécanisme d'action	38
1.3 Effets secondaires	38
1.4 Précautions d'emploi	38
1.5 Contre-indications	39
1.6 Posologie et mode d'administration	39
1.7 Pharmacocinétique	39
2 La diphenhydramine	42
2.1 Indications thérapeutiques	44
2.2 Mécanisme d'action	44
2.3 Effets secondaires	45

2.4 Grossesse et effets sur la descendance	45
2.5 Précautions d'emploi	45
2.6 Contre-indications	46
2.7 Posologie et mode d'administration	46
2.8 Pharmacocinétique	47
3 La méthadone	48
3.1 Présentation	48
3.2 Indications thérapeutiques	49
3.3 Mécanisme d'action	50
3.4 Effets secondaires	50
3.5 Grossesse/effets sur la descendance	50
3.6 Précautions d'emploi	51
3.7 Contre-indications	51
3.8 Posologie et modes d'administration	52
3.9 Pharmacocinétique	52
3.10 Interactions médicamenteuses	56
4 Interactions métaboliques déjà décrites avec ces médicaments	58
4.1 Interactions métaboliques décrites avec la méthqualone	58
4.2 Interactions métaboliques décrites avec la diphenhydramine	59
4.3 Interactions métaboliques décrites avec la méthadone	60
4.3.1 Inhibitions du métabolisme de la méthadone	60
4.3.2 Méthadone et anti-rétroviraux	62
4.3.3 Inductions du métabolisme de la méthadone	64

OBJECTIFS	67
------------------	-----------

CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES	69
1 Méthodes d'étude et modèles cellulaires	69
2 Culture cellulaire	70
3 Traitements des cellules	70
4 Récupération des cellules	71
5 Extraction des ARN en plaque 6 puits Protocole RNA instapure EUROGENTEC	71

6 Quantification des ARN extraits	72
6.2 Première étape : quantification par mesure spectrophotométrique	72
6.3 Deuxième étape : qualification des ARN	73
7 Technique de détection	74
7.1 Réaction de reverse transcription	76
7.2 La PCR	76
8 Tests de cytotoxicité	80
8.2 Test de cytotoxicité au MTT	80
8.2 Test d'exclusion au bleu trypan	81
9 Analyse des données / tests statistiques	82

CHAPITRE 4 : RESULTATS **83**

1 Tests de cytotoxicité	83
2 Utilisation de la GAPDH comme contrôle	84
3 Les inductions	87
2.1 La rifampicine	87
2.2 La diphenhydramine	89
2.3 La méthqualone	91

CHAPITRE 5 : DISCUSSION / CONCLUSION **93**

LISTE DES ABREVIATIONS

AAG	<i>α1 acid glycoprotein</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
Ah	aryl hydrocarbone
AMM	autorisation de mise sur le marché
ARNm	acide ribonucléique messager
ARNT	<i>Ah receptor nuclear translocator</i>
ATP	adénosine triphosphate
BET	bromure d'éthidium
BIAM	banque de données automatisée sur les médicaments
BSA	sérum albumine bovine
CAR	récepteur des androstanes constitutifs
COX 2	cyclooxygénase de type 2
CYP P450	cytochrome P450
DBD	<i>DNA binding domain</i>
DNTP	désoxynucléotides triphosphate
DO	densité optique
DR	<i>direct repeat</i>
EDDP	2-éthylène-1,5dimethyl-3,3diphenylpyrrolidine
EMDP	2-éthyl-5-méthyl-3,3-diphenypyraline
EMEA	<i>European agency for the evaluation of medicinal product</i>
ER	<i>everted repeat</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
FGT	facteurs généraux de transcription
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase
G6PD	glucose-6-phosphate-déshydrogénase

GR	récepteur aux glucocorticoïdes
HMG	<i>high mobility group proteins</i>
HSP	heat shock protein
IMAO	inhibiteurs de la monoamine oxydase
IR	<i>inverted repeat</i>
LDB	<i>ligand binding domain</i>
MDR	<i>multi drug resistance</i>
NADPH	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate, forme réduite
PAS	Per AhR Arnt Sim
PBRE	élément de réponse au phénobarbital
PBS	tampon salin phosphate
PCN	16 α carbonitrile
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PPAR	récepteur des proliférateurs de peroxisomes activé
PXR	récepteur X de la pregnénolone
RCP	résumé des caractéristiques du produit
RE	<i>responsive element</i>
RT	<i>reverse transcription</i>
RXR	récepteur X des rétinoïdes
SIDA	syndrome de l'immunodéficience humaine
SVF	sérum de veau fœtal
SXR	stéroïd X receptor = PXR
TCDD	2, 3, 7, 8-tetradichlorodibenzo-p-dioxin
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
UDPGT	uridine diphosphate glucuronyl transférase
XRE	xenobiotic responsive element
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

AVANT-PROPOS

Ce projet résulte d'une observation clinique faite par l'équipe du Docteur Chin.B EAP, Département Universitaire de Psychiatrie adulte à Lausanne. Une patiente bénéficiant d'une cure de substitution par la méthadone et abusant périodiquement de Toquilone® (somnifère commercialisé en Suisse associant méthqualone et diphenhydramine) se plaignait de symptômes de manque aux opiacés chaque fois qu'elle prenait ce somnifère. Un dosage plasmatique de méthadone à une période avec ou sans Toquilone® a permis de démontrer une diminution des concentrations de méthadone suite à la prise de ce somnifère. Une discussion avec deux autres patients, connus pour abuser par intermittences de Toquilone®, a révélé que ces patients ressentaient effectivement des symptômes de manque aux opiacés lorsqu'ils prenaient ce produit, ces symptômes apparaissant environ 3 à 4 jours après le début des prises. L'hypothèse la plus vraisemblable est que cet événement est d'origine métabolique et que l'interaction entre la méthadone et la Toquilone® résulte d'une induction de cytochrome P450 3A4. Le temps de latence avant l'apparition des symptômes de manque observés par ces patients est en accord avec le mécanisme d'induction du CYP 3A4 impliquant une synthèse *de novo* de l'enzyme.

Chapitre 1

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Rappels sur le métabolisme des médicaments.

(D'après le MONITEUR INTERNAT tome I : Toxicologie) (1)

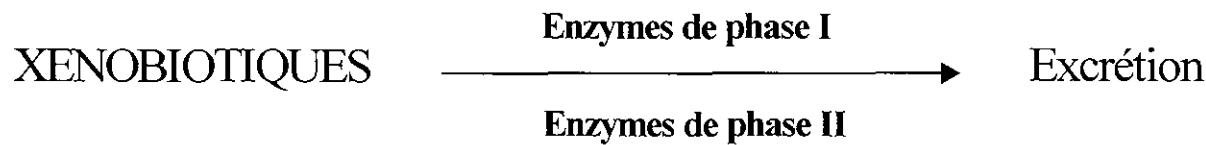
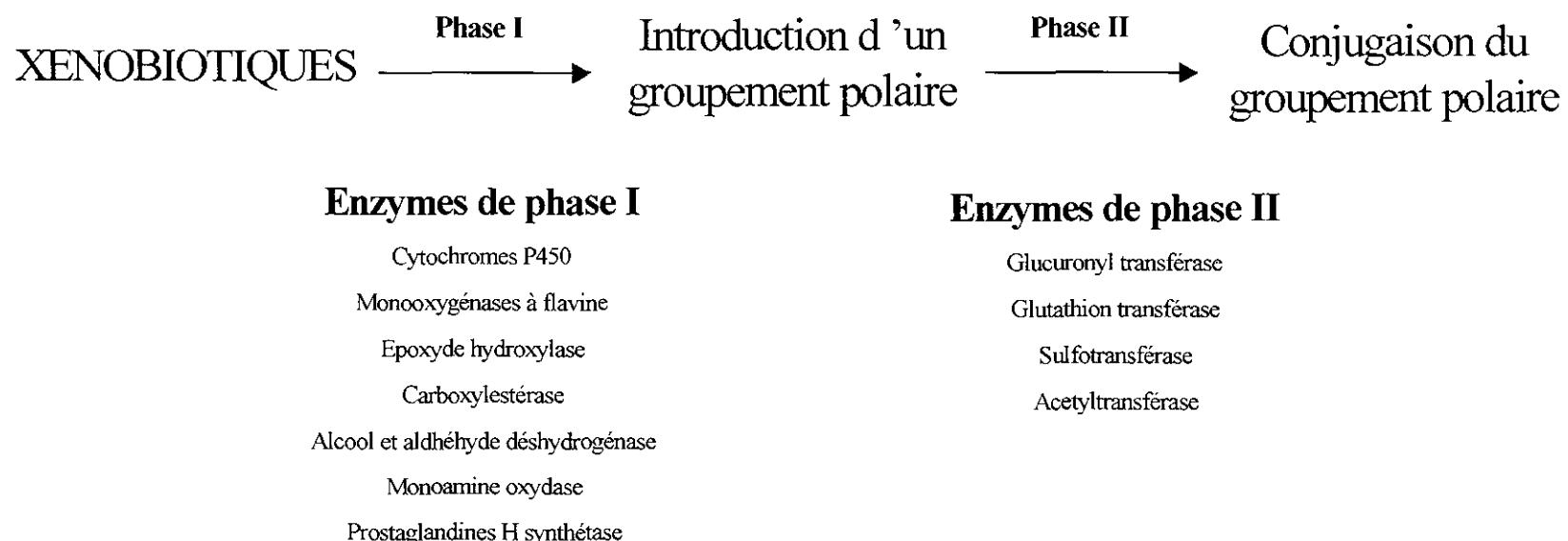
Les médicaments, comme d'autres xénobiotiques, toxiques ou non, subissent des transformations chimiques avant d'être excrétés. Les réactions de transformations des médicaments sont divisées en deux groupes :

Les réactions de phase I : capables de fonctionnaliser un médicament, c'est à dire de lui greffer un groupement réactif. Il s'agit essentiellement de réactions d'hydrolyse et d'oxydation.

Les réactions de phase I sont assurées par des monooxygénases à cytochrome P450, des monooxygénases à flavine, des monoamines oxydases, des alcools et des aldéhydes déshydrogénases.

Les réactions de phase II ou réactions de conjugaison : capables d'ajouter un groupement sulfate ou gluconate à un médicament déjà fonctionnalisé. Elles conduisent généralement à un produit hydrosoluble, peu ou pas actif, éliminé dans l'urine ou la bile. Lorsque la molécule mère est déjà porteuse d'un groupement fonctionnel susceptible d'être conjugué, une réaction de phase II peut avoir lieu sans réaction de phase I préalable.

Les réactions de phase II sont contrôlées par des UDP-glucuronyl-transférases, des glutathion-S-transférases et des époxydes hydroxylases.



Biotransformations des xénobiotiques

Le foie est le principal organe de biotransformation, mais l'intestin, les poumons et les reins participent également de façon non négligeable à ces métabolismes.

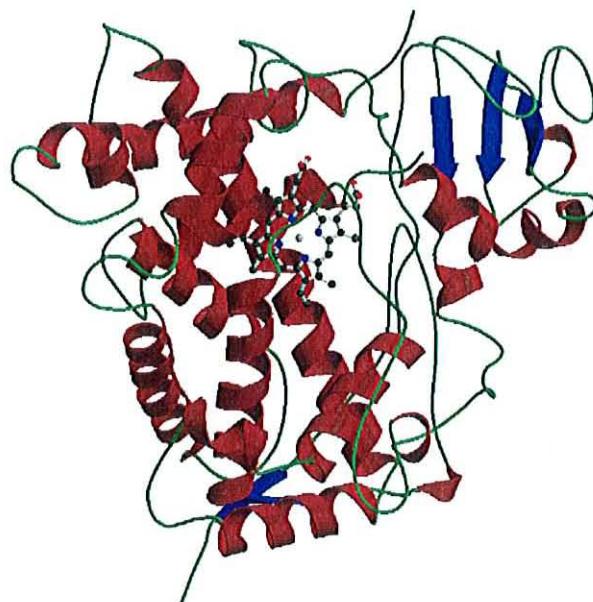
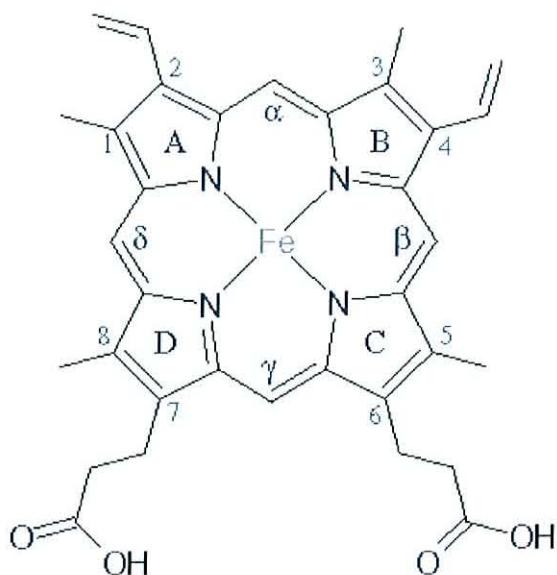
Les enzymes du métabolisme des médicaments sont localisées dans différentes fractions subcellulaires, les plus importantes se trouvant dans le réticulum endoplasmique (CYP P450, UDPGT, époxyde-transférase) et dans le cytosol (sulfotransférase, glutathion-S-transférase). Certaines de ces enzymes sont à la fois présentes dans le cytosol et dans le réticulum endoplasmique (glutathion-S-transférase, époxydes hydrolases).

Ces enzymes sont génétiquement définies, mais il existe des facteurs de variations propres à l'organisme considéré (âge, sexe, état physiologique ou pathologique) ou à l'environnement (mutations, pesticides, médicaments eux-mêmes).

Notre travail ayant pour but de vérifier si la méthqualone et la diphenhydramine sont inducteurs de CYP 3A4, il est intéressant de rappeler ce que sont les cytochromes P450 et comment ils sont régulés. Nous pourrons ensuite passer en revue les différents médicaments mis en jeu dans notre étude, ainsi que les interactions métaboliques déjà décrites avec eux. Enfin, nous exposerons le déroulement de notre travail et les résultats obtenus.

1 Les cytochromes P450 hépatiques.

Les cytochromes P450 sont une famille d'hémoprotéines constituées d'une chaîne polypeptidique simple (400 à 540 acides aminés) et d'un groupement prosthétique, noyau térapyrrolique (protoporphyrine IX), associé à un atome de fer.



Coordination d'un atome de Fer
au noyau térapyrrolique

Structure tridimensionnelle de la partie soluble d'un
cytochrome P450 de mammifère
L'hème est représenté en mode sphère et bâton

Les cytochromes P450 doivent leur nom à leur découverte sous forme de pigments (P) dans des fractions microsomaux hépatiques et à leur spectre d'absorption à 450 nm lorsque leur atome de fer est réduit à l'état ferreux (Fe 2+).

Selon le degré d'homologie entre les séquences primaires des acides aminés constitutifs, les cytochromes P450 ont été répartis en familles et sous-familles. En règle générale, les cytochromes appartenant à une même famille possèdent plus de 40% d'homologie de séquences et à l'intérieur d'une même sous-famille, l'homologie de séquences en acides aminés est supérieure à 55% (2).

Au niveau cellulaire, les cytochromes sont essentiellement localisés dans la membrane du réticulum endoplasmique. Leur répartition est ubiquitaire, mais on les trouve principalement au niveau des hépatocytes, des cellules biliaires, des cellules épithéliales intestinales, au niveau des tissus pulmonaires, rénaux, cutanés et surréaliens.

La nomenclature actuelle des cytochromes P 450, consiste à nommer un gène ou un ADNc par le symbole *CYP*, suivi d'un chiffre arabe désignant la famille, d'une lettre majuscule désignant la sous famille, puis d'un chiffre arabe pour chaque gène. (Nomenclature internationale selon Nebert *et coll.*, 1987) (3). Pour désigner l'ARNm ou la protéine enzymatique, la même nomenclature est employée sans italique.

Les cytochromes P450 proviennent d'un même gène ancestral s'étant différencié au cours de l'évolution phylogénique en de très nombreuses isoenzymes.

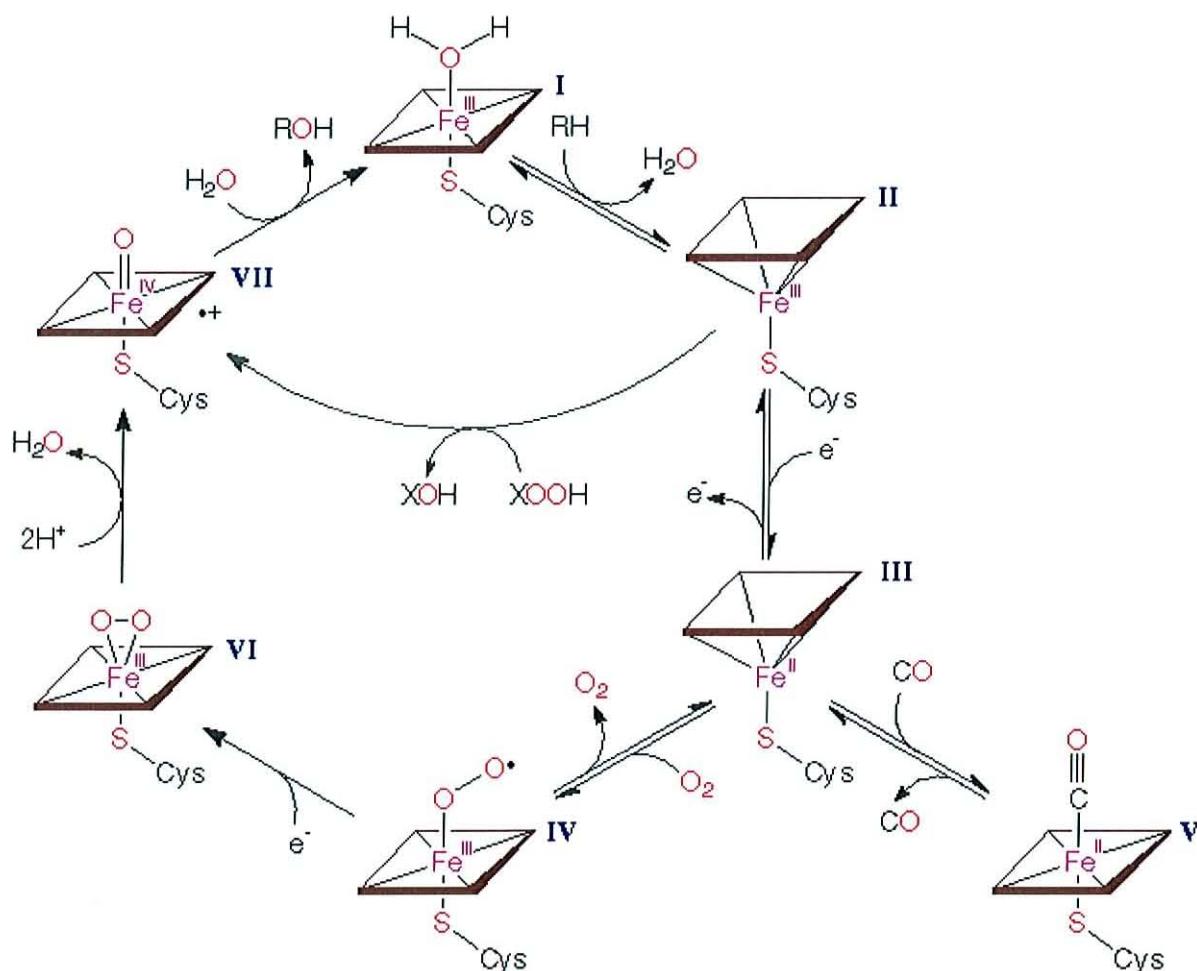
Actuellement, près d'un millier de gènes sont identifiés et séquencés à partir de génomes eucaryotes et procaryotes. Il existe 57 gènes connus chez l'homme et plus de 29 pseudogènes, répartis en 18 familles et 43 sous-familles (4).

Familles	Type de métabolisme
CYP1	Métabolisme des xénobiotiques
CYP2	Métabolisme des xénobiotiques et stéroïdes
CYP3	Métabolisme des xénobiotiques
CYP4	Métabolisme de l'acide arachidonique et des acides gras
CYP5	Thromboxane A2 synthétase
CYP7A	Biosynthèse des acides biliaires
CYP7B	7- α hydroxylase
CYP8A	Prostacycline synthétase
CYP8B	Biosynthèse des acides biliaires
CYP11	Biosynthèse des stéroïdes
CYP17	Biosynthèse des stéroïdes
CYP19	Biosynthèse des stéroïdes
CYP 20	?
CYP21	Biosynthèse des stéroïdes
CYP24	Dégradation de la vitamine D
CYP26A	Acide rétinoïque hydroxylase
CYP26B	Acide rétinoïque hydroxylase ?
CYP27A	Biosynthèse des acides biliaires
CYP27B	Vitamine D3 1- α hydroxylase
CYP 27C	?
CYP39	?
CYP46	Cholestérol 24-hydroxylase
CYP51	Biosynthèse du cholestérol lanostérol 14- α démethylase

Tableau I : Types de réactions métaboliques catalysées par les diverses familles de CYPs chez l'homme.
[\(<http://drnelson.utmem.edu/nelsonhome.page.html>\)](http://drnelson.utmem.edu/nelsonhome.page.html)

Les cytochromes P450 catalysent de nombreuses réactions de transformations, en particulier des oxydations et des réductions, non seulement de xénobiotiques (médicaments, toxiques naturels et de synthèse), mais aussi de dérivés endogènes (stéroïdes, acides biliaires, vitamine D, acides gras, prostaglandines, leucotriènes, rétinoïdes...). Leur principale fonction étant de convertir des substances hydrophobes en dérivés plus hydrophiles et donc plus facilement éliminables par l'organisme.

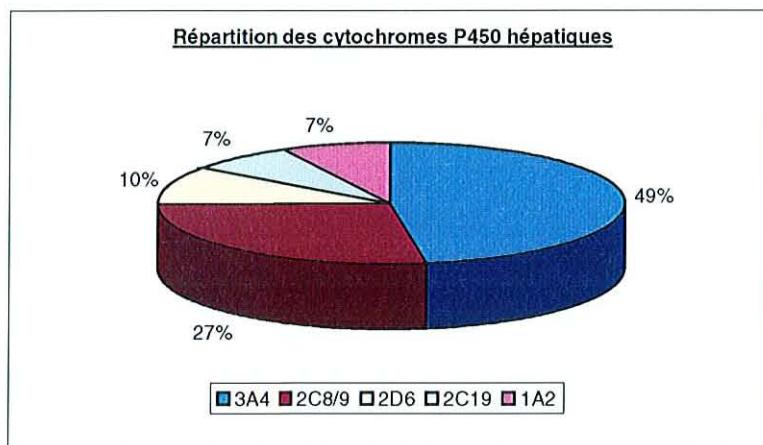
Le système des monooxygénases à cytochrome P450 est un système multienzymatique capable d'oxyder une substance en lui transférant un atome d'oxygène (et un seul) à partir d'oxygène moléculaire. Le cycle du cytochrome P450 est connu.



Cycle catalytique des P450

Ce système est composé de divers cytochromes, de la NADPH-cytochrome P450-réductase, du cytochrome b5 et de phospholipides assurant la cohésion membranaire et la concentration de substrats liposolubles. Le principal coenzyme de la réaction, donneur d'électrons est le NADPH. La variété catalytique dans le système monooxygénase provient de la variation de la partie protéique du cytochrome P450.

Chez l'homme, plus de 90% du métabolisme oxydatif des médicaments est assuré par seulement 6 isoenzymes : CYP 1A2, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 2E1, CYP 3A4. La répartition de ces différentes isoenzymes dans le foie, montre que CYP 3A4 représente plus de la moitié des cytochromes P450 hépatiques ; CYP 3A4 participant au métabolisme oxydatif de plus de 50% des médicaments utilisés aujourd'hui (5).



L'importance clinique des cytochromes tient à la grande variabilité interindividuelle de leur activité métabolique trouvant son origine au niveau génétique et environnemental.

Le niveau d'activité des cytochromes est soumis à une régulation génétique. Chez l'homme, le contrôle génétique est polygénique pour les CYP 1A2, CYP 2E1 et CYP 3A4. A l'inverse, le contrôle génétique des CYP 2C9, CYP 2C19 et CYP 2D6 étant monogénique, il conduit, par mutations, à un polymorphisme génétiquement déterminé se traduisant par deux catégories de métaboliseurs, lents et rapides. Ces caractéristiques populationnelles, variables selon les ethnies, peuvent avoir des conséquences importantes à l'échelon individuel sur l'efficacité thérapeutique d'un médicament mais aussi sur ses effets indésirables, surtout si ces

derniers sont dose-dépendants et si la marge thérapeutique du médicament est étroite. Tout dépend néanmoins du résultat final du métabolisme médicamenteux pouvant amener à des situations pharmacologiques et thérapeutiques très différentes selon les propriétés pharmacologiques du principe actif administré et de son ou ses métabolite(s) : Substance mère active/métabolite(s) inactif(s), substance mère inactive (prodrug)/métabolite(s) actif(s).

Actuellement, les conséquences pratiques tirées du polymorphisme génétique de certains cytochromes restent décevantes et très peu exploitées en clinique.

Les facteurs environnementaux susceptibles de modifier l'activité des cytochromes ont principalement donné lieu ces dernières années à la reconnaissance de nombreuses interactions médicamenteuses faisant intervenir des médicaments inducteurs ou inhibiteurs de l'activité des cytochromes. L'induction enzymatique des cytochromes par un médicament est un phénomène peu spécifique bien qu'elle concerne principalement les CYP 2C et 3A. Les inducteurs enzymatiques accélèrent le métabolisme de certains médicaments, diminuent leurs concentrations plasmatiques, et réduisent notablement leur efficacité. L'induction enzymatique est un phénomène progressif, atteignant son maximum en 10 à 15 jours, période pendant laquelle le risque interactif augmentera régulièrement. De la même façon, l'effet inducteur disparaîtra progressivement à l'arrêt du médicament mis en cause. L'alcool en prise chronique, le tabac, le millepertuis sont aussi des inducteurs du métabolisme des médicaments. A l'inverse, l'inhibition enzymatique des cytochromes par un médicament est un phénomène rapide répondant schématiquement à deux mécanismes : une réelle inactivation du CYP par l'inhibiteur ou, plus souvent, une compétition au niveau d'un même CYP entre deux médicaments administrés simultanément, fixés et métabolisés par le même cytochrome. Les inhibiteurs enzymatiques ralentissent le métabolisme de certains médicaments, augmentent leurs concentrations plasmatiques et majorent leurs risques d'effets indésirables. L'inhibition enzymatique s'exerce plus sélectivement au niveau d'un ou plus rarement de deux cytochromes et ses conséquences cliniques peuvent apparaître rapidement quand le médicament inhibé a une demi-vie d'élimination courte.

1.1 La Sous-famille CYP 1A

La sous-famille CYP 1A comprend deux gènes inductibles *CYP 1A1* et *CYP 1A2*.

CYP 1A1 est majoritairement exprimé dans les tissus extrahépatiques. *CYP 1A2* est constitutivement exprimé dans le foie et représente 15% des cytochromes P450 hépatiques. Toutefois, il existe des variations physiopathologiques de *CYP 1A2*. Elles sont dues à un polymorphisme génétique, à une diminution du taux de *CYP 1A2* lors de maladies hépatiques et à une distribution variable de l'enzyme d'un lobe hépatique à un autre.

Aucun substrat endogène n'est connu pour cette sous-famille.

CYP 1A2 métabolise de nombreux cancérigènes et mutagènes, le 2-aminofluorène, l'aflatoxine B1, des dérivés de pyrolyse du tryptophane, les mutagènes de la fumée du tabac. Il participe au métabolisme de médicaments et est notamment en partie responsable de l'oxydation du paracétamol en quinone-imine, métabolite hépatotoxique. La caféine est utilisée comme substrat *in vivo* pour mesurer l'activité de *CYP 1A2*.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (TCDD, méthylcholantrène, benzo(a)pyrène) et en particulier la fumée de cigarette, dont l'activité cancérigène est établie (6) induisent *CYP 1A*. L'induction de *CYP 1A* est médiée par le récepteur Ah (Arylhydrocarbon), ou récepteur à la dioxine.

CYP 1A2 est également induit par les pyrolysats du tryptophane, présents dans les poissons et viandes grillés, et par les dérivés indolés ou indoles-carbazoles des végétaux de la famille des crucifères (brocoli, choux). Parmi les médicaments inducteurs connus, on retrouve une structure imidazole ou benzimidazole, tel un antiacide l'oméprazole et un antihelminthique, l'albendazole.

Les principaux inhibiteurs de *CYP 1A2* sont *in vitro*, la furafylline (7) et *in vivo*, la fluvoxamine (8).

CYP 1A2		
SUBSTRATS	INHIBITEURS	INDUCTEURS
Amitriptyline Caféine Clomipramine Clozapine Cyclobenzaprine Estradiol Fluvoxamine Halopéridol Imipramine Méxilétine Naproxène (en partie) Ondansétron (en partie) Olanzapine Paracétamol phénacétine⇒acetominophène ⇒NAPQI Propanolol Riluzole Tacrine Théophylline Vérapamil (theo) (R) Warfarine Zileuton	Amiodarone Cimétidine Fluoroquinolones Fluvoxamine (0.2µM) Furafylline (<i>in vitro</i>) Interféron ? Methoxalène Mibepradil Ticlopidine	HAP Pyrolysats du tryptophane Indolés ou indoles carbazole β-naphtoflavone Insuline Oméprazole Albendazole

Tableau II : Substrats, inhibiteurs et inducteurs de CYP 1A2

1.2 La sous-famille CYP 2C

Elle est constitutivement exprimée dans le foie et représente environ 20% des cytochromes P450 hépatiques. Elle comprend 4 gènes distincts dont *CYP 2C8*, très peu exprimé dans le foie, *CYP 2C19* et l'isoforme majeure *CYP 2C9*.

Le cytochrome 2C8 participe au métabolisme du rétinol et de l'acide rétinoïque, métabolise en partie le taxol par une 6α-hydroxylation, catalyse la N-déméthylation de la benzphétamine et participe en partie au métabolisme des substrats de CYP 2C9.

CYP 2C9 métabolise des substrats faiblement acides comme la S-warfarine (9), le tolbutamide, la phénytoïne (10), le sulfamethoxazole (11), les AINS, les inhibiteurs de la COX-2 (12). Le CYP 2C9 ne métabolise pas la S-mephénytoïne.

Les CYP 2C présentent de très grandes variations interindividuelles dans les foies humains. Il est possible que ce polymorphisme soit responsable d'effets indésirables sévères lors de traitements de longues durées. Ainsi l'hydroxylation de la S-méphénytoïne par le ou les P450 appartenant à la sous-famille 2C est polymorphe : 2 à 20% des humains sont dépourvus de la capacité d'hydroxyler la S-méphénytoïne. De nombreux médicaments présentent la même distribution polymorphe que la S-méphénytoïne, ce sont :

L'hydroxylation de l'hexobarbital et du mephébarbital ; l'hydroxylation de l'oméprazole ; l'oxydation de la chaîne latérale du propanolol ; la N-déméthylation de l'imipramine en desmethylimipramine ; l'oxydation du proguanil (prodrug) en cycloguanil ; la N-déméthylation du diazépam.

CYP 2C19		
SUBSTRATS	INHIBITEURS	INDUCTEURS
<u>Inhibiteurs de la pompe à protons :</u> Lansoprazole Oméprazole Pantoprazole E-3810 <u>Anti-épileptiques :</u> Diazépam Phénytoïne S-méphénytoïne Amitriptyline (en partie) Citalopram Clomipramine (en partie) Cyclophosphamide Hexobarbital Imipramine Indométacine R-mephobarbital Moclobémide Nelfinavir Nilutamide Primidone ? Progestérone Proguanil Propanolol (en partie) Téniposide R-Warfarine⇒8-OH	Cimétidine Felbamate Fluoxétine Fluvoxamine Indométacine Kétoconazole Lansoprazole Oméprazole Paroxétine Probénécide ? Ticlopidine Topiramate	Carbamazépine ? Rifampicine Prednisone Norethindrone Statines ? ⇒ PAS Phénobarbital

Tableau III :Substrats, inhibiteurs et inducteurs de CYP 2C19

CYP 2C9		
SUBSTRATS	INHIBITEURS	INDUCTEURS
<u>AINS :</u> Diclofénac Ibuprofène S-Naproxène Piroxicam Suprofène <u>Hypoglycémiants oraux :</u> Tolbutamide, Glipizide <u>Inhibiteurs de l'AngiotensinII :</u> Ibesartan losartan Valsartan ⇒PAS Candesartan <u>Inhibiteurs de la COX-2 :</u> Celecoxib Phénytoïne Sulfomethoxazole Tamoxifène Torsemide S-Warfarine	Amiodarone Fluconazole Fluvastatine Isoniazide Lovastatine Paroxétine Probénécide ? Sertraline Sulphénazole (0.5µM) Sulfinpyrazole Triméthoprime Zafirlukast phénylbutazone	Rifampicine Secobarbital

Tableau IV : Substrats, inhibiteurs et inducteurs de CYP 2C9

1.3 Le CYP 2D6.

Le CYP 2D6 représente 1 à 5% des cytochromes P450 hépatiques. Il est l'exemple le plus documenté du polymorphisme génétique des enzymes d'oxydation. Le polymorphisme de CYP 2D6 est exprimé dans 4 phénotypes : métaboliseurs extensifs, métaboliseurs lents ou limités, métaboliseurs intermédiaires, métaboliseurs ultra-rapides. Ce polymorphisme représente une très grande variabilité interethnique. 7 à 8% des caucasiens sont des métaboliseurs lents.

L'intérêt porté au CYP 2D6 en pharmacologie et toxicologie tient à ce que de nombreuses études cliniques ont montré que le polymorphisme a des conséquences en thérapeutique

(inefficacité ou apparition d'effets indésirables). De plus des études épidémiologiques tendent à montrer des associations entre risques pathologiques (cancers, maladies neurodégénératives, maladies inflammatoires) et le génotype 2D6 (13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19). Le CYP 2D6 intervient dans le métabolisme d'un grand nombre de médicaments, et les conséquences du polymorphisme sont variables selon l'index thérapeutique, l'importance de la voie métabolique polymorphe. A côté de son rôle dans la biotransformation des médicaments, CYP 2D6 est impliqué dans le métabolisme de substances endogènes, de xénobiotiques procarcinogènes et de neurotoxiques.

CYP 2D6			
SUBSTRATS		INHIBITEURS	INDUCTEURS
<u>β-bloquants :</u> S-métoprolol Timolol Labetolol Propanolol Pindolol Propafénone	<u>Analgésiques :</u> Codéine Fentanyl Mepiridine Dextrométhorphane Propoxyphène Oxycodone	Amiodarone Chlorpheniramine Cimétidine Clomipramine Cocaïne (0.074µM) Doxorubicine ? Fluoxétine Halofantrine Indinavir Red-halopéridol Lévomépromazine	Dexaméthasone ? Rifampicine ?
<u>Antidépresseurs</u> Amitriptyline (en partie) Clomipramine (en partie) Imipramine Paroxétine Venlafaxine Fluoxétine Fluvoxamine Trazadone	Alprénolol Amphétamines Bufuralol Débrisoquine Dexflenfuramine Encaïnide Flécaïnide Lidocaïne Méthoxyamphétamine S-métilétine Nortriptyline Minaprine Ondansétron Pehexilline Phénacetine Phenformine Propanolol Quanoxan Spartéine Tramadol	Méthadone Mibepridil Moclobémide Paroxétine (2µM) Quinidine (0.04µM) Ranitidine Ritonavir	
<u>Neuroleptiques, Antipsychotiques</u> Halopéridol Perphénazine Rispéridone Thioridazine Chlorpromazine			

Tableau V : Substrats, inhibiteurs, inducteurs de CYP 2D6

1.4 Le CYP 2E1.

Le cytochrome 2E1 participe au métabolisme de nombreuses substances endogènes : lipides produits par peroxydation, cétone, acides gras comme les acides linoléique et arachidonique (20). Il participe également au métabolisme de solvants, de produits cancérogènes, mais assez peu de médicaments.

La sous-famille 2E est très importante du point de vue toxicologique car elle est inducible par beaucoup de petites molécules organiques, en particulier des solvants.

Chez l'homme, les inhibiteurs caractéristiques sont le disulfirame et le méthoxypsoralène.

CYP 2E1		
SUBSTRATS	INHIBITEURS	INDUCTEURS
Solvants : N-nitrosodimethylamine Aniline Ethanol Tétrachlorure de carbone Cancérogènes : Diméthylnitrosamine Chloroforme Cl- et Br- de vinyle Br- et Cl- d'éthylène Carbamate de vinyle et d'éthyle Benzène Styrene Médicaments : <i>Anesthésiques</i> : enflurane, halothane, isoflurane, méthoxyflurane, sevoflurane paracétamol Caféine Chlorzaxone Acetominophène N,N-diméthylformamide Théophylline	Diéthyl-dithiocarbamate Disulfirame	Ethanol Isoniazide

Tableau VI : Substrats, inhibiteurs, inducteurs de CYP 2E1

1.5 La Sous famille CYP 3A.

Les cytochromes 3A sont les cytochromes les plus abondants dans le foie humain et représentent environ 30% des cytochromes P450 hépatiques humains (21). Chez l'homme, cette sous-famille est composée de quatre gènes et de deux pseudogènes (*CYP 3A4*, *CYP 3A5*, *CYP 3A43* et *CYP 3A7*), localisés sur le chromosome 7 aux positions 7q21-q22.1. La sous-famille 3A est particulièrement importante pour le métabolisme des substrats endogènes (stéroïdes) et pour celui de très nombreux médicaments. En effet, les cytochromes 3A métabolisent entre 45 et 60% des médicaments utilisés aujourd'hui en clinique (22 ; 23). Les cytochromes 3A possèdent une large spécificité de substrats. Aussi, leur grande similarité structurale et les résultats de plusieurs études montrent que la spécificité de substrats entre les différentes isoformes est similaire (24). Les cytochromes 3A sont inductibles. Cette régulation met principalement en jeu le récepteur PXR après formation d'un hétérodimère avec le récepteur RXR (25 ; 26). De récentes études montrent que les récepteurs GR et CAR sont également impliqués dans l'induction de CYP 3A (27 ; 28).

Les *CYP 3A4*, *CYP 3A5* et *CYP 3A43* sont exprimés chez l'adulte alors que le *CYP 3A7* est principalement exprimé chez le fœtus.

Le *CYP 3A5* possède 85% d'homologie avec le *CYP 3A4*. Il est exprimé dans les poumons, dans les reins et au niveau du colon (29 ; 30). Les cytochromes 3A4 et 3A5 possèdent peu de différences au niveau du métabolisme des stéroïdes et de la ciclosporine. Le *CYP 3A43* est quant à lui faiblement exprimé au niveau des tissus hépatiques, rénaux, pancréatiques et prostatiques (31). D'autre part, le fœtus et les cellules tumorales expriment une forme particulière du CYP P450, le *CYP 3A7*. Ce dernier constitue en effet 50% des cytochromes hépatiques fœtaux. Par ailleurs, Schuetz *et coll.*, 1994 ont montré que *CYP 3A7* pouvait être également exprimé chez l'adulte (32).

Le cytochrome 3A4 est le plus important et le plus étudié des membres de la sous-famille 3A. En effet le *CYP 3A4*, majoritaire au niveau hépatique, participe au métabolisme de la moitié des médicaments utilisés aujourd'hui et est mis en cause dans de nombreuses interactions médicamenteuses (33). Il existe une variabilité interindividuelle de l'activité de *CYP 3A4*. Les facteurs génétiques responsables de cette variabilité restent encore largement inconnus. Eiselt *et coll.*, 2001 ont mené une étude sur une banque d'ADN représentative d'une population d'eurocéans du centre et de l'Est et ont répertorié 18 variants de *CYP 3A4* codant seulement huit protéines différentes. Ces résultats suggèrent une contribution limitée des

différents variants protéiques de CYP 3A4 à la variabilité interindividuelle des CYP 3A4 chez les Caucasiens. Cependant, certains variants pourraient modifier le métabolisme de certains médicaments et la sensibilité envers certains carcinogènes (34).

Des méthodes d'étude *in vivo* chez l'homme sont employées pour estimer l'activité du CYP 3A4, en présence ou non d'éventuels inhibiteurs ou inducteurs enzymatiques. Pour cela, le cortisol, hormone physiologique ou des médicaments tels que la nifédipine, l'érythromycine, la lidocaïne sont utilisés comme substrats.

Les barbituriques, la dexaméthasone et la rifampicine sont des inducteurs puissants de CYP 3A4 (35). En effet l'induction du métabolisme de la ciclosporine par la rifampicine ou par la dexaméthasone est telle que la concentration de ciclosporine s'effondre, ce qui fait courir un risque de rejet de greffe. D'autre part, l'augmentation du métabolisme des stéroïdes naturels ou synthétiques lors des traitements par les barbituriques est connu depuis longtemps avec comme conséquence l'échec des contraceptifs oraux (36).

Plusieurs inhibiteurs de CYP 3A4 sont connus : le TAO qui forme un intermédiaire réactif, lequel réagit dans le site actif de l'enzyme pour former un complexe. Un autre exemple est celui du gestodène, analogue de la progestérone qui détruit le P450 par lequel il est lui-même métabolisé (35). Enfin, des flavonoïdes du pamplemousse, qui sont présents dans le jus de fruit, la naringénine, la quercétine et le kaempferol sont capables d'entrer en compétition avec le métabolisme de la nifédipine. La cimétidine est également un inhibiteur efficace, ainsi que les antifongiques de structure imidazole : kéroconazole, miconazole, clotrimazole.

Le CYP 3 A4 est également mis en jeu dans la biotransformation de substrats physiologiques tels que la testostérone, la progestérone, l'androstène-dione, le cortisol par 6β hydroxylation, l'estradiol par 2- ou 4-hydroxylation et la DHEA 3-sulfate par 16α hydroxylation (37).

Il participe également à l'inactivation de toxiques tels que l'aflatoxine B1 et un alcaloïde de structure pyrrolizidine du séneçon, la sénescionine.

Il est intéressant de remarquer la taille très variable des substrats de CYP 3A4. Ceci s'expliquerait par la présence d'un site d'activation très large et très flexible (38 ; 39).

De très nombreuses études actuelles se penchent sur le problème de la spécificité de substrat et sur les caractéristiques catalytiques de CYP 3A4. Le CYP 3A4 est une enzyme très complexe et le modèle d'interaction est substrat dépendant (40).

CYP 3A4, 5, 7			
SUBSTRATS		INHIBITEURS	INDUCTEURS
Macrolides : Clarithromycine Erythromycine (pas 3A5)	Inhibiteurs HMG CoA : Atrovastatine Cérvastatine Lovastatine Simvastatine ⇒PAS pravastatine	Amiodarone Cimétidine Ciprofloxacine Clarithromycine Diéthyl-dithiocarbamate Erythromycine Fluconazole Fluvoxamine Gestodène Jus de fruits Itraconazole Kétoconazole Nelfinavir Norfluoxétine Mibefradil Ritonavir Troleandomycine	Barbituriques Carbamazépine Glucocorticoïdes Phénobarbital Phénytoïne Rifampicine Troglitazone
Anti-arythmiques : Quinidine (pas 3A5)			
Benzodiazépines Alprazolam Diazépam Midazolam Triazolam	stéroïdes 6β-OH : Hydrocortisone Progesterone Testostérone Cisapride Alfentanyl Buspirone Caféine Cocaïne		
Immunomodulateurs Cyclosporine Tacrolimus (FK 506)			
Antiprotéases : Indinavir Ritonavir Saquinavir	Dapsone (en partie) Codéine N-déméthylation Dextrométhorphane Fentanyl Lidocaïne (en partie) Odensétron (en partie) Propanolol ?		
Antihistaminiques : Astémizole Chlorphéniramine	Salmétérol Sildénafil Taxol (en partie) Terfénadine Trazodone		
Inhibiteurs calciques : Diltiazem Félodipine Lercanidipine Nifédipine Nisoldipine Nitrendipine Vérapamil	Méthadone		

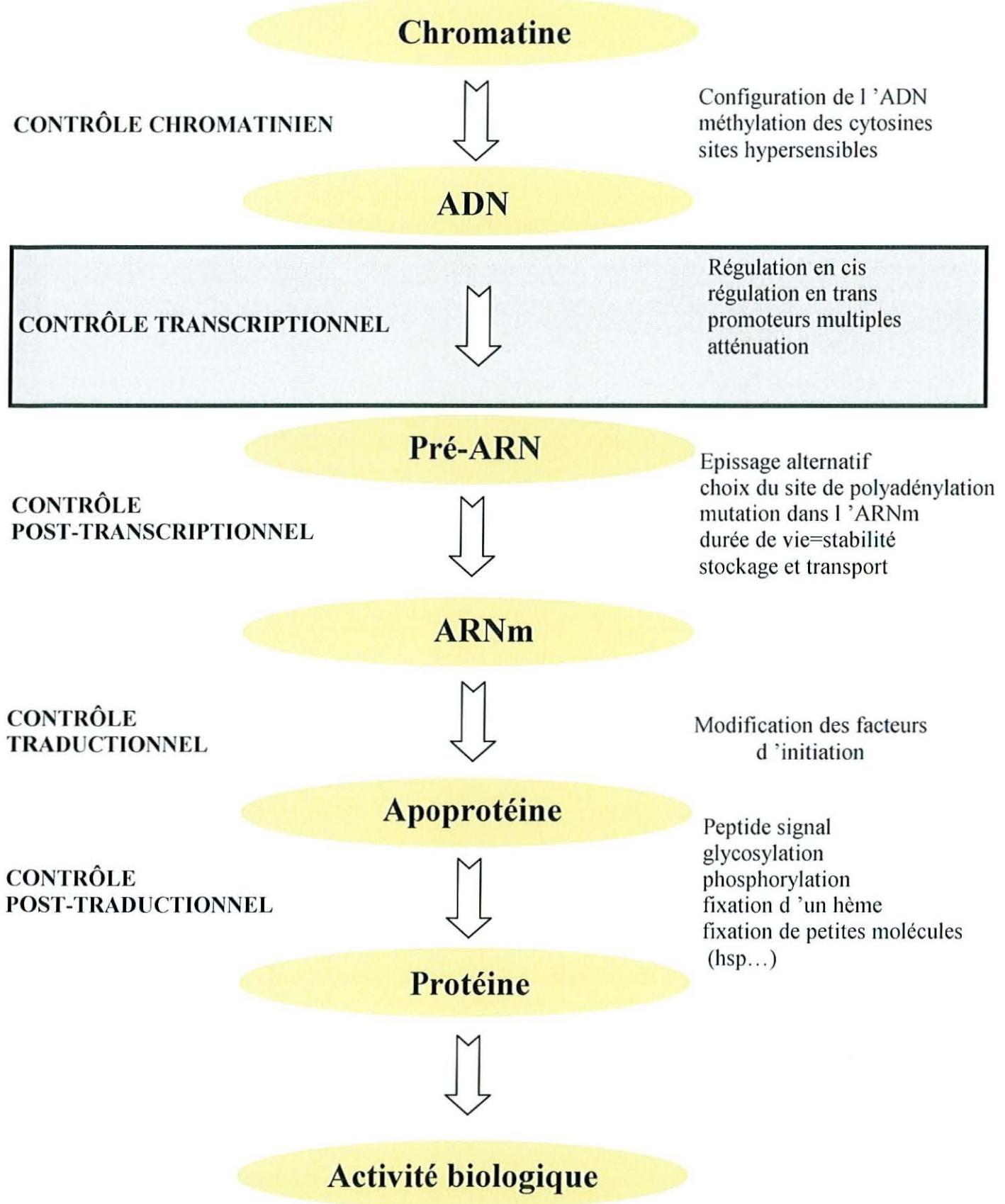
Tableau VII : Substrats, inhibiteurs et inducteurs de CYP 3A4, 5, 7

2 *Induction des cytochromes P450*

Les activités des cytochromes sont modulées, par induction ou inhibition, sous l'influence de différents facteurs physiologiques, pharmacologiques, toxiques ou pathologiques.

Les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression de leurs gènes se situent à des niveaux transcriptionnels, post-transcriptionnels ou post-traductionnels (41).

Ainsi, l'induction des cytochromes résulte soit, d'une stabilisation et/ou d'une diminution de la dégradation du cytochrome ou de son ARNm soit, **pour la plupart des cytochromes d'une activation transcriptionnelle au travers de mécanismes complexes faisant intervenir des récepteurs cytosoliques ou nucléaires.**



Régulation de l'expression génique

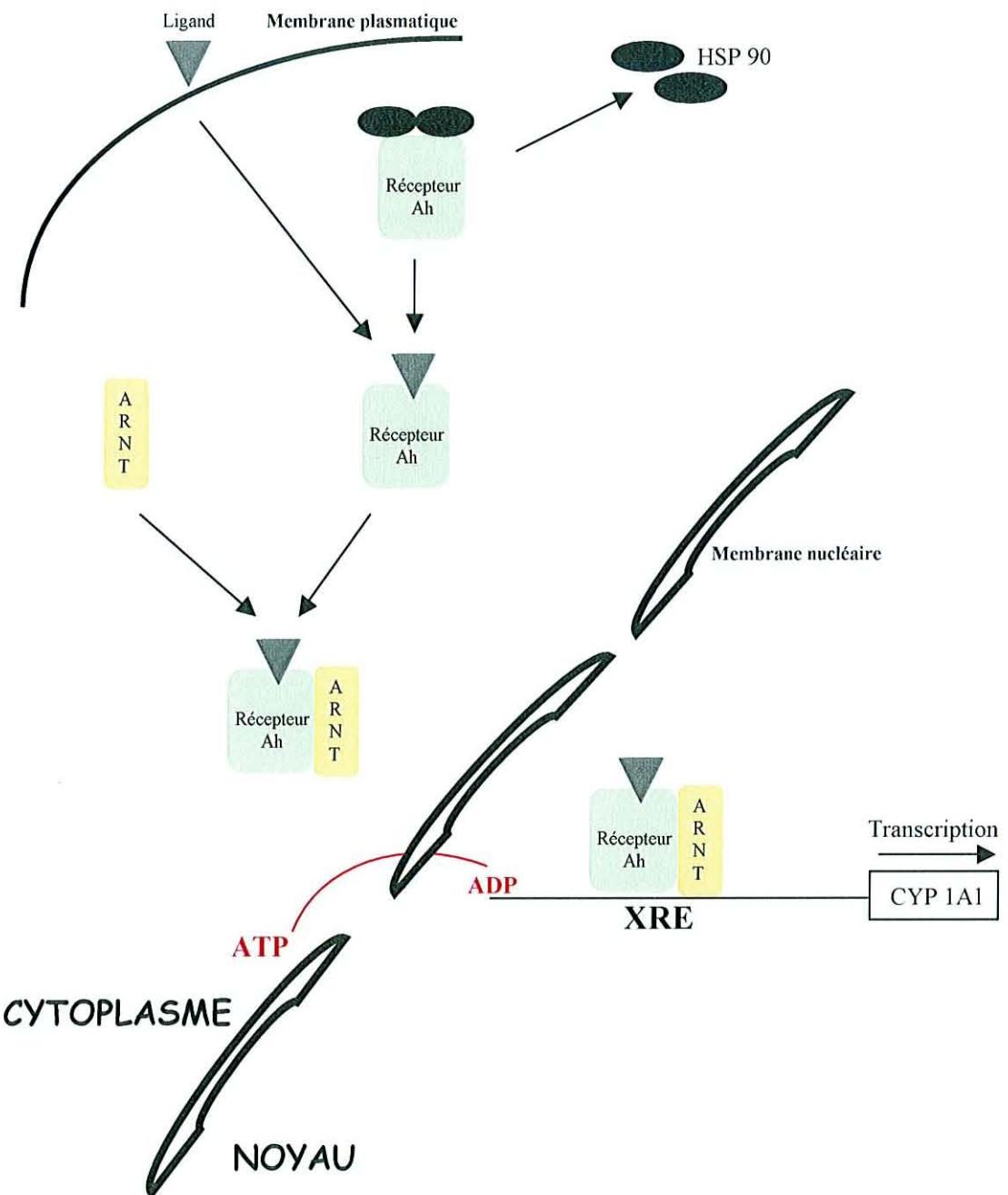
2.1 Généralités

Le récepteur cytosolique Ah (récepteur aryl hydrocarboné) ou récepteur à la dioxine est actuellement le seul récepteur cytosolique impliqué dans les inductions. Il appartient à la famille des PAS (Per AhR Arnt Sim) des facteurs de transcription et induit les cytochromes P450 de la famille 1A et certaines UGTs.

Ces principaux ligands sont : le TCDD (2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-p-dioxin), les méthylcholanthrènes et les hydrocarbures polycycliques aromatiques en général. Sa structure protéique est de type hélice-boucle-hélice.

Une fois activé par la fixation d'un de ses ligands dans le cytoplasme, il est ensuite transloqué dans le noyau à l'aide d'une seconde protéine dite ARNT (Ah Receptor Nuclear Translocator) pour se lier à une séquence de réponse consensus XRE (Xenobiotic Responsive Element), présente dans le promoteur du gène de la protéine induite (42).

La régulation fine de ce mécanisme fait aussi appel à des protéines de stress (hsp 90) et à des mécanismes de phosphorylation par des kinases de type PKC ou PKA.



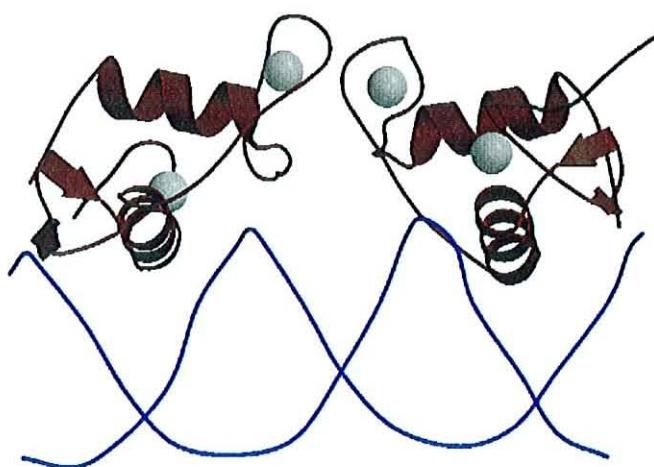
Activation du récepteur Ah

Les récepteurs nucléaires sont quant à eux répartis en quatre classes (43) :

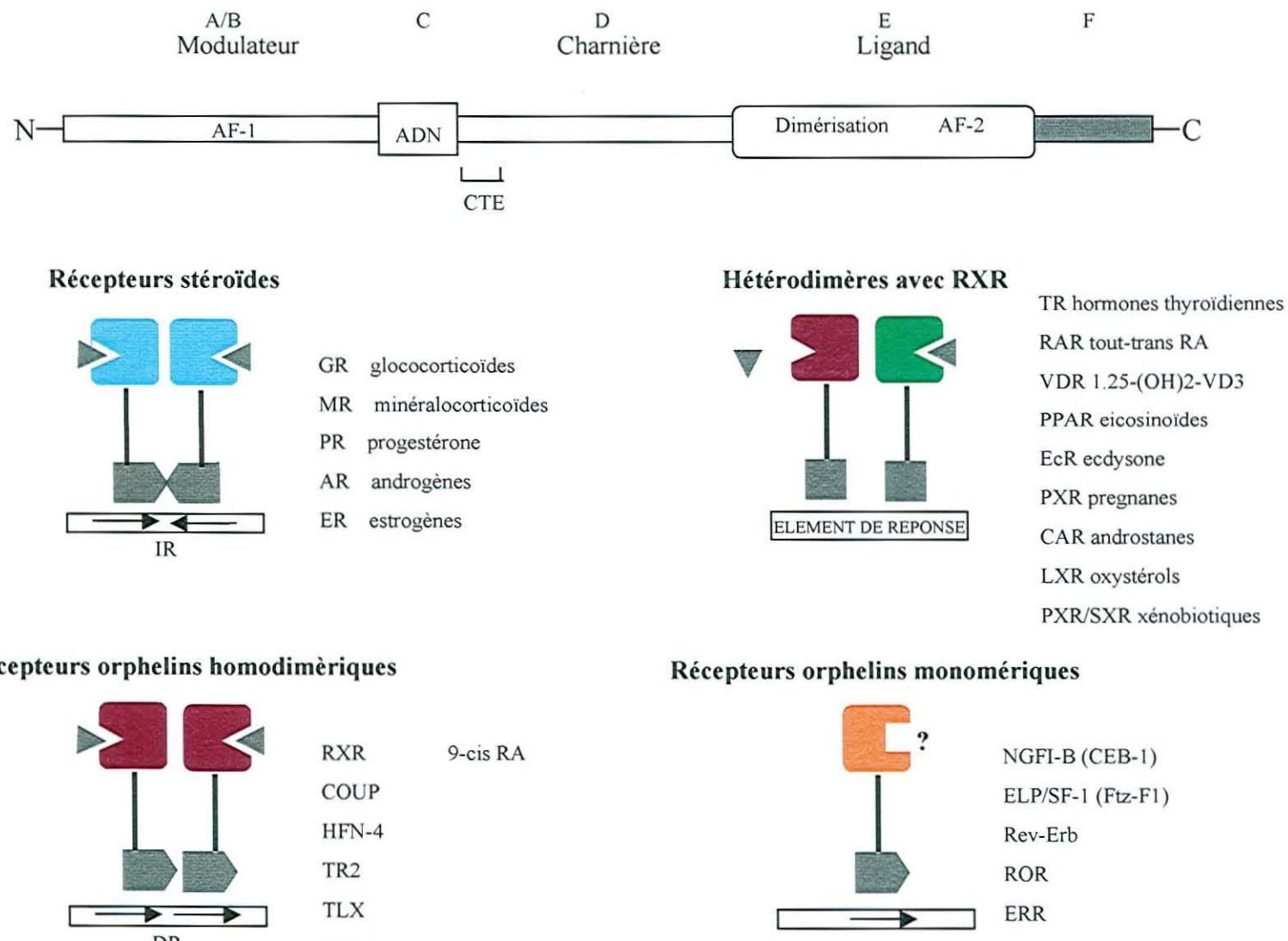
- (1) Les récepteurs aux hormones stéroïdes, associés en homodimères
- (2) Les récepteurs formant des hétérodimères avec RXR (Retinoïd X Receptor) et fonctionnant de façon ligand-dépendante.
 - ✓ Le récepteur CAR, récepteurs aux androstanes constitutifs, répondant à l'induction par le phénobarbital et mis en jeu par l'induction des CYP 2B.
 - ✓ Le récepteur PPAR (récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes) activé par les fibrates, il déclenche l'induction des hydroxylases d'acides gras (induction CYP 4).
 - ✓ Le récepteur PXR (Prégnane X Receptor), également appelé PAR ou SXR
- (3) Les récepteurs dits orphelins fonctionnant en homodimères.
- (4) Les récepteurs monomériques.

Ils possèdent tous des caractéristiques structurales communes, à savoir :

- Un domaine central de liaison à l'ADN nommé DBD (DNA Binding Domain).



Structure tridimensionnelle du DNA Binding domain
L'atome de Zinc est en mode CPK



La super-famille des récepteurs nucléaires (d'après Olefsky, 2001)

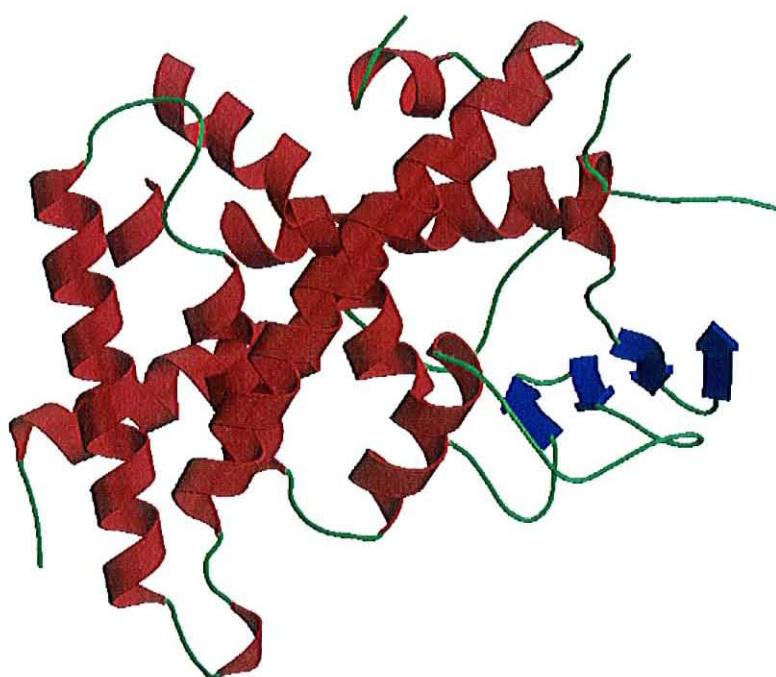
Ce DBD se fixe sur un élément de réponse RE (Response Element).

L'élément de réponse étant formé de deux demi-sites pouvant être organisés en :

Tandems	$\rightarrow \rightarrow$	Direct Repeat (DR)
Tête-à-tête	$\rightarrow \leftarrow$	Invertead Repeat (IR)
Dos à dos	$\leftarrow \rightarrow$	Evertead Repeat (ER)

Ces deux demi-sites étant séparés d'un nombre variable de nucléotides.

- Un domaine de liaison du ligand nommé LDB (Ligand Binding Domain) s'étendant sur la partie C-terminale du récepteur. La fixation du LDB à ses ligands spécifiques hormonaux ou non conduit à une réponse biologique spécifique.

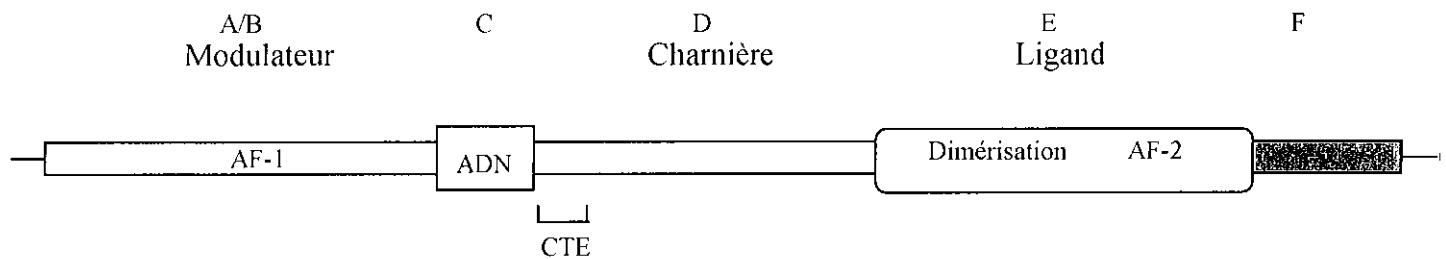


Structure tridimensionnelle du Ligand Binding Domain

De même leur organisation structurale est similaire. Cinq domaines de liaison sont définis : une région N-terminale [A,B] suivie d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD) [C] caractérisé par deux motifs en doigts de zinc de type C4 (c'est à dire constitué de 4 cystéines), d'une région de liaison [D] et d'un domaine de liaison au ligand (LDB) [E] de structure complexe, le plus souvent formé de 12 hélices α et d'un tour β .

Certains récepteurs nucléaires possèdent également une région [F] de fonction inconnue.

D'autre part, ces récepteurs nucléaires possèdent également deux fonctions d'activation de transcription. L'une située dans la région N-terminale nommée AF-1 est constitutionnellement active, et l'autre située au niveau du LDB nommée AF-2 et dont l'activation est ligand dépendante.



Organisation structurale des récepteurs nucléaires : cinq domaines de liaisons

L'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires est modulée par des co-régulateurs : co-activateurs ou co-répresseurs.

Les co-activateurs permettent une activation de la transcription médiée par les récepteurs liés à leur ligand. Les co-répresseurs entraînent une répression de la transcription en absence de ligand.

Cette régulation transcriptionnelle nécessite la présence de facteurs généraux de transcription (FGT : TFIIB, TBP, TAFII), ainsi que de multiples activités enzymatiques (acétylases, déacétylases, kinases, ATPases, ligases et protéases). Les FGT pouvant interagir avec les co-activateurs.

Cette voie d'induction médiée par les récepteurs nucléaires interfèrent, de façon complexe et encore incomplètement connu, avec d'autres voies de régulation endogènes faisant intervenir des cytokines, des facteurs de croissance et des hormones endogènes.

2.2 Cas particulier de CYP 3A

La récente découverte et la caractérisation du récepteur PXR (PAR ou SXR), récepteur orphelin, ainsi que la mise en évidence de son implication dans la régulation du CYP 3A, ont permis une meilleure compréhension du métabolisme des xénobiotiques et la caractérisation moléculaire de certaines interactions médicamenteuses (25). Plusieurs observations convergent vers l'implication du PXR dans l'induction de la transcription du gène *CYP 3A* :

- D'une part, le récepteur PXR est majoritairement exprimé dans les tissus hépatiques et intestinaux, principaux lieux d'induction du *CYP 3A*,
- D'autre part, le récepteur PXR se fixe en tant que hétérodimère avec le récepteur RXR à un élément de réponse sur le promoteur du gène *CYP 3A*,
- Enfin, le récepteur PXR est activé par des composés connus comme inducteurs du *CYP 3A*.

Les ligands du récepteur PXR sont de tailles très différentes du fait de la présence d'une boucle flexible dans son site LDB pouvant s'adapter à chaque molécule (44). Les ligands endogènes du récepteur PXR sont des prégnanes ou analogues des prégnanes.

Le récepteur PXR peut aussi être faiblement activé par d'autres stéroïdes tels que la corticostérone, la dihydrotestostérone, l'estradiol à doses supraphysiologiques.

Différents xénobiotiques sont impliqués dans l'activation du récepteur PXR et dans l'induction du CYP 3A : rifampicine, PCN, lovastatine, trans-nonachlor, clotrimazole, RU-486, phénobarbital, SR12813 (ester biphosphonate).

Le récepteur PXR agit sous forme d'hétérodimère avec le récepteur RXR. Cette hétérodimérisation augmente l'affinité du dimère pour son élément de réponse à l'ADN.

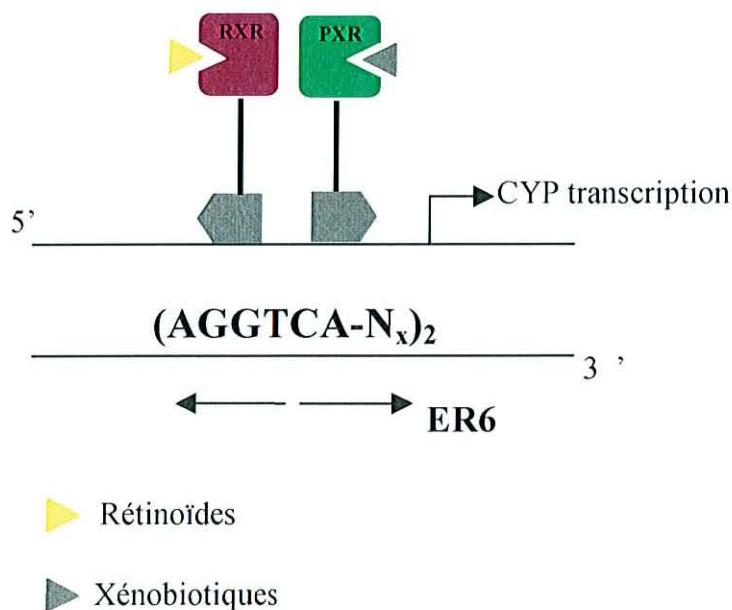
Il existe trois formes de récepteurs RXR : RXR α présents au niveau des tissus hépatiques, rénaux et cutanés, RXR γ présents dans les tissus musculaires et cardiaques, et le récepteur RXR β qui est ubiquitaire.

Le récepteur RXR peut agir sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère. L'acide rétinoïque 9-cis (AR 9-cis) est le ligand de RXR. RXR peut jouer le rôle d'un partenaire silencieux, dans ce cas la dimérisation supprime sa capacité à se fixer à l'AR 9-cis ainsi que son activité de transcription AF-2. Ou bien, RXR joue le rôle d'un partenaire actif et dans ce cas

l'hétérodimère peut être à la fois activé par l'AR 9-cis ou par le ligand du 2^{ème} récepteur, c'est généralement le cas des récepteurs orphelins : RXR/NGF1-B, RXR/LXR, RXR/FXR, RXR/PPAR (45 ; 46 ; 47).

L'hétérodimère PXR-RXR se fixe par le DBD à un élément de réponse spécifique situé au niveau du promoteur du gène cible.

Récepteurs PXR-RXR



Cet élément de réponse (RE) est composé de deux copies du motif TGA(A/C)CT.

L'orientation et l'espacement des copies du motif sont caractéristiques du récepteur nucléaire et de l'espèce.

Chez l'homme, l'élément de réponse à l'ADN est une séquence ER6, le motif TGA(A/C)CT étant séparé par 6 nucléotides.

Hashimoto *et coll*, 1993 ont comparé les séquences des gènes *CYP 3A4* et *CYP 3A7*. La similitude de ces deux gènes au niveau de leur séquence ER6 permet d'affirmer que les deux promoteurs répondent de façon similaire aux inducteurs. Les régions 5' flanquantes de *CYP 3A4* et de *CYP 3A7* présentent en effet 91% d'homologie (48).

CYP 3A4 :TGAAC TcaaaggAGGTCA
CYP 3A7 :TTAAC TcaatggAGGTCA

Séquences ER6 des *CYP 3A4* et *CYP 3A7*

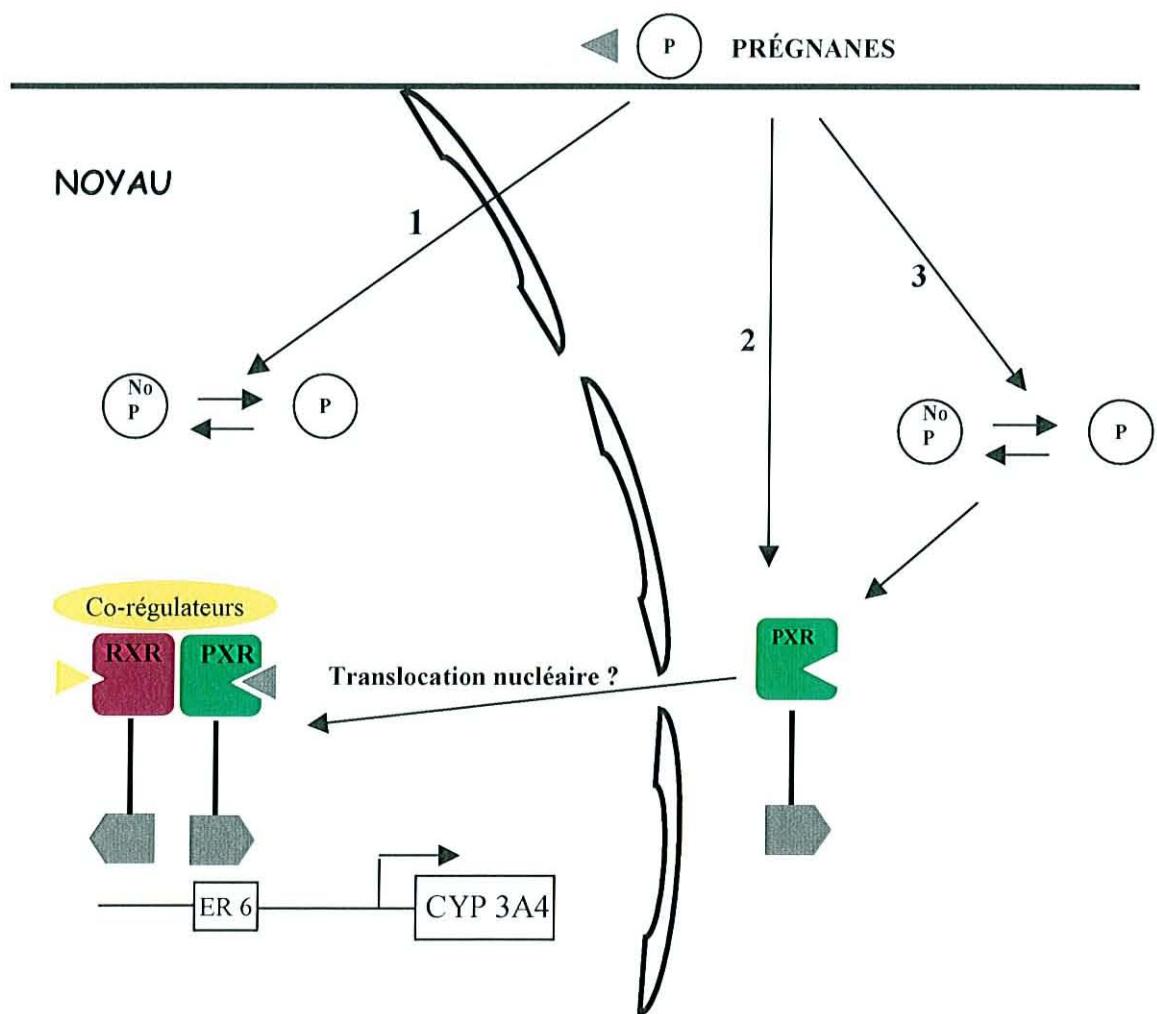
Le CYP 3A7 sera particulièrement utilisé dans les études d'induction. En effet, CYP 3A7 est exprimé et inducible dans les cellules HepG2 (49), modèle cellulaire très souvent utilisé dans les études du métabolisme du médicament.

Chez le rat, l'élément de réponse à l'ADN est une séquence DR3, le motif étant séparé de 3 nucléotides.

La fixation de l'hétérodimère sur l'élément de réponse, le recrutement de facteurs généraux de transcription et d'activités enzymatiques multiples vont permettre une activation de la transcription de CYP 3A, soit une induction de CYP 3A.

D'autre part on note que SXR/PXR induit l'expression du gène MDR 1 (Multiple Drug Resistance), MDR 1 codant pour un transporteur protégeant la cellule contre la xénotoxicité et facilitant l'élimination rapide des drogues (50).

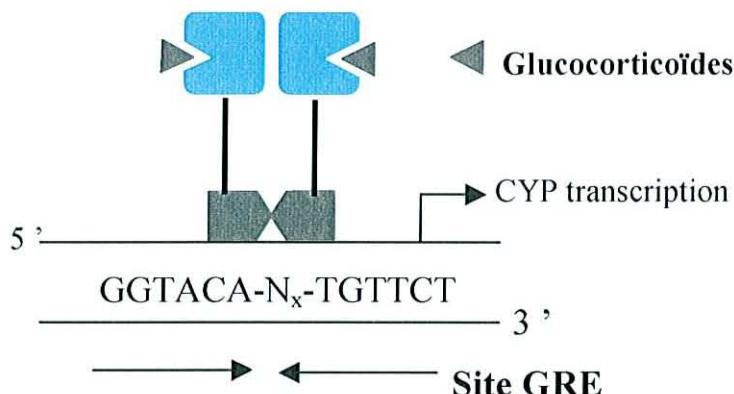
SXR (PXR) joue donc à la fois un rôle dans le métabolisme des drogues, en induisant CYP 3A, mais aussi dans l'élimination de celles-ci, en induisant MDR 1.



Induction de *CYP 3A4*

2.3 Implication du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'induction de CYP 3A.

Récepteurs aux glucocorticoïdes



Le récepteur aux glucocorticoïdes GR est exprimé de façon plus ou moins identique dans tous les tissus. Il agit sous forme d'homodimère et une fois lié à son ligand, subit des modifications structurales, est transloqué dans le noyau où il reconnaît le gène cible. GR se fixe alors sur un élément de réponse aux glucocorticoïdes GRE, séquence palindromique imparfaite.

La plupart des promoteurs régulés par les glucocorticoïdes contiennent d'autres éléments cis de régulation.

Le type de GRE et l'environnement du promoteur influencent la nature des co-régulateurs (co-activateurs ou co-répresseurs) recrutés. Ainsi la régulation transcriptionnelle par le GR varie en fonction du promoteur et du type cellulaire.

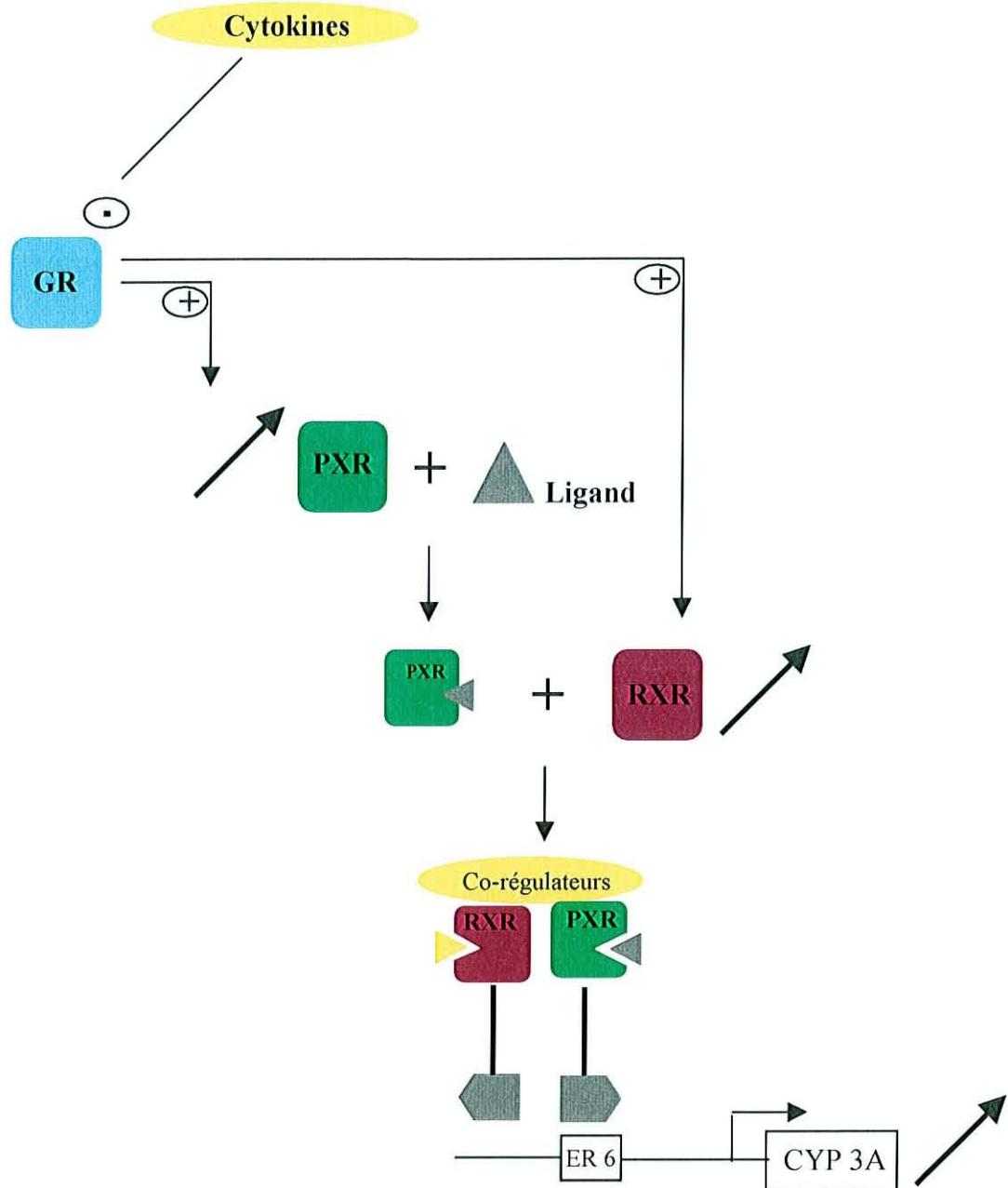
Plusieurs co-facteurs, hsp 90 (heat shock proteins), kinases, HMG (High Mobility Group proteins) et autres facteurs de transcription contrôlent ces différentes étapes.

Les rôles majeurs immunosuppressifs et anti-inflammatoires des glucocorticoïdes sont dus à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des facteurs nucléaires NF-xB (hétérodimère p65/p50) et AP-1 (hétérodimère JUN/FOS) par activation du GR (51 ; 52).

Dans une étude récente, Pascussi *et coll* (2000) relient le récepteur GR à l'induction de CYP 3A et à ses conséquences sur le métabolisme de certains médicaments :

La dexaméthasone à doses supraphysiologiques active le récepteur PXR. Elle augmente l'expression du CYP 3A (27, 105).

Le récepteur aux glucocorticoïdes serait donc impliqué dans l'augmentation de l'expression de CYP 3A. Il est peu probable que cette implication soit directe. En effet, le récepteur GR induit la synthèse des récepteurs PXR et RXR α qui sont eux-mêmes des activateurs de la transcription de *CYP 3A*. GR active donc la transcription de *CYP 3A* par l'intermédiaire des récepteurs RXR et PXR. Cette induction est réprimée lors d'une inflammation et lors d'une infection. En effet, les phénomènes inflammatoires et infectieux entraînent la production de cytokines, d'IL6 et de TNF (Tumor Necrosis Factor), eux-mêmes favorisant l'activation de la transcription de proto-oncogènes c-jun et c-fos qui régulent négativement l'action de GR.



Implication des récepteurs GR dans l'induction de *CYP 3A*

2.4 Implication du récepteur CAR (Constitutively Activated Receptor) dans l'induction de Cyp 3A.

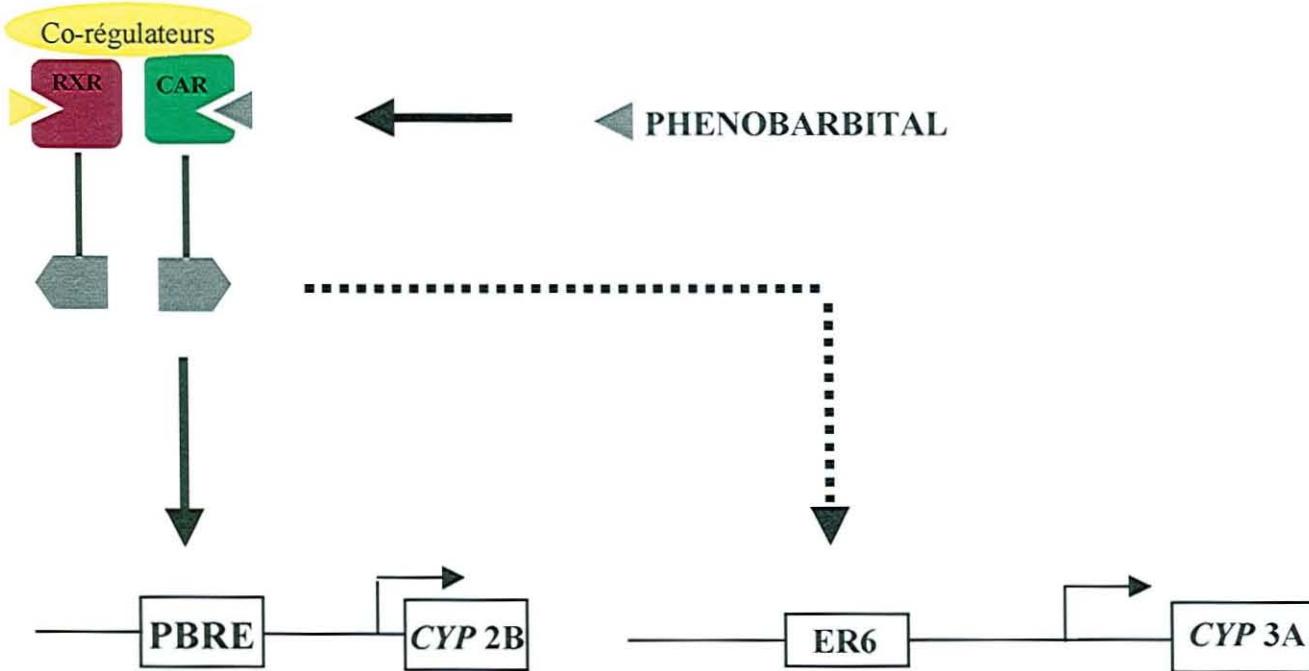
Le récepteur CAR appartient à la famille des récepteurs nucléaires orphelins. Comme PXR, il forme un hétérodimère avec le récepteur RXR et possède une spécificité de ligand selon l'espèce. Par contre le récepteur CAR possède deux catégories de ligands : les dérivés de l'androstane, androstanol et androstenol d'une part, et le phénobarbital d'autre part.

Aussi Forman *et coll.*, 1998 démontre que le récepteur CAR est un récepteur constitutif aux androstanes maintenant ce récepteur inactif. En effet, les dérivés de l'androstane inhibent la transactivation du récepteur CAR en interférant avec ses co-activateurs. Par contre, androstanol et androstenol n'influencent pas la formation de l'hétérodimère RXR-CAR, ni la fixation de l'hétérodimère à l'ADN (53).

Par ailleurs, le phénobarbital lève cette inhibition et augmente le recrutement des co-activateurs. Le récepteur CAR se fixe alors sur le PBRE, élément de réponse au phénobarbital présent dans le promoteur des gènes *CYP 2B*.

Aujourd'hui, des études récentes nous montrent qu'il existe un lien entre les voies de régulation des récepteurs PXR, CAR et de leurs gènes cibles. On parle de reconnaissances croisées entre les différents éléments de réponse.

Le récepteur PXR reconnaît le PBRE et peut ainsi contrôler l'induction de *CYP 2B* (28). De la même façon, le récepteur CAR reconnaît l'élément de réponse ER 6 du récepteur PXR et peut ainsi induire *CYP 3A* (105).



Implication du récepteur CAR dans l 'induction de *CYP 3A*

Chapitre 2

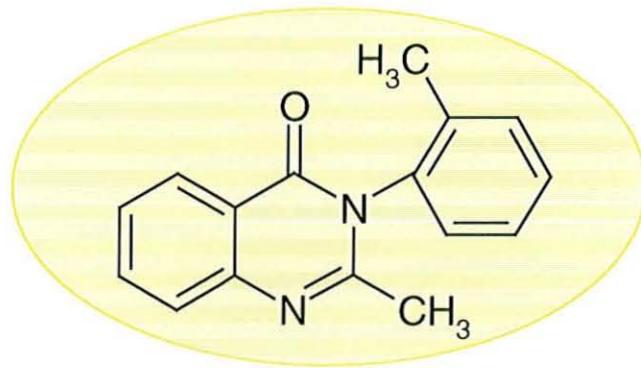
LES MEDICAMENTS MIS EN JEU

Les médicaments mis en jeu

(D'après la BIAM, Banque de Données Automatisée sur les Médicaments) (54)

1 La méthqualone

1.1 Présentation



La méthqualone est le méthyl-2(O-Tolyl)dihydro-3, 4 quinazolinone-4.

Chapitre 2

La méthqualone fut commercialisée en France sous le nom de MANDRAX® en association à la diphenhydramine. Aujourd’hui, elle reste commercialisée dans de nombreuses spécialités étrangères comme seul principe actif. La Suisse quant à elle, continue à utiliser la méthqualone associée à la diphenhydramine dans la spécialité TOQUILONE compositum®.

La méthqualone figure au registre des stupéfiants. Sa durée de prescription peut dépasser 7 jours mais est limitée à 28 jours (JO 14.02.98).

La méthqualone est utilisée dans l’insomnie du fait de ses propriétés psycholeptique et hypnogène.

SPECIALITES

Principe actif présent en association dans les spécialités suivantes :

- MANDRAX comprimés (arrêt de commercialisation)(France)
- TOQUILONE compositum (Suisse)

Principe actif présent en constituant unique dans les spécialités étrangères suivantes :

- BENDOR (Suisse)
- MELSEDIN (Angleterre)
- MEQQVELON (Autres pays)
- MOTOLON (Autres pays)
- MOZAMBIN (Autriche)
- NORMI-NOX (Allemagne, Suisse)
- OBLIOSER (Italie)
- QUAALUDE (USA)
- REVONAL (Belgique, Pays-Bas, Allemagne, Suisse, Italie)
- SEDAQUIN (Angleterre)
- SOMNOMED (Suisse)
- SOPOR (USA)

1.2 Mécanisme d'action.

Son action anxiolytique s'exerce par un effet inhibiteur au niveau sous cortical et son action sédatrice par dépression du cortex moteur.

La méthqualone déprime sélectivement le réflexe polysynaptique par blocage des interneurones médullaires conduisant à un effet myorelaxant.

1.3 Effets secondaires.

On note le plus fréquemment une somnolence, des réveils difficiles, des céphalées, des vertiges, mais aussi une grande nervosité avec tremblements.

Il existe également un risque d'hypotension artérielle par effet dépresseur du myocarde. De plus, quelques cas de bromidrose et de dyschromatopsie ont été signalés. Par ailleurs, de rares cas d'éruptions cutanées ont été constatés lors d'association avec la diphenhydramine.

A doses suprathérapeutiques et en association avec l'alcool éthylique, la méthqualone peut amener à une toxicomanie, d'où son inscription à la liste des stupéfiants. D'ailleurs après prise de doses croissantes, un syndrome de sevrage avec possibilité de delirium tremens ou de convulsions est certain. Le risque de pharmacodépendance est également majoré lorsque la méthqualone est associée à la diphenhydramine.

1.4 Précautions d'emploi.

- Insuffisance respiratoire chronique,
- Insuffisance rénale sévère,
- Insuffisance cardiaque.

1.5 Contre indications.

- Grossesse : l'utilisation de la méthqualone est contre indiquée au cours de la grossesse par manque d'information dans l'espèce humaine et suite à l'effet tératogène existant chez l'animal.
- Enfant de moins de 7 ans,
- Insuffisance hépatique grave,
- Ethylisme : majoration des effets secondaires avec risque de toxicomanie,
- Epilepsie.

1.6 Posologie et mode d'administration.

La dose usuelle par voie orale ou rectale chez l'adulte est de 100 à 250mg/j en plusieurs prises.

Il est nécessaire de prévenir le patient du risque de somnolence et de la potentialisation de cet effet secondaire par l'alcool.

Le risque de pharmacodépendance et de toxicomanie doivent être évités par des traitements de courte durée ou des traitements intermittents.

Il convient de diminuer les doses en cas d'insuffisance hépatique ou rénale.

1.7 Pharmacocinétique.

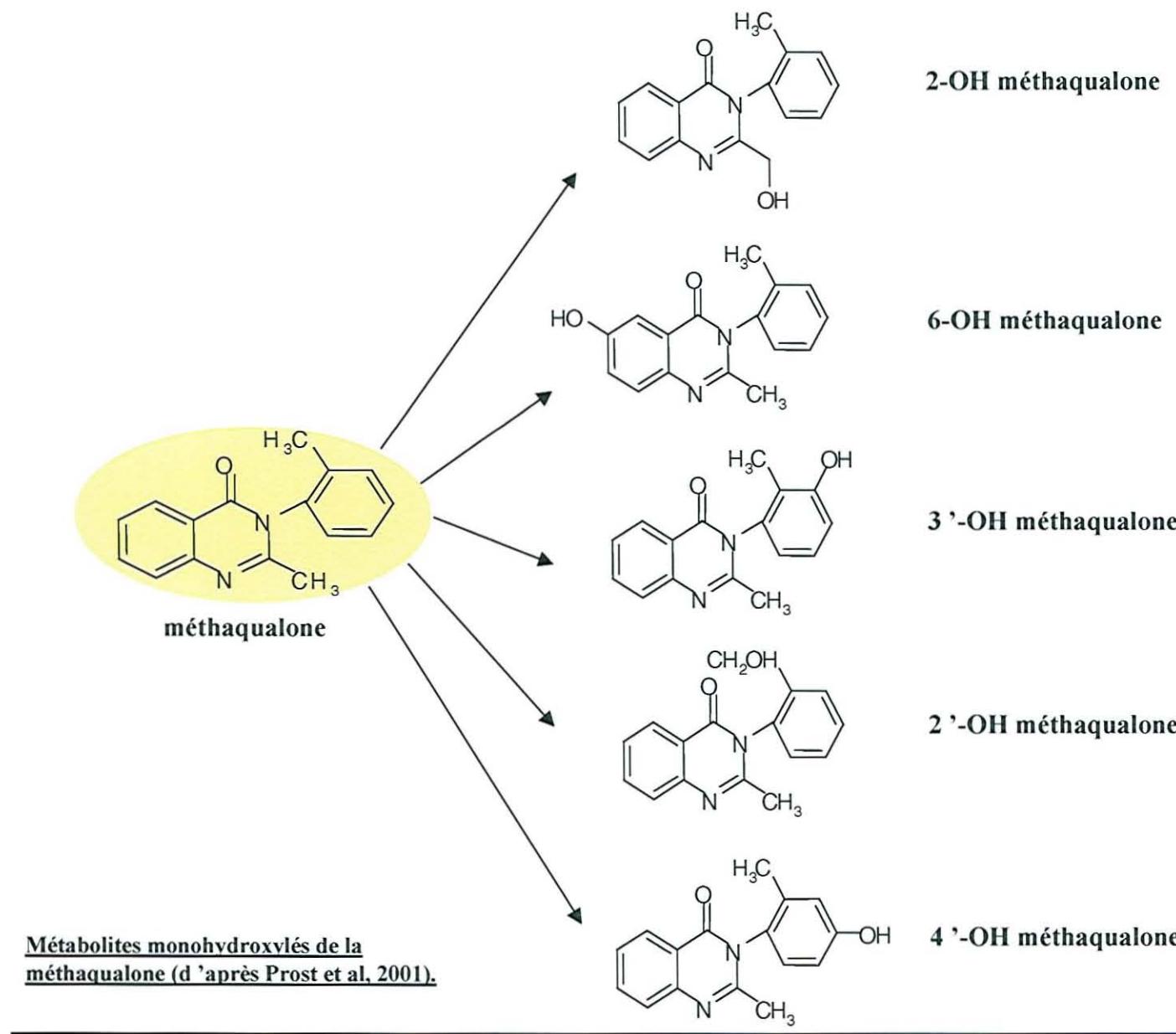
Après prise orale, 99% de la dose ingérée est résorbée en 2 heures. La liaison aux protéines plasmatiques est de 80% environ. La méthqualone se fixe au niveau des tissus hépatiques, cérébraux et adipeux. Ses métabolites inactifs peuvent passer dans le lait. Sa demi-vie est de 30 heures.

Métabolisme de la méthqualone (d'après the Analytical Profiles Of Drug Substances Vol 4) (55) :

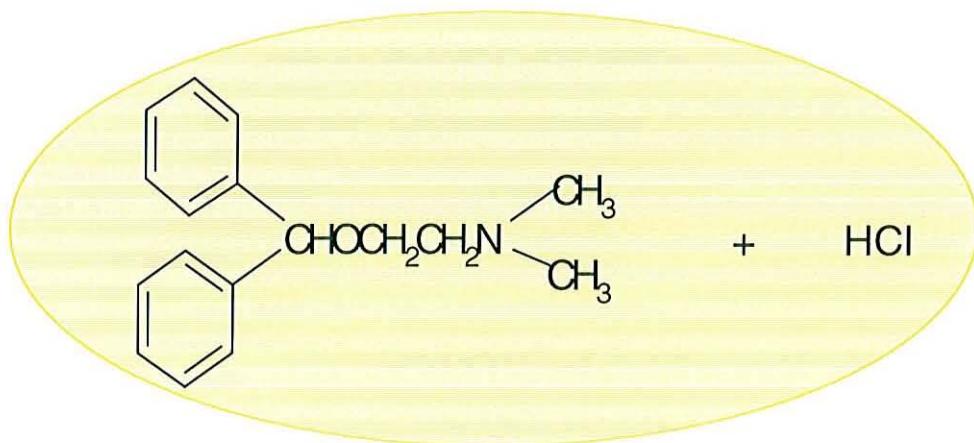
La méthqualone est métabolisée par des oxydoréductases microsomales hépatiques. L'hydroxylation des substituants 2 et 2' méthyl de la chaîne latérale toyl et du noyau quinazolène conduit au métabolite principal monohydroxylé.

Une conjugaison avec l'acide glucuronique et une O-méthylation ont lieu avant excrétion des métabolites dans la bile et les urines. L'ouverture du cycle, impliquant la formation du N-1-oxide et du 2-nitrobenzo-o-toluidide, est une voie métabolique mineure. Il existerait une auto-induction du métabolisme.

L'élimination par voie rénale se fait essentiellement sous forme de glucuronide (98%) et de sous forme libre (2%). Par voie fécale, l'élimination a lieu après un cycle entéro-hépatique.



2 La diphenhydramine.



La diphenhydramine est le chlorhydrate d'alpha-(2-diméthylaminoéthoxy)diphénylméthane.

SPECIALITES

Principe actif présent en constituant unique dans les spécialités françaises suivantes :

- BENYLIN 0.28% sirop (arrêt de commercialisation)
- BUTIX 2% gel pour application locale

Principe actif présent en association dans les spécialités françaises suivantes :

- ACTIFED JOUR ET NUIT comprimés
- MANDRAX comprimés (arrêt de commercialisation)

Principe actif présent en constituant unique dans les spécialités étrangères :

- ALLERGAN (Italie)
- ALLERGINA (Italie)
- BARAMINE (USA)
- BELDIN (USA)
- BENADRYL (Belgique, Pays-Bas, Angleterre, Suisse, Espagne, USA, Allemagne)
- BENOCTEN (Suisse)
- BENODINE (Pays-Bas)
- DERMODRIN (Autriche)
- DIBADORM (Allemagne)
- DIFENIDRAMINA (Italie)
- HISTAXIN (Autriche)
- PELLISAL-GEL (Allemagne)
- PHERAMIN (Allemagne)
- SEKUNDAL-D (Allemagne)
- SELODORM (Allemagne)

Principe actif présent en association dans les spécialités étrangères :

- **TOQUILONE @compositum** (Suisse)

2.1 Indications thérapeutiques.

Le chlorhydrate de diphenhydramine est principalement indiqué dans :

- la réaction allergique : traitement symptomatique et prophylactique des réactions cutanées et muqueuses de l'hypersensibilité immédiate,
- la toux : traitement symptomatique des toux non productives,
- dans le vomissement,
- dans le mal des transports.

2.2 Mécanisme d'action.

Principal :

La diphenhydramine exerce son action antihistaminique par antagonisme compétitif de l'histamine au niveau des récepteurs, d'où inhibition de la plupart des actions de l'histamine : hypotension, action sur les fibres lisses intestinales et bronchiques, action sur la perméabilité capillaire, effet stimulant sur la médullosurrénale, phénomènes allergiques et anaphylactiques.

L'action antihistaminique est plus marquée en usage préventif qu'en usage curatif.

La diphenhydramine ne modifie pas l'action de l'histamine sur les glandes exocrines.

La diphenhydramine agit sur le système nerveux autonome et semble inhiber les phénomènes de capture des catécholamines.

Secondaires :

La diphenhydramine possède :

- Une action dépressive sur le système nerveux central, de mécanisme inconnu,
- Une action hypnotique avec diminution du sommeil paradoxal,
- Une action antiémétique par inhibition au niveau des chémorécepteurs de la trigger zone, de mécanisme inconnu,
- Une action anesthésique locale : stabilisant de la membrane cellulaire,
- Une action anti-inflammatoire pendant la phase exsudative de l'inflammation.

2.3 Effets secondaires.

Les effets secondaires les plus fréquents sont la somnolence et la sédation avec réduction des performances psychointellectuelles.

2.4 Grossesse, effets sur la descendance.

Il existerait une augmentation significative des becs de lièvres et autres embryopathies chez les nouveau-nés de mère ayant pris de la diphenhydramine pendant la grossesse. D'autre part, il existe un risque de syndrome de sevrage chez les nouveau-nés de mère ayant pris de la diphenhydramine dans les derniers jours de grossesse.

Un risque de dépression néonatale précoce peut survenir en cas d'association avec les barbituriques, les tranquillisants, les analgésiques centraux, surtout lors d'accouchements prématurés.

2.5 Précautions d'emploi.

- Conducteurs de véhicule / utilisateurs de machine : risque de somnolence.
- Insuffisance rénale sévère : il convient de laisser entre 2 prises un intervalle de 6 à 8 heures si la filtration glomérulaire est de 10 à 50 ml/mn, et de 9 à 12 heures si la filtration glomérulaire est inférieure à 10 ml/mn.
- Insuffisance hépatocellulaire sévère.
- Insuffisance respiratoire.
- Grossesse (durant les trois premiers mois).
- Allaitement.
- Déficit en G6PD (Glucose 6 phosphate déshydrogénase) : risque d'anémie hémolytique.
- Exposition au soleil.

2.6 Contre-indications.

- Adénome prostatique car risque de rétention aiguë des urines.
- Glaucome à angle fermé.
- Iléus paralytique.
- Sténose du pylore.
- Myasthénie.
- Etat de mal asthmatique.
- Bronchopneumopathie chronique obstructive.
- Hypersensibilité à cette substance.
- Association aux IMAO : augmentation de l'intensité et de la durée des effets anticholinergiques.
- Association à l'alcool.

2.7 Posologie et mode d'administration.

La diphenhydramine peut être administrée par voie orale, intraveineuse ou intramusculaire.
Il n'existe pas de forme injectable commercialisée en France.

2.7.1 Dose usuelle par voie orale :

Chez l'adulte :

75 à 200mg par jour répartis en 3 à 4 prises.

Dose maximale : 400mg/j.

Chez l'enfant de moins de 1 an :

6.25 mg à 12.5 mg 3 à 4 fois par jour.

Chez l'enfant de 1 à 5 ans :

12.5 à 25 mg 3 à 4 fois par jour.

Chez l'enfant de 6 à 12 ans :

25 à 50 mg 3 fois par jour.

2.7.2 Dose usuelle par voie intraveineuse lente ou intramusculaire profonde :

Chez l'adulte :

10 à 50 mg toutes les 4 heures
sans dépasser 100 mg/24h.

Chez l'enfant :

5 mg/kg/j en 4 prises.

2.8 Pharmacocinétique.

La résorption de la diphenhydramine au niveau du tube digestif est rapide. La concentration maximale de 80 à 160 $\mu\text{g/ml}$ est obtenue 2 à 4 heures après administration orale d'une unique dose de 100 mg. La concentration est maximale dans les poumons, la rate, les reins et le foie après 30 minutes. La liaison aux protéines plasmatiques est d'environ 70%. Sa demi-vie est de 5 à 8 heures.

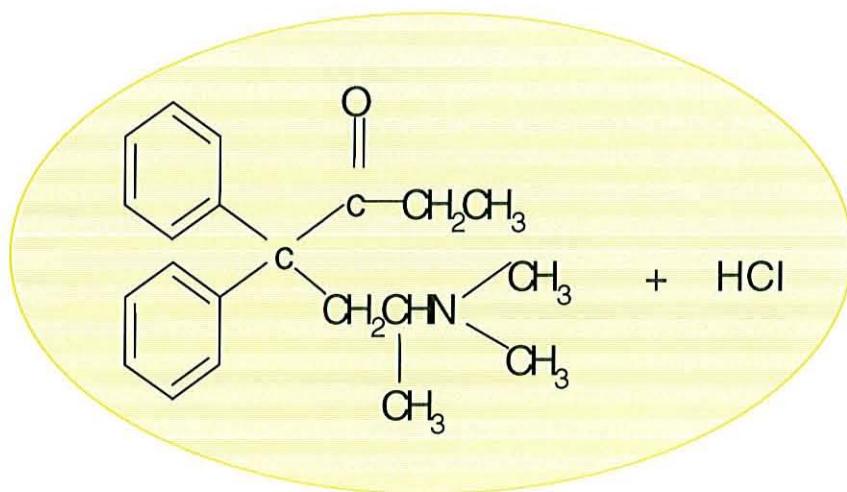
La diphenhydramine franchit la barrière hémato-encéphalique, la barrière foeto-placentaire et passe dans le lait (le rapport concentration du lait sur concentration plasmatique maternelle est inférieur à 1).

Métabolisme de la diphenhydramine (d'après the Analytical Profiles Of Drug Substances Vol 3)(56) :

Le métabolisme de la diphenhydramine étant CYP 2D6 dépendant, il existe des variations interindividuelles (57 ; 58). La diphenhydramine est capable d'inhiber son propre métabolisme (59). Au niveau hépatique, elle est hydrolysée en benzydrol et est ensuite conjuguée à l'acide glucuronique (95% de la dose ingérée est métabolisée). Elle est éliminée par voie rénale en grande partie sous forme de benzydrol glucuronoconjugué et en faible quantité sous forme libre. Environ 64 % d'une dose unique ingérée sont éliminés dans les 4 premiers jours.

3 La méthadone.

3.1 Présentation.



La méthadone, chlorhydrate de 6-diméthylamino-4,4 diphénylheptan-3-one a été introduite aux Etats-Unis au début des années 60, dans le cadre d'un programme de substitution à l'héroïne.

Le problème d'un traitement permettant de sortir de la toxicomanie aux opiacés existe depuis le développement de la morphinomanie à la fin du siècle dernier. Il a été et est abordé d'une manière très différente d'un pays à l'autre. Aussi, l'augmentation du SIDA depuis les trente dernières années a poussé les autorités de santé à s'intéresser davantage aux traitements de substitution et à optimiser le traitement par la méthadone afin de limiter l'accroissement de l'infection au sein des populations à risques (60).

Utilisée à titre expérimental en 1973 chez une cinquantaine d'héroïnomanes, la méthadone a été ensuite dispensée en France à un nombre limité de patients volontaires suivis dans des centres agréés. C'est en 1994 que la Pharmacie Centrale des Hôpitaux de Paris, alors seul producteur

français du sirop de chlorhydrate de méthadone, a constitué et déposé un dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) sous l'impulsion des pouvoirs publics. Cette AMM a été attribuée le 21 mars 1995. Elle précise notamment les modalités de prescription et de dispensation du sirop de chlorhydrate de méthadone présenté en récipients unidoses. Par la suite, la commercialisation a été reprise par les laboratoires Mayoly-Spindler.

3.2 Indications thérapeutiques.

Le libellé de l'indication officielle de la méthadone indique : « traitement de substitution de la toxicomanie aux opiacés dans le cadre des textes réglementaires » et non pas « traitements de sevrage ».

Un traitement de substitution consiste à remplacer l'usage d'un stupéfiant à haut risque (ici l'héroïne) par un médicament prescrit au long cours, durant des mois, afin de prévenir le syndrome de manque et de réduire le désir obsédant de la drogue.

Un traitement de sevrage implique au contraire un arrêt plus ou moins brutal. Il peut consister à prescrire un médicament ayant des propriétés pharmacologiques proches de la drogue initiale, et à réduire assez rapidement les doses pour arriver en quelques semaines à une abstinence totale, à la fois de la drogue et du médicament ayant aidé au sevrage.

La méthadone est aussi utilisée comme analgésique mais dans une moindre mesure que la morphine, la codéine ou la buprénorphine (61). Son utilisation dans la douleur des cancéreux reste à confirmer et nécessite une adaptation soigneuse et individuelle de la posologie par voie orale lorsque ce traitement remplace la morphine par voie orale.

La méthadone appartient au régime des stupéfiants. Sa prescription se fait sur ordonnance sécurisée pour une durée maximale de 14 jours avec délivrance fractionnée hebdomadaire obligatoire. La méthadone est soumise à une prescription initiale réservée aux médecins exerçant en centre spécialisé de soins au toxicomanes et nécessite une surveillance particulière pendant le traitement. Le relais peut ensuite être pris par un médecin de ville, en accord avec le médecin spécialisé et le patient.

3.3 Mécanisme d'action

La méthadone est un agoniste des récepteurs mu (récepteurs opioïdes). Ses activités analgésique et dépresseur respiratoire sont proches de celles de la morphine, mais ses activités sédatives, euphorisantes et constipantes sont plus faibles. Son affinité pour les récepteurs mu implique des problèmes de tolérances, tolérances croisées et de dépendance (62).

Les effets de la méthadone sont inhibés par le naloxone (NARCAN® et autres), antagoniste des récepteurs opiacés.

3.4 Effets secondaires.

Chez le sujet pharmacodépendant aux opiacés lors de la mise en place du traitement par la méthadone, les effets indésirables les plus fréquents sont l'euphorie, les vertiges, la somnolence, les nausées, les vomissements, la constipation, la sédation, l'hypersudation, la dysurie et l'œdème.

Chez le sujet pharmacodépendant aux opiacés traité par la méthadone en phase d'entretien, les effets indésirables les plus fréquents sont l'hypersudation, les nausées et la constipation.

Chez les sujets non dépendant aux opiacés, la méthadone entraîne les mêmes effets que tous les morphiniques. Les plus sévères étant la dépression respiratoire, l'hypotension sévère, l'arrêt respiratoire, le choc et l'arrêt cardiaque.

3.5 Grossesse / effets sur la descendance.

La méthadone traverse la barrière placentaire. La décision de l'utiliser chez la femme enceinte doit être prise en fonction du bénéfice /risque pour la mère et pour l'enfant.

En cours de grossesse, des doses plus importantes de méthadone sont parfois nécessaires pour l'équilibre du traitement.

Des mesures sont à prendre après l'accouchement pour prévenir, chez le nouveau-né, les effets d'un sevrage brutal en méthadone.

3.6 Précautions d'emploi.

- Insuffisance rénale : réduire la posologie et espacer les prises en fonction de la clairance de la créatinine.
- Insuffisance hépatique : diminuer la posologie (augmentation de la demi-vie de la méthadone).
- Sujet âgé : réduire la posologie
- Sportifs : substance interdite, JO du 7 mars 2000.
- Allaitement :
La méthadone passe dans le lait maternel, avec un rapport de concentration dans le lait/concentration plasmatique de l'ordre de 83%.
La décision d'allaitement dépend de l'évaluation du rapport bénéfice/risque pour l'enfant. La méthadone pourrait prévenir chez le nouveau-né la survenue d'un syndrome de sevrage consécutif à une imprégnation opiacée *in utero*. La méthadone ne poserait pas de problème pour des posologies chez la mère inférieures ou égales à 20mg/j.
- Grossesse :
La méthadone traverse la barrière placentaire avec des concentrations dans le liquide amniotique comparables à celles du sérum maternel.

3.7 Contre indications.

- Accouchement : risque de dépression respiratoire néonatale,
- Enfant de moins de 15 ans,
- Insuffisance respiratoire sévère : risque de dépression respiratoire,
- Hypersensibilité à cette substance.

3.8 Posologie et modes d'administration.

La méthadone peut être administrée par voie orale, sous-cutanée, intraveineuse ou épидurale.

Comme analgésique, la dose usuelle par voie orale ou sous-cutanée chez l'adulte est de 15 à 40 mg par jour en 3 ou 4 prises.

Dans le sevrage des héroïnomanes, la dose usuelle par voie orale est de 10 à 100 mg par jour en une ou plusieurs prises. L'administration de méthadone est effectuée en présence du corps médical. Lors de la mise en place du traitement, la première dose quotidienne est habituellement de 20 à 30 mg selon le niveau de dépendance physique et doit être administrée au moins 10 h après la dernière prise d'opiacés. La posologie sera ensuite augmentée de 10 mg par semaine jusqu'à une dose d'entretien, fonction de la réponse clinique. L'arrêt du traitement doit se faire par diminution progressive de la posologie, par paliers, au moins hebdomadaires, de 5 à 10 mg.

Pour les personnes âgées, il est recommandé de donner la plus petite dose possible, 5 mg trois fois par jour.

Dans le cas particulier des enfants, la posologie est de 0.2mg/kg de poids et un maximum de 10 mg toutes les 6 heures.

Remarque : la méthadone administrée par voie sous-cutanée est environ deux fois plus efficace que par voie orale.

3.9 Pharmacocinétique

La méthadone est un mélange racémique liposoluble.

Du fait de son caractère liposoluble, la méthadone administrée par voie orale est bien absorbée par le tube digestif. Sa biodisponibilité par voie orale est voisine de 70%. La méthadone subit un effet de premier passage hépatique. Le pic plasmatique est obtenu 1 à 5 heures après la prise orale. Le pic dans le cerveau est obtenu 1 à 2 heures après injection sous-cutanée ou intra musculaire, corrélé avec la durée et l'intensité de l'analgésie.

La méthadone possède une très large distribution tissulaire du fait de sa lipophilie (63).

Chapitre 2

Les concentrations tissulaires en méthadone (foie, poumon, reins) sont supérieures à la concentration plasmatique. La méthadone se lie fortement aux protéines plasmatiques, avec un taux de fixation de 86 % (64 ; 65).

Du fait de ses propriétés basiques, la méthadone se fixe préférentiellement sur les alpha 1 acid glycoprotein (AAG). Le taux de AAG varient suivant les conditions physiologiques (âge, sexe) et suivant les conditions pathologiques (stress). Aussi le stress subit par l'organisme chez un cancéreux ou un toxicomane, entraîne une augmentation plasmatique des AAG, ce qui favorise l'action de la méthadone. La méthadone étant une drogue lipophile, la proportion de sa distribution tissulaire dépend de sa concentration plasmatique liée aux protéines (62).

La demi-vie plasmatique de la méthadone est en moyenne de 25 heures avec une très grande variabilité interindividuelle (13 à 55 heures)

Métabolisme de la méthadone(d'après the Analytical Profiles Of Drug Substances Vol 3) (66) :

La méthadone est principalement métabolisée par le foie où elle subit une N-déméthylation et une cyclisation sans conjugaison. Les métabolites (pyrrolidine et pyrroline) sont inactifs. La méthadone est métabolisée quatre fois plus rapidement après administration orale qu'après administration intra musculaire.

De récentes études indiquent que les cytochromes CYP 1A2 (79), CYP 2D6 (102), CYP 3A4 (79) sont impliqués dans le métabolisme de la méthadone. La méthadone serait en majorité métabolisée par le CYP 3A4 (103, 77). Il existe des variations interindividuelles dans l'expression du CYP 3A4, d'où des variations interindividuelles dans le métabolisme de la méthadone.

Les CYP 2C9 et 2C19 interviendraient, mais dans une moindre mesure dans le métabolisme de la méthadone (67).

La méthadone est capable d'induire son propre métabolisme. D'autre part elle semblerait altérer la métabolisation de différents substrats par le CYP 2D6 (104).

Chapitre 2

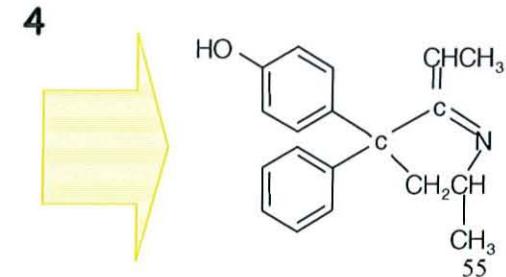
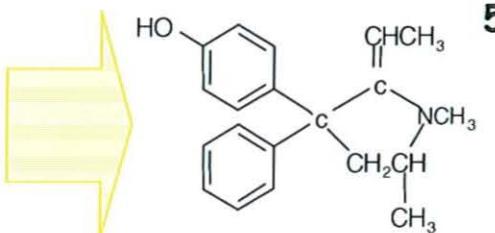
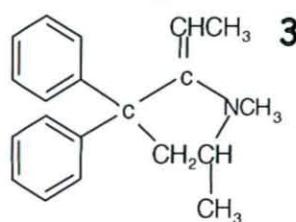
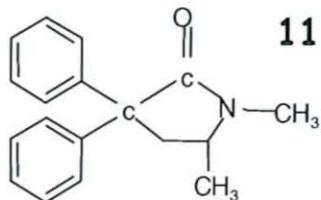
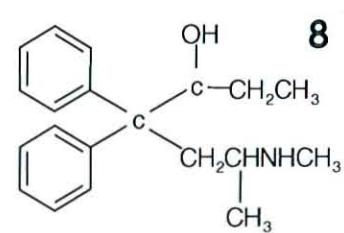
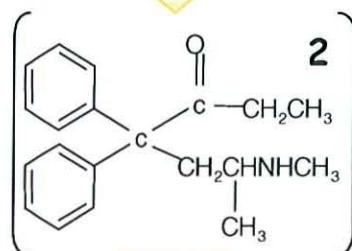
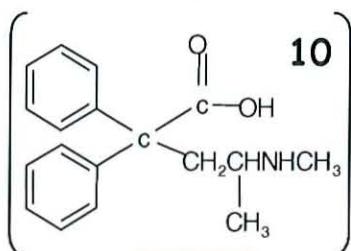
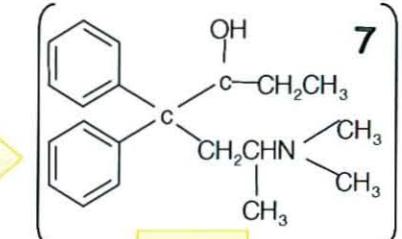
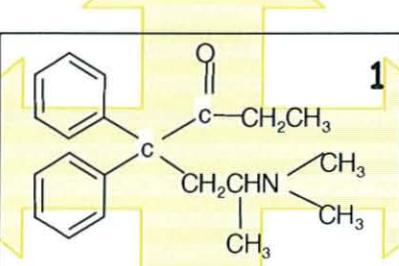
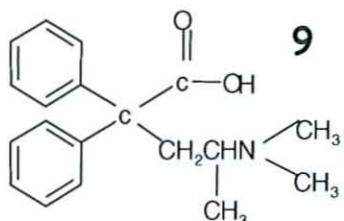
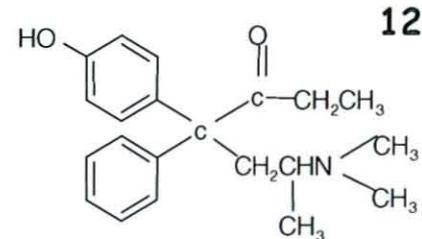
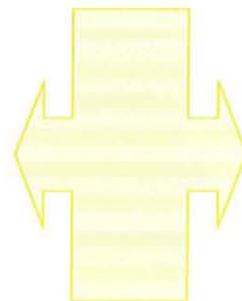
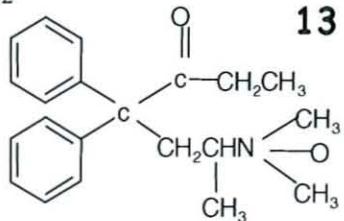
Les métabolites majeurs de la méthadone chez l'homme sont montrés sur la figure suivante. Le métabolite primaire de la méthadone [1] est formé par N-déméthylation. Il s'agit du N-desméthylméthadone [2], composé instable qui est cyclisé en 2-ethylidène-1,5dimethyl-3,3diphenylpyrrolidine (EDDP) [3]. La N-déméthylation de EDDP forme le 2-ethyl-5-methyl-3,3-diphenylpyraline (EMDP) [4]. Les molécules [3] et [4] et leurs analogues hydroxylés (sur leur cycle), 2-ethylidène-1,5-dimethyl-3-(p-hydroxyphényl)-3-phenylpyrrolidine [5] et 2-ethyl-5-methyl-3-(p-hydroxyphényl)-3-phenyl-l-pyrroline [6] sont détectés dans les urines humaines.

Dans une voie mineure, le groupe cétonique de la méthadone est réduit enzymatiquement pour former le méthadol [7] qui est N-déméthylé pour produire le norméthadol [8] qui est excrétré dans les urines.

Dans une autre voie mineure, la chaîne latérale de la méthadone est oxydée pour former l'acide 4-dimethyl-2,2-diphenyl valérique [9] qui est par la suite N-déméthylé en partie en un intermédiaire, l'acide 4-methylamino-2,2-diphenyl valérique [10]. La cyclisation de cet intermédiaire produit le 1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-2-pyrrolidone [11].

En plus des métabolites phénoliques [5] et [6] précédemment mentionnés, la méthadone hydroxylée sur son cycle [12] est également retrouvée dans les urines des sujets sous méthadone. La méthadone N-oxyde [13] est aussi retrouvée dans les urines des sujets ayant reçu une simple dose de méthadone, ainsi que dans les urines des drogués traités et dans les urines de rat.

Chapitre 2



**Métabolites majeurs
de la méthadone**

Chapitre 2

Après administration d'une dose unique de méthadone, 20% sont excrétés dans les urines sous forme inchangée et 13 % sous forme métabolisée. 20 à 40% de la dose initiale sont excrétés dans les fèces sous forme métabolisée via la bile. La méthadone peut être trouvée dans la sueur ou la salive.

L'excrétion urinaire est dose dépendante et représente la voie principale d'élimination. Elle est augmentée par acidification des urines, du fait du caractère lipophile et basique de la méthadone (68).

L'excrétion rénale est de 40 % lors d'une administration chronique et de 19 % lors d'une administration aiguë.

3.10 Interactions médicamenteuses.

3.10.1 Associations déconseillées

- Alcool : majoration de l'effet sédatif,
- Agonistes-antagonistes morphiniques (buprénorphine, halbuphine, pentazocine) : apparition de symptômes de sevrage par blocage compétitifs des récepteurs,
- IMAO (inhibiteur de la monoamine oxydase) : stimulation ou dépression du système nerveux central. Eviter d'associer un IMAO en cours de traitement ou dans les deux semaines qui précèdent un traitement à la méthadone.

3.10.2 Associations à prendre en compte

- Autres dérivés morphiniques (analgésiques et antitussifs), augmente l'effet dépresseur respiratoire surtout chez les sujets âgés.
- Autres dépresseurs du système nerveux central : Majoration de la dépression centrale.
- Fluoxétine et autres sérotoninergiques : augmentation des taux plasmatiques de la méthadone.
- Cimétidine : potentialisation des effets de la méthadone par déplacement des sites de fixation protéiques.

Chapitre 2

- Rifampicine, phénytoïne et autres inducteurs enzymatiques hépatiques : diminution de l'effet de la méthadone et risque de syndrome de sevrage.
- Acidifiants et alcalinisants urinaires : augmentation de la clairance de la méthadone à pH acide et diminution à pH alcalin.

4 Interactions métaboliques déjà décrites avec ces médicaments

4.1 Interactions métaboliques décrites avec la méthqualone

La méthqualone possède des propriétés psycholeptiques et hypnogènes. Aussi ses principales précautions d'emploi concernent son utilisation concomitante avec des médicaments ou toxiques (éthanol) agissant au niveau du système nerveux central, par risque de majorer les effets secondaires de l'un ou l'autre de ces médicaments.

Une interaction avec la diphenhydramine a pourtant été décrite.

En 1978, Hindmarsh KW *et coll* démontrent par une étude *in vitro* chez le rat que la diphenhydramine inhibe le métabolisme de la méthqualone, le pourcentage d'inhibition augmentant avec l'accroissement des concentrations de diphenhydramine (69). En 1983, Hindmarsh *et coll* complètent leurs travaux par une étude *in vivo* : à des sujets sains, ils administrent soit 250 mg de méthqualone, soit de la méthqualone (250 mg) et de la diphenhydramine (25 mg), ou une capsule contenant une association de méthqualone et de diphenhydramine (250mg/25mg).

Ils mesurent le métabolite majeur de la méthqualone, 2-methyl-3-(2'-hydroxyméthylphényl)-4(3h)-quinazolinone dans chacun de ces cas et constatent que la diphenhydramine utilisée à la dose de 25mg, dose usuelle utilisée en clinique ne modifie pas les concentrations plasmatiques de la méthqualone ni de son métabolite (70).

D'autre part Ali *et coll.*, 1980, montrent dans une étude *in vitro* chez le rat que l'influence de la méthqualone sur le métabolisme de la diphenhydramine dépend du rythme d'administration de la méthqualone. Une dose unique de méthqualone ne semble pas influencer le métabolisme de la diphenhydramine, alors qu'une dose chronique de méthqualone induirait le métabolisme de la diphenhydramine (71).

4.2 Interactions métaboliques décrites avec la diphenhydramine

Les antihistaminiques sont utilisés depuis plus de 50 ans et font partie des médicaments les plus couramment prescrits (72). Ils sont très souvent utilisés en association avec d'autres médicaments comme antiallergiques, antitussifs et antiémétiques. Les antihistaminiques sont considérés comme des médicaments ayant une très bonne tolérance et une très grande sûreté d'utilisation. Pourtant leur pharmacocinétique, en particulier leurs interactions avec les cytochromes est très peu connue. Les seuls effets secondaires et interactions médicamenteuses relevés étant dus à leur non-spécificité pour les récepteurs H1, ceci pouvant induire des réponses dopaminergiques, cholinergiques et sérotoninergiques. Les antihistaminiques étant très lipophiles, ils sont capables de traverser la barrière hémato-méningée et d'interagir au niveau du système nerveux central. Aussi, plusieurs observations nous montrent aujourd'hui l'importance des CYP 2D6 dans le métabolisme et les interactions des antihistaminiques. Leur structure et leur site de fixation sur les cytochromes P450 sont très proches des substrats et inhibiteurs du CYP 2D6 (73). De plus, la demi-vie de la diphenhydramine (antihistaminique) augmente chez les personnes âgées (activité CYP 2D6 déficiente) (74). Enfin, en ce qui concerne la pharmacocinétique, le métabolisme des antihistaminiques est variable selon les individus (57 ; 58). On parle de variabilité individuelle comme pour le CYP 2D6 caractérisé par son polymorphisme individuel. Les antihistaminiques sont en effet métabolisés par le CYP 2D6.

Bettina A.Hamelin *et coll.*, 1998 démontrent dans une étude *in vitro* que la diphenhydramine est un inhibiteur compétitif des CYP 2D6 (la diphenhydramine étant faiblement inhibitrice par rapport aux autres antihistaminiques). Des doses rapprochées et répétées d'antihistaminiques conduisent à leur accumulation ; les antihistaminiques inhibant leur propre métabolisme (59). L'administration chronique de diphenhydramine augmente et prolonge l'effet du métaproterolol, bêtabloquant, par inhibition de son métabolisme CYP 2D6 dépendant. Hamelin *et coll.*, 2000 démontrent que cette inhibition est particulièrement importante chez les métaboliseurs extensifs (75). D'autre part, les antihistaminiques étant très lipophiles, ils s'accumulent au niveau hépatique, ceci facilitant de nombreuses interactions médicamenteuses avec des antidépresseurs, antipsychotiques et médicaments du système cardiovasculaire, tous substrats de CYP 2D6. Lessars *et coll.*, 2001 ont étudié l'interaction médicamenteuse diphenhydramine/venlafaxine.

La venlafaxine est majoritairement métabolisée par le CYP 2D6. Ces travaux montrent que la diphenhydramine à doses thérapeutiques inhibe son métabolisme et expose les patients à des risques cardiovasculaires (76).

4.3 Interactions décrites avec la méthadone

La prescription de méthadone doit tenir compte des affections associées psychiatriques ou infectieuses et des modes d'utilisation des médicaments pris de façon licite ou illicite. De ce fait, les interactions médicamenteuses sont potentiellement nombreuses et parfois dangereuses pour le toxicomane. Certaines ont fait l'objet de publications qui doivent permettre au prescripteur de gérer au mieux les risques éventuels d'apparition d'effets indésirables.

La plupart des études concernent les inhibitions compétitives ou non du métabolisme de la méthadone.

D'un autre côté, certains médicaments sont connus comme étant des inducteurs classiques du CYP 3A4. Aussi les risques d'interactions et de syndrome de sevrage par induction enzymatique sont signalés dans le Vidal.

Par ailleurs, les toxicomanes constituant une population à risques en ce qui concerne la contamination par le V.I.H, sont particulièrement concernés par la co-prescription d'antirétroviraux et de méthadone, et par le risque d'interactions qui en découlent.

4.3.1 Inhibitions du métabolisme de la méthadone

La nifédipine, le diazépam (77), la fluvoxamine et la fluoxétine, antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (78 ; 79 ; 80 ; 81) ainsi que la ciprofloxacine (82), antibiotique de la famille des fluoroquinolones sont des inhibiteurs du métabolisme de la méthadone.

4.3.1.1 Méthadone et psychotropes.

- *Fluvoxamine*

Une étude portant sur 5 patients recevant de la fluvoxamine et de la méthadone a montré que les taux plasmatiques de méthadone augmentaient de 20% chez 2 patients et de 40 à 100% chez 3 patients avec un cas de syndrome de manque à l'arrêt de la fluvoxamine. (78). Cette interaction s'explique par une modification du métabolisme de la méthadone par compétition stéréosélective. (79). La prescription ou l'arrêt de la fluvoxamine doit être réfléchie chez les patients sous méthadone.

- *Fluoxétine.*

Bertschy *et coll.* rapportent 9 cas où la fluoxétine à 20mg/j a été co-administrée au traitement par la méthadone dont les doses se situaient de 30 à 100 mg/j. Les taux plasmatiques de méthadone augmentaient chez certains patients sans incidence sur le plan clinique (80).

La fluvoxamine et la fluoxétine sont des inhibiteurs des CYP 1A2, 2C19, 2D6 et surtout du CYP 3A4.

Le CYP 3A4 est le principal acteur de la N-déméthylation de la méthadone.

CYP 1A2 et CYP 2D6 participent également au métabolisme de la méthadone.

Ainsi les RCP de la méthadone note l'association fluoxétine et autres sérotoninergiques / méthadone comme association à prendre en compte, avec risque d'augmentation des taux plasmatiques de méthadone.

Lors d'un traitement sous méthadone, la prise concomitante de fluvoxamine peut conduire à une hypoxémie avec hypercapnie, traduisant une hypoventilation.

Ce sont principalement la fluoxétine et fluvoxamine qui sont impliquées dans cette interaction.

Aussi, la fluvoxamine semble être un plus puissant inhibiteur de CYP 3A4 que la fluoxétine.

Cependant De Maria *et coll.*, 1999 ont étudié une possible utilisation thérapeutique de cette interaction. En effet, l'association fluvoxamine / méthadone permettrait de maintenir des taux plasmatiques de méthadone suffisant chez des personnes difficilement équilibrées (81).

4.3.1.2 Interaction ciprofloxacine / méthadone.

La ciprofloxacine, antibiotique de la famille des quinolones est un inhibiteur compétitif du CYP 1A2.

De plus, elle diminue de 65% l'activité du CYP 3A4 dans les microsomes hépatiques humains.

CYP 1A2 et CYP 3A4 sont tous deux impliqués dans le métabolisme de la méthadone, d'où le risque d'interaction médicamenteuse lors de l'association méthadone / ciprofloxacine.

Le volume 356 du Lancet (Décembre 2000) relate un cas clinique mettant en cause l'interaction ciprofloxacine / méthadone (82) :

« Une personne sous méthadone depuis plus de 6 ans, bien stabilisée, reçoit de la ciprofloxacine CIFLOX, au cours d'une hospitalisation pour traiter une infection urinaire.

Il s'en suit une profonde sédation, une confusion et une grave dépression respiratoire prise en charge par une administration de naloxone. En est déduit un surdosage en méthadone ; surdosage dû à l'inhibition du métabolisme de la méthadone par la ciprofloxacine. »

4.3.2 Méthadone et anti-rétroviraux.

Les héroïnomanes constituent une population à risque en ce qui concerne la contamination par le V.I.H.

Atteints par le virus du SIDA, ils se retrouvent très souvent polymédiqués suite aux complications de la maladie et suivent parfois un traitement de substitution à l'héroïne.

Il est alors intéressant d'étudier les risques d'interactions médicamenteuses entre les anti-rétroviraux et autres médicaments associés, notamment la méthadone.

4.3.2.1 Interaction anti-protéases / méthadone.

Les anti-protéases ayant été une véritable révolution avec la trithérapie dans le traitement du SIDA, ils sont aujourd'hui très largement utilisés.

De nombreuses études, *in vivo* et *in vitro* se penchent alors sur le problème de l'association anti-protéases / traitement de substitution. Les résultats sont contradictoires.

In vitro, les anti-protéases sont des inhibiteurs du CYP 3A4, ce qui laisse prévoir une inhibition du métabolisme de la méthadone. Le ritonavir NORVIR® est un plus puissant inhibiteur que l'indinavir CRIXIVAN®, le nelfinavir et le saquinavir INVIRASE® (83).

Par ailleurs, dans une étude *in vivo* menée par Hsu *et coll.* 1998, le ritonavir induit le métabolisme de la méthadone, ceci pouvant conduire à un syndrome de sevrage (84).

En effet, le ritonavir est capable d'auto-induire son propre métabolisme dans les deux premières semaines de traitement. Rappelons que le ritonavir est en majorité métabolisé par le CYP 3A4 et dans une moindre mesure par le CYP 2D6, tous deux mis en jeu dans le métabolisme de la méthadone.

D'autre part, le ritonavir induit également les CYP 1A4, 2C9 et 2C19 participant également au métabolisme de la méthadone mais dans une moindre mesure (67).

Le ritonavir ayant à la fois des effets inhibiteurs et inducteurs, il semble difficile de prévoir *in vivo* les effets de son association avec la méthadone, d'autant plus que différents cytochromes sont mis en jeu.

4.3.2.2 Interaction nevirapine / méthadone.

La nevirapine, inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, est un inducteur du CYP 3A4 (85).

Plusieurs cas de syndromes de sevrage sont décrits lors de l'association de nevirapine à un traitement de substitution sous méthadone (86).

Les premiers signes d'état de manque apparaissent 5 à 10 jours après le début du traitement de nevirapine, et persistent encore 6 mois et demi après. Le temps de latence avant l'apparition des symptômes est en accord avec le mécanisme de l'induction du CYP 3A4 impliquant une synthèse *de novo* de l'enzyme (87).

4.3.3 Inductions du métabolisme de la méthadone.

La rifampicine, la phénytoïne, les barbituriques et la carbamazépine sont connus comme étant des inducteurs classiques du CYP 3A4. Ainsi les risques d'interaction et de syndrome de sevrage par induction enzymatique sont signalés dans les RCP (Résumé des Caractéristiques du Produit) du chlorhydrate de méthadone, à propos de la rifampicine et de la phénytoïne (88 ; 89 ; 90). Une induction du métabolisme de la méthadone a été également montrée pour les barbituriques (91). Il n'y a cependant presque aucune donnée bibliographique sur les médicaments autres que les inducteurs classiques mentionnés plus haut concernant une éventuelle interaction par induction lors des traitements de substitution à la méthadone.

A cet égard, il est intéressant de relever que la méthadone induit son propre métabolisme au début du traitement de maintenance (92) ou bien lors d'une forte augmentation de la dose (93).

Par ailleurs, il faut signaler que dans une étude ancienne effectuée chez le rat, il a été démontré que l'administration répétée pendant 5 jours de méthqualone augmentait l'aminopyrine démethylase, suggérant effectivement une induction du système enzymatique CYP 3A4 (94). Il n'existe cependant pas de preuve définitive chez l'homme.

4.3.3.1 Méthadone et antituberculeux :

– *Rifampicine.*

La rifampicine est un puissant inducteur enzymatique du CYP P450. Elle augmente la clairance et réduit la demi-vie de divers médicaments. Les patients recevant de la rifampicine et de la méthadone pourraient ainsi se retrouver en manque et arrêter leur traitement antituberculeux ou supplémenter leur prescription de méthadone par des drogues illicites opiacées. La rupture de l'observance du traitement antituberculeux accroît le risque de résistance secondaire.

Les premières observations d'une interaction méthadone / rifampicine ont été faites par Kreek *et coll.*, en 1976. 21 patients sur 30 traités par la rifampicine et par la méthadone ont présenté un syndrome de sevrage. Sur les 21 patients, 7 ont présenté des symptômes sévères de

sevrage au bout d'une semaine de co-administration. La demi-vie de la méthadone n'est pas modifiée mais les concentrations plasmatiques et l'aire sous la courbe sont significativement diminués (88). Plus récemment, Raistrick *et coll.* rapportaient le cas d'un syndrome de sevrage chez une femme de 40 ans recevant de la rifampicine et 50 mg/j de méthadone. D'elle-même, elle arrêtait son traitement antituberculeux puis le reprenait après explication par le médecin de l'importance de la compliance au traitement. Après adaptation posologique, cette patiente recevait 150 mg/j de méthadone soit 3 fois la dose initiale. La dose quotidienne de la méthadone et/ou la fréquence d'administration doivent être augmentées afin de maintenir les effets substitutifs de la méthadone, la prescription de rifampicine ne devant être arrêtée sans évaluation d'un risque d'émergence de la maladie tuberculeuse (95).

– *Rifabutine.*

Une étude d'interaction rifabutine / méthadone sur 24 usagers de drogue a été entreprise sur 15 jours. Chaque patient recevait 300 mg de rifabutine en une prise, associée à la dose quotidienne de méthadone. Aucune modification des paramètres pharmacocinétiques de la méthadone n'a été observée. La rifabutine n'influence pas la prescription de la méthadone (96).

4.3.3.2 Méthadone et anti-épileptiques.

– *Phénytoïne*

Tong *et coll.* ont réalisé une étude pharmacocinétique de la méthadone chez des patients recevant de la phénytoïne à raison de 300 mg/j en une prise. Les critères d'exclusion permettaient d'éliminer les patients prenant d'autres drogues ou médicaments, d'alcool ou ayant un dysfonctionnement hépatique. Les taux plasmatiques moyens de la méthadone diminuaient significativement ($p<0.01$) de l'ordre de 50% par rapport au groupe témoin ne recevant pas de phénytoïne. Parallèlement, le taux urinaire du métabolite principal pyrrolidinique augmentait

Chapitre 2

significativement ($p<0.01$). Un syndrome de manque apparaissait en 3 à 4 jours. Une adaptation posologique était nécessaire pour maintenir l'effet substitutif de la méthadone (90).

- *Autres anti-épileptiques.*

D'une manière générale, les autres inducteurs enzymatiques comme le phénobarbital ou la carbamazépine augmentent le métabolisme de la méthadone majorant le risque de syndrome de sevrage (91). Dans la mesure où cela est possible, un changement de médicament doit être envisagé comme la substitution de ces anticonvulsivants par l'acide valproïque.

Objectifs

L'objectif de ce travail est de vérifier par une étude *in vitro* si la méthqualone et la diphenhydramine sont inducteurs du CYP 3A4 comme le suggère les cas cliniques de syndromes de sevrage aux opiacés sous administration de méthadone décrits par l'équipe du Docteur Chin.B EAP à Lausanne.

L'étude des interactions médicamenteuses telles que celles prévues par l'EMEA (*European Agency for the Evaluation of Medicinal Product, Note for guidance on the investigation of drug interactions*, <http://www.eudra.org/emea.html>) (97) mentionne parmi les causes d'interactions pharmacocinétiques, les inductions du métabolisme des médicaments.

De même, la notice de la FDA (*Food and Drug Administration, Guidance for industry, in vivo drug metabolism/Drug interaction studies-Study design, data analysis, and recommandation for dosing and labelling*, <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>) (98) rappelle les principes de base des études d'interactions. Cependant, si la méthodologie d'étude des enzymes responsables du métabolisme est définie par les agences réglementaires, il n'en va pas de même pour les méthodes d'études de l'induction. Des résultats sont attendus sans que les méthodes soient évoquées. Ceci tient au fait que les méthodes disponibles pour étudier l'induction du cytochrome P 450 3A4 ne sont pas totalement satisfaisantes et ne peuvent être définitivement fixées actuellement.

Dans ce contexte, compte tenu de l'importance de la méthadone dans les traitements de substitution, des affections psychiatriques ou infectieuses qui lui sont associées, de l'utilisation concomitante de médicaments de façon licite ou illicite, notamment de méthqualone, et de ce qui est connu comme risques d'interactions avec ce produit, nous avons eu pour objectifs :

- D'exploiter l'un des modèles cellulaires d'étude de l'induction de CYP 3A, même si ce modèle présente des limites.
- D'appliquer la méthode d'analyse RT-PCR, supposant que l'induction recherchée est transcriptionnelle.
- De vérifier si la méthqualone et la diphenhydramine induisent CYP 3A, cause d'interaction avec la méthadone.

Chapitre 3

MATERIELS ET METHODES

Matériels et méthodes

1 Méthodes d'étude et modèles cellulaires

Lors du développement d'un nouveau médicament, il est important de connaître son influence sur l'expression du CYP 3A4.

A l'origine des études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal étaient réalisées. Cependant, ceci posait des problèmes de comparaison d'une espèce à l'autre.

Actuellement les méthodes les plus utilisées sont les modèles cellulaires humains tels que les cultures primaires d'hépatocytes ou les lignées Hep G2, Hep 2f, Hep 3B ou Tong / HCC qui toutefois n'expriment pas ou peu CYP 3A4 ou CYP 3A5 mais expriment CYP 3A7 (32). *CYP 3A7* est inductible dans le modèle cellulaire Hep G2 (49). Il possède 91% d'homologie de séquences avec *CYP 3A4* au niveau de la région 5' flanquante (48). La qualité d'induction de *CYP 3A7* n'est pas comparable quantitativement à celle de *CYP 3A4*, car la variation de deux acides nucléiques au niveau des séquences ER6 est responsable d'une plus faible réponse de *CYP 3A7* à l'induction. En conséquence, la réponse à l'induction de CYP 3A obtenue *in vitro* pourrait être plus faible que celle observée *in vivo*.

Cependant, les cultures primaires d'hépatocytes, qui sont le modèle le plus pertinent sont limitées pour des raisons d'éthique.

La lignée d'hépatocarcinomes d'origine humaine Hep G2 a été choisie car elle est d'une part, de culture plus facile que les lignées primaires d'hépatocytes et d'autre part, parce qu'elle a conservé certaines propriétés des hépatocytes humains, notamment en matière de régulation. Toutefois, les cellules Hep G2 ne possèdent pas de récepteurs aux glucocorticoïdes et la présence d'autres récepteurs nucléaires est encore incertaine (99).

2 Culture cellulaire.

Les cellules utilisées pour cette étude sont les cellules Hep G2 (ECACC, n°85011430), lignée d'hépatocarcinomes d'origine humaine provenant d'un adolescent de type caucasien âgé de 15 ans (100).

Le milieu de culture utilisé est le RPMI 1640 (Sigma) additionné de 5 ml d'antibiotique (100 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine et 1,25 µg/ml d'amphotéricine B), de 5 ml de glutamine et de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF).

Les cellules sont cultivées à une température de 37°C, dans une atmosphère à 5% de CO₂.

Lorsque les cellules sont à confluence dans le flacon de culture, des plaques 6 trous sont ensemencées avec 1-1,5 millions de cellules. Une plaque 6 trous est réalisée pour chaque traitement.

3 Traitements des cellules.

Lorsque les cellules ont atteint 90 % de confluence, le milieu de culture est remplacé par du milieu sans sérum quelques heures avant les traitements, ceci permet de stabiliser les cellules. Le SVF contient des facteurs de croissance qui risquent d'influencer les caractéristiques des cellules et la régulation des enzymes étudiées. Les traitements par les inducteurs sont ensuite réalisés. Les différentes concentrations finales des inducteurs utilisés sont choisies selon les conditions de la littérature. La diphenhydramine et la méthqualone ont été fournies par le Dr Chin.B EAP, Université de Lausanne.

- Rifampicine 10⁻⁵ M (49) (Sigma)
- Diphenhydramine 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ M
- Méthaqualone 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ M

Trois traitements successifs de 24 heures

4 Récupération des cellules.

Dans chaque plaque, le milieu de culture est enlevé par aspiration en conditions stériles. Les trous sont ensuite rincés par du PBS 1X stérile glacé (2 ml par plaque). Les cellules sont alors rapidement récoltées par grattage après ajout de 400 µl de solution de dénaturation instapure EUROGENTEC.

5 Extraction des ARN en plaques 6 trous.

Protocole RNA instapure EUROGENTEC.

Toutes les manipulations se font dans la glace. La méthode d'extraction des ARNs se résume ainsi :

- Rincer les cellules avec du PBS, sur culot sec.
- Ajouter 400 µl de RNA instapure EUROGENTEC.
- Gratter.
- Récupérer dans un eppendorf.
- Ajouter 40 µl de chloroforme.
- Centrifuger 15 min à 12 000 g à 4°C.
- Récupérer le surnageant dans un tube froid (noter le volume).
- Ajouter ensuite un volume identique d'isopropanol.
- Vortexer et incuber 15 min à -20°C afin de précipiter les ARNs.
- Centrifuger 15 min à 12 000 g à 4°C.
- Aspirer le surnageant.
- Rincer le culot d'ARN par 400 µl éthanol à 70° glacé.
- Vortexer.
- Centrifuger 8 min à 7500 g à 4°C.

Chapitre 3

- Aspirer le surnageant. Sécher le culot à l'air libre.
- Reprendre le culot par 30-40 µl d'eau stérile.
- Incuber celui-ci 10 min à 60°C pour le dissoudre.
- Les ARN sont ensuite stockés à -80°C ou prêts à être quantifiés.

Remarque :

Toute la verrerie, pointes et tubes Eppendorffs sont autoclavés. Ceci permet d'inactiver les Rnases qui pourraient détruire les ARNm .

6 Quantification des ARNs extraits.

La quantification et l'appréciation de la qualité des ARNs se fait en deux étapes.

6.1 Première étape : quantification par mesure spectrophotométrique.

La spectrophotométrie est une technique de mesure qui associe l'analyse spectrale de la spectrométrie à la mesure des grandeurs photométriques relatives liées aux propriétés de la matière.

La spectrométrie a pour objet d'isoler, dans le rayonnement complexe émis par une source, une radiation monochromatique.

La photométrie mesure la transmission effective de cette radiation à travers une solution, et permet de déterminer la concentration en soluté et la courbe spectrale de ce dernier.

Dans la pratique deux mesures sont nécessaires :

- L'une à travers un liquide référence (blanc) permettant de régler le 100% de transmission,
- L'autre à travers l'échantillon.

Les mesures d'absorbance (DO) sont effectuées aux longueurs d'onde de 260 nm et de 280 nm.

Chapitre 3

Le rapport des DO (densités optiques) 260nm/280nm est normalement compris entre 1,8 et 2. S'il y a contamination par des protéines (280nm) ou du phénol (270nm), le rapport sera nettement inférieur à 1,8.

La D.O à 260nm permet de connaître la quantité d'ARN présente dans chaque tube selon la formule :

$$[\text{ARN}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{DO 260nm} * 40 * \text{dilution} / 1000$$

6.2 Deuxième étape : quantification des ARNs

Une électrophorèse en gel d'agarose permet de visualiser la qualité des ARNs. (dépôt de 2 µg d'ARN par puits).

Les ARN, chargés négativement, migrent dans un champ électrophorétique vers l'anode.

Afin de visualiser les ARNs après électrophorèse, le gel est trempé dans une solution contenant du bromure d'ethidium (BET), agent mutagène et cancérogène devant être manipulé dans des conditions particulières (gants, blouse, déchets recyclés...)

Cette molécule s'intercale entre les bases d'acides nucléiques et a la propriété de fluorescer en rouge orange lorsqu'elle est excitée sous lumière ultraviolette.

Le gel est alors observer sous une lampe à ultraviolets et les ARN complexés au BET sont devenus visibles.

7 Technique de détection

La détection des ADNc des cytochromes P450 étudiés se fera au moyen d'une réaction RT-PCR. L'expression des ADNc isolés par cette technique reflète la présence d'ARNm transcrits à partir de l'ADN génomique. Les ARNm précédemment extraits serviront à former de l'ADNc selon la réaction de RT (reverse transcription).

Le principe consiste à extraire les ARN totaux des tissus étudiés et de les copier *in vitro* en ADNc simple brin, grâce à l'action de la transcriptase inverse. Les molécules d'ADN ainsi obtenues servent alors de matrice à une réaction PCR en utilisant un couple d'amorces spécifiques de la séquence de l'ARN d'intérêt. Les fragments PCR obtenus après les cycles de PCR sont visualisés par électrophorèse sur gel.

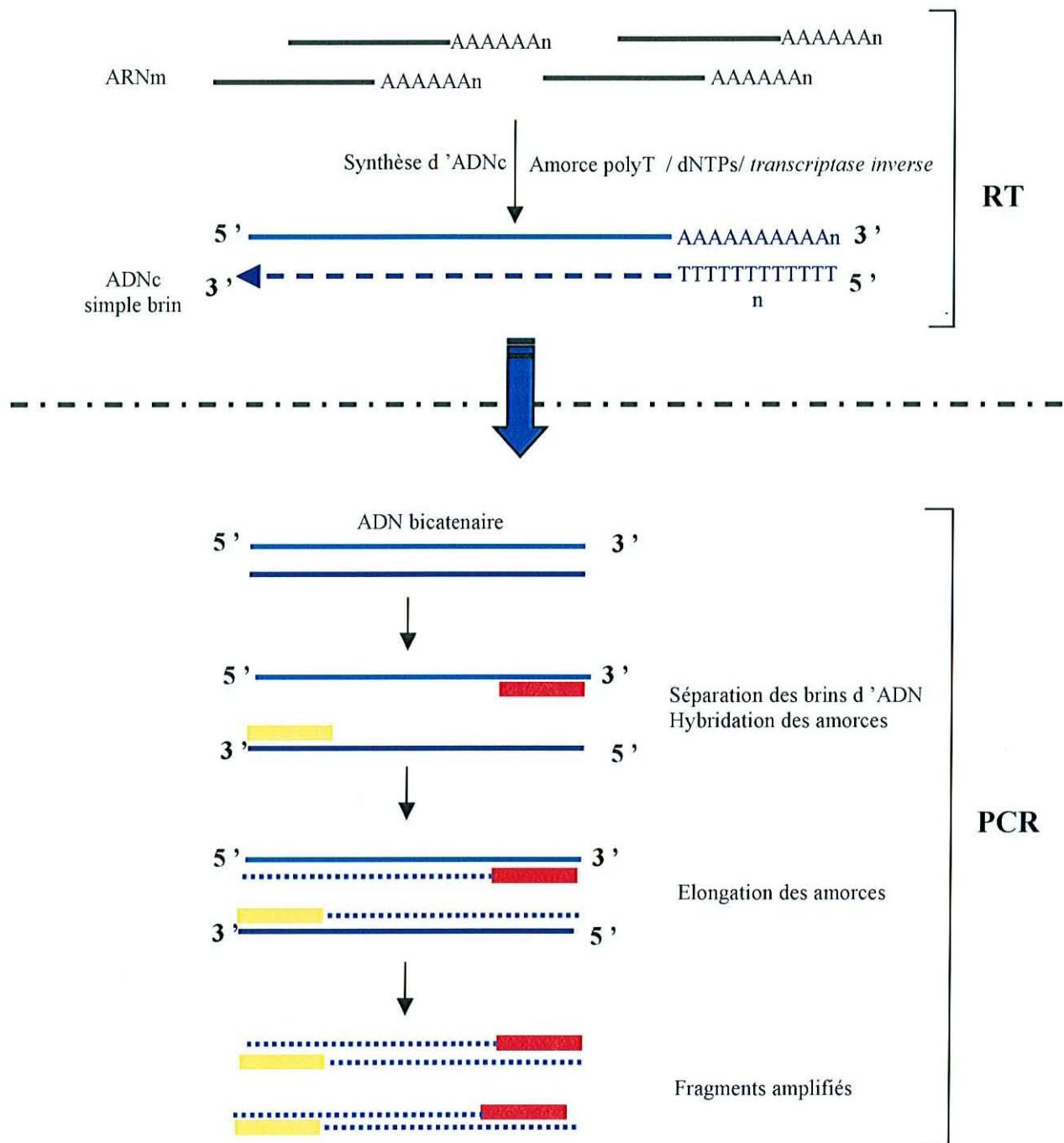


Schéma du mécanisme de RT-PCR

7.1 Réaction de reverse transcription.

La quantité d'ARN utilisée est de 7 µg.

Les ARN sont mélangés à 1 µl (0,5 µg) d'oligodT (Promega). Les oligodT se lient à la queue polyA en 3' des ARNm pour permettre l'elongation, le volume étant ajusté à 32,5 µl avec de l'eau stérile (sans Rnase), le tout est incubé pendant 5 min à 65°C.

Puis, le tampon RT (5µl) (Promega), la Rnasine (1µl) (Promega), le BSA (0,5µl) (Promega) ainsi que les dNTP (0,2µM de chaque dNTP) (Promega) sont ajoutés. L'enzyme de reverse transcription (200 unités) (Promega) est ajoutée en dernier. Le volume final est de 50µl. Le tout est incubé 2 heures à 37°C. L'activité de l'enzyme est arrêtée par 2 min à 90°C.

Les ADNc des cytochromes P450 ainsi obtenus seront amplifiés par la réaction de PCR en présence d'amorces spécifiques.

La reverse transcriptase :

Cette enzyme, isolée à partir de certains virus tumorigènes à ARN, utilise de l'ARN comme matrice pour synthétiser un brin d'ADN. Son nom provient du fait qu'elle est capable d'effectuer en sens inverse la première étape de l'expression génétique : la transcription.

7.2 La PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique permettant d'amplifier *in vitro* des séquences d'ADN par répétition de réactions d'elongation en présence d'une ADN polymérase et d'amorces nucléotidiques spécifiques. La découverte d'une eubactérie thermophile vivant dans les sources chaudes (70 à 75 °C) du Yellowstone National Park, *Thermus Aquaticus*, et l'utilisation par la suite de sa polymérase, stable jusqu'à des températures proches de 100°C, sont à l'origine du développement de cette technique.

7.2.1 Principe de la PCR.

Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition de trois processus :

- La dénaturation des deux brins d'ADN à température élevée (environ 94°C pendant 5 min) afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténaires.

- L'hybridation d'oligonucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible.

La température est alors amenée à une valeur comprise entre 40° et 65°C afin de permettre une bonne fixation des amarces.

Cette étape d'hybridation des amarces est un paramètre essentiel dans la détermination de la spécificité de la PCR et tant les températures que la durée des hybridations dépendent de la séquence à amplifier.

- La réaction d'elongation par une ADN polymérase thermostable (la Taq polymérase) à partir des oligonucléotides, réalisée à la température optimale de 72 °C pendant 5 min.

Les produits de ce premier cycle sont ensuite dénaturés par la chaleur, la température est de nouveau portée à 94°C, mais cette fois-ci pendant seulement 20 secondes de façon à ce que les courtes régions d'ADN double brin (constitué d'un brin initial et d'un brin nouvellement synthétisé) se séparent. Les amarces sont à nouveau hybridées avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à la polymérase. Les cycles sont répétés 30 à 60 fois. A chaque cycle le nombre de copies du fragment d'ADN est doublé : 2^n molécules sont ainsi obtenues après n cycles.

De nombreux paramètres peuvent faire varier l'efficacité de la PCR :

- La concentration de la Taq polymérase, de dNTP, de MgCl₂ et d'ADNc,
- La qualité de l'échantillon à amplifier,
- La longueur du produit d'amplification,

- L'abondance du produit à amplifier,
- La phase de la PCR (exponentielle (efficacité maximum) ou plateau (efficacité réduite)),
- La température des étapes de dénaturation, d'hybridation des amorces et d'elongation,
- Les intervalles de temps nécessaires au passage d'une température à une autre,
- Le taux de formation de dimères d'amorces...

7.2.2 La Taq polymérase.

L'utilisation de la Taq polymérase a succédé à celle de l'ADN polymérase d'E.coli, enzyme sensible à la chaleur et dénaturée aux températures nécessaires pour séparer les brins d'ADN et interdisant toute automatisation de la méthode, l'enzyme devant être ajoutée manuellement à chaque cycle.

La Taq polymérase est issue d'une eubactérie, *Thermus Aquaticus*, vivant dans des eaux dont la température avoisine les 75°C. La Taq polymérase fonctionne de façon optimale à 72°C et reste raisonnablement stable jusqu'à 94°C.

Elle peut donc être ajoutée juste avant le début de la réaction et fonctionne jusqu'à la fin du processus d'amplification.

La découverte de cette enzyme a donc permis l'automatisation de la PCR.

On utilise des appareils qui sont en fait des blocs chauffants que l'on peut programmer en fonction des différentes températures et des différents temps que l'on désire utiliser pour la PCR. Une fois les réactifs introduits dans cet appareil, la réaction se déroule sans aucune intervention manuelle.

L'utilisation de la Taq polymérase augmente aussi la spécificité et la sensibilité de la technique. En effet, les températures élevées autorisées par l'utilisation de la Taq polymérase réduisent considérablement l'appariement des amorces avec des sites qui ne sont pas strictement complémentaires.

7.2.3 Protocole suivi.

La mise au point des conditions de PCR du CYP 3A7 et l'optimisation des conditions de PCR ont été réalisées par C.Bertrand dans le cadre de son DEA « Inductions comparées de CYP 3A7 par des statines dans le modèle cellulaire HepG2 ».

- Eau qsp 50 µl,
- DNTP (0,2 µM de chaque dNTP)
- Tampon Taq (5 µl),
- Oligonucléotides (0,2 à 1 µM)
- Produits de RT (4 µl),
- Taq polymérase (2,5 unités)
- Concentration en MgCl₂ (1,5mM) : la Taq polymérase nécessite une certaine concentration en Mg afin d'exercer une activité maximale.

Les amorces oligonucléotides utilisées (Eurogentec) pour cette étude sont :

Amorces	Taille	Séquence
GAPDH sens	405 pb	5'CCA-TCA-CCA-TCT-TCC-AGG-AG 3'
GAPDH antisens	120 pb	5'GGA-TGA-TGT-TCT-GGA-GAG-CC 3'
CYP 3A7 sens	551 pb	5'CAT-TGA-TAC-TGT-GCT-ACA-GT 3'
CYP 3A7 antisens	316 pb	5'TCA-GGC-TCC-ACT-TAC-GGT-CT 3'

(Andreo *et coll.*, 1998 ; Schuetz *et coll.*, 1994) (101 ; 32)

Conditions de PCR retenues :

Amorces	Température d'hybridation	Nombre de cycles	Concentration en oligonucléotides	Quantité de produits de RT
GAPDH	54°C	28	0,5µM	2µl
CYP 3A7	54°C	34	1µM	4µl

8. Tests de cytotoxicité

Il s'agit de tests de viabilité cellulaire permettant d'évaluer la cytotoxicité des traitements utilisés.

8.1. Test de cytotoxicité au MTT

Principe :

Le MTT est réduit par les déshydrogénases cellulaires en cristaux insolubles de formazan de couleur bleue qui se décomposent au fond du puits. Le formazan est dissout dans du DMSO et l'absorbance de la solution mise en suspension est mesurée à 450 nm ; Elle est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Réactif :

Solution de MTT à 5 mg/ml : préparer extemporanément suivant le nombre de plaque à traiter une solution de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium de chez Sigma dans du tampon PBS 1X. Stériliser par filtration sur membrane d'acétate de cellulose de porosité 0,2 µm (Alltech).

Mode opératoire :

Le test est réalisé sur des plaques de 96 puits. Les cellules sont ensemencées dans du milieu de culture. Après 24 heures d'incubation, on traite les cellules avec la solution à tester, les cellules sont remises en culture 24 ou 48 heures.

Après ce temps d'incubation :

- Ajouter 20µl de solution de MTT à 5 mg/ml
- Incuber 1 à 4 H à l'étuve à 37°C (vérifier au microscope les cristaux de formazan)
- Eliminer le milieu de culture
- Ajouter 200 µl de DMSO et homogénéiser à la pipette afin de dissoudre les cristaux de formazan
- Lire l'absorbance avec un lecteur de plaque à 540 nm.

Les résultats seront exprimés en pourcentage de cellules viables par rapport aux cellules non traitées.

8.2. Test d'exclusion au Bleu Trypan

Le protocole est le suivant :

- A 500 µl de suspension cellulaire, rajouter 50 µl de Bleu Trypan à 0.4%
- Homogénéiser à la pipette et attendre environ 5 minutes
- Déposer une goutte de suspension colorée sur la lame de l'hémocytomètre
- Laisser sédimentier quelques instants
- Procéder à la numération cellulaire en cellule de Malassez :
 - Les cellules colorées en bleu sont mortes (perméables au colorant)
 - Les cellules non perméables restent claires et réfringentes : elles sont vivantes et sont seules à être prises en compte.

Remarque : en principe la préparation ne doit pas contenir plus de 20 % de cellules mortes (sauf après congélation où l'on peut en trouver davantage).

On doit compter une centaine de cellules pour une appréciation valable.

On compte : Soit une ligne : 10 carrés (=0,1 µl) : $n \times 10 = N$
 Soit toute la cellule : 1 µl = N

Le nombre de cellules est : $1,1 \times N$ cellules / µl = $1,1 \times N \times 10^3$ cellules / ml

9. Analyse des données / tests statistiques

Les produits de PCR ont été analysés par séparation électrophorétique et les images numérisées avec une caméra EDAS120 de marque Kodak avec le logiciel correspondant. L'intensité des bandes du CYP 3A7 pour chaque traitement a été normalisée par rapport à l'intensité de la bande GAPDH.

Les moyennes et écart-type sont calculés au moyen du logiciel « EXCEL® ».

Les tests de comparaison sont réalisés au moyen du logiciel « Statview® » par l'utilisation du test PLSD (Protected least significant difference) de Fischer qui évalue toutes les comparaisons deux à deux à l'aide d'un test *t* multiple. Ces études statistiques vont nous permettre de connaître la significativité des inductions de CYP 3A7 en fonction des inducteurs étudiés. Les différents degrés de significativité sont :

- (*), $p \leq 0,05$
- (**), $p \leq 0,01$
- (***) $, p \leq 0,001$ avec $n=3$

Chapitre 4

RESULTATS

Résultats

1 Tests de cytotoxicité

Test MTT :

	contrôle	RIF 10^{-5} M	DPH 10^{-7} M	DPH 10^{-6} M	DPH 10^{-5} M	MQ 10^{-7} M	MQ 10^{-6} M	MQ 10^{-5} M
Moyenne	1.709 100%	1.679 98.24%	1.627 95.20%	1.676 98.06%	1.371 80.22%	1.532 89.64%	1.703 99.64%	1.633 95.55%
Ecart type	0.032	0.018	0.011	0.043	0.027	0.100	0.066	0.006

Test d'exclusion au Bleu Trypan :

	contrôle	RIF 10^{-5} M	DPH 10^{-7} M	DPH 10^{-6} M	DPH 10^{-5} M	MQ 10^{-7} M	MQ 10^{-6} M	MQ 10^{-5} M
Moyenne	14.40 100%	13.03 90.48%	14.40 100%	13.77 95.62%	11.80 81.94%	15.07 104.65%	13.00 90.27%	17.80 123.61%
Ecart type	0.36	0.60	0.96	0.25	0.92	0.40	1.28	0.53

Après 18 à 24 heures de traitement, on constate une diminution de 20% du nombre de cellules, uniquement pour la diphenhydramine à la dose de $10^{-5}M$.

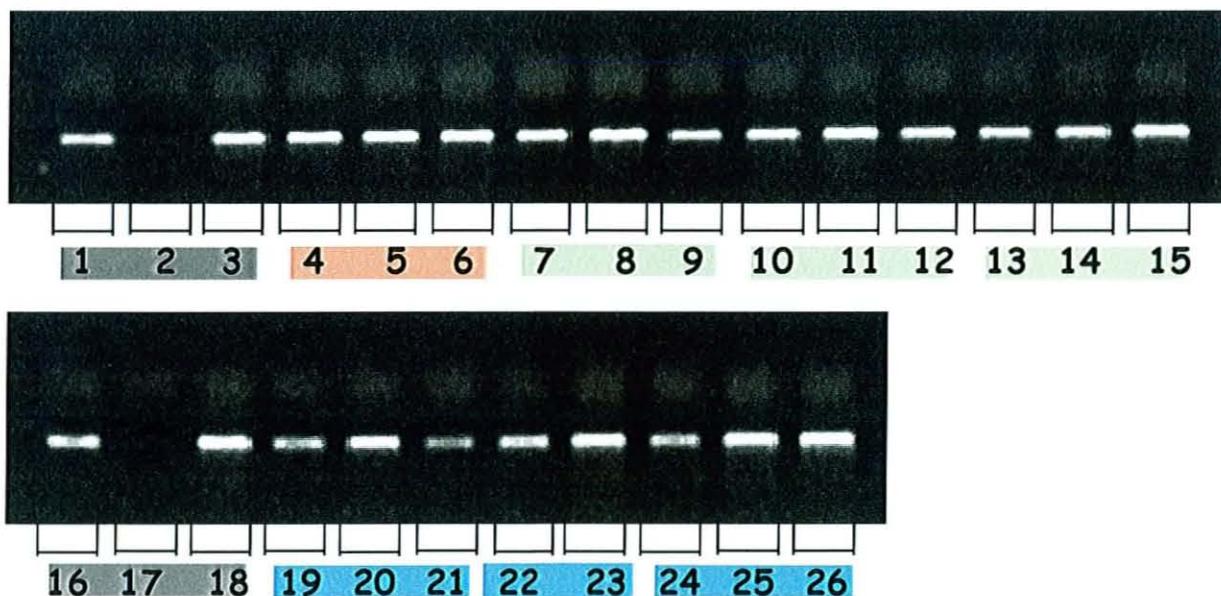
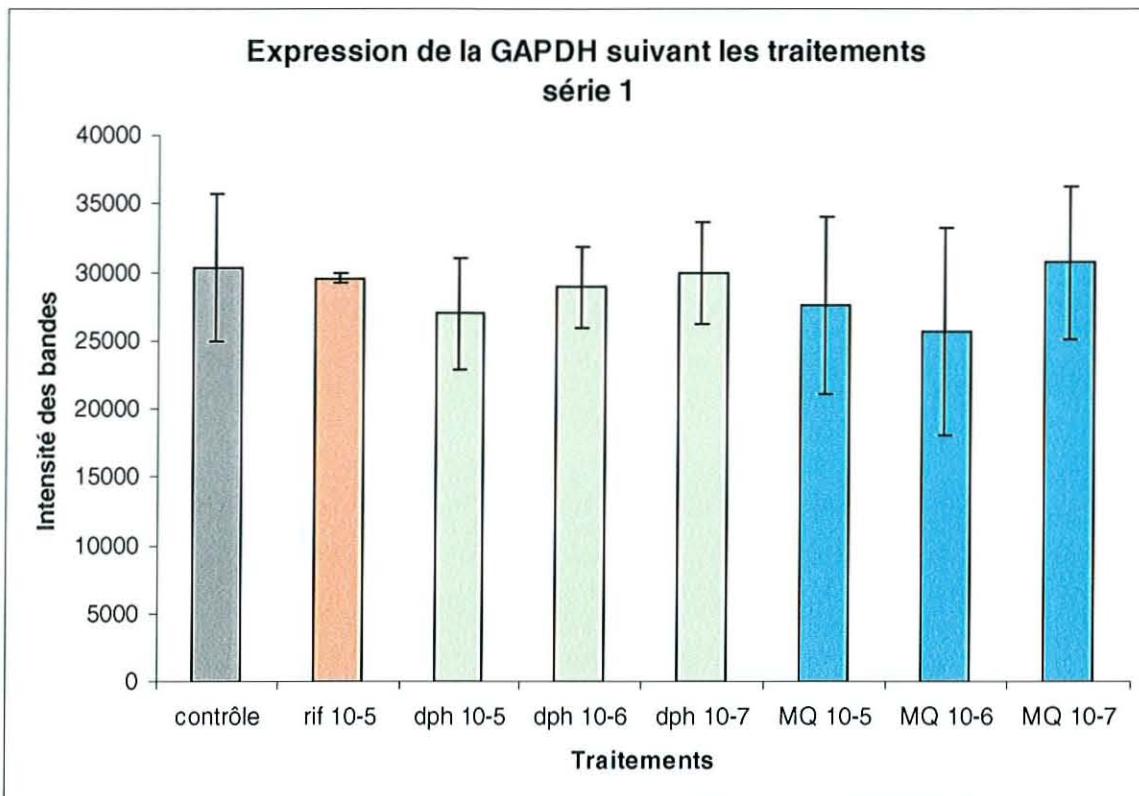
Il y a concordance entre les deux techniques.

2 Utilisation de la GAPDH comme contrôle

Pour que le contrôle GAPDH soit valable, l'expression de la GAPDH ne doit pas varier en fonction du traitement.

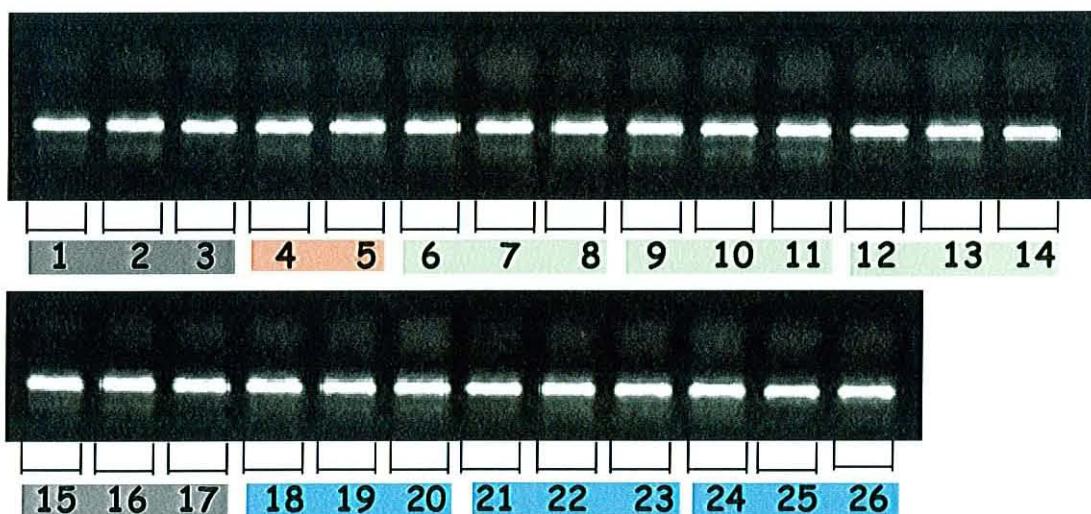
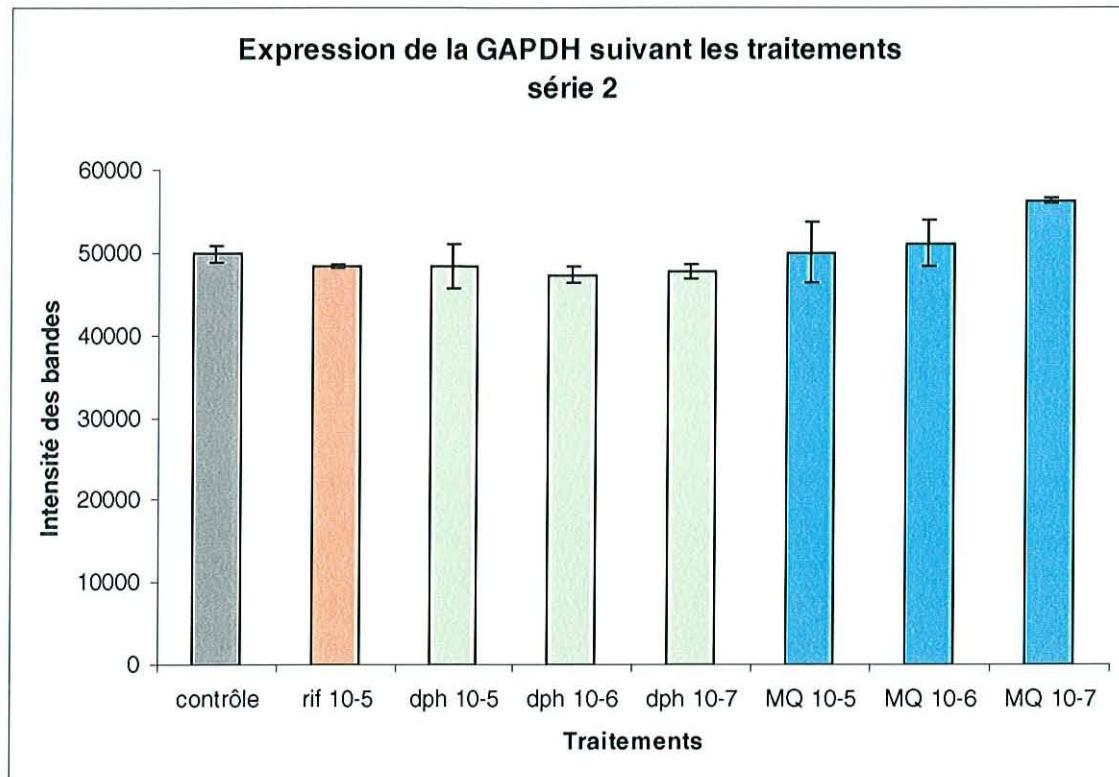
Nous avons donc vérifié que l'expression de la GAPDH ne variait pas suivant les traitements utilisés dans notre étude.

Les résultats sont satisfaisants et sont présentés dans les figures suivantes



1, 2, 3: contrôle
 4, 5, 6: rifampicine 10^{-5} M
 7, 8, 9: diphenhydramine 10^{-5} M
 10, 11, 12: diphenhydramine 10^{-6} M
 13, 14, 15: diphenhydramine 10^{-7} M

16, 17, 18: contrôle
 19, 20, 21: méthqualone 10^{-5} M
 22, 23: méthqualone 10^{-6} M
 24, 25, 26: méthqualone 10^{-7} M



1, 2, 3: contrôle

4, 5: rifampicine 10^{-5} M

6, 7, 8: diphenhydramine 10^{-5} M

9, 10, 11: diphenhydramine 10^{-6} M

12, 13, 14: diphenhydramine 10^{-7} M

15, 16, 17: contrôle

18, 19, 20: méthqualone 10^{-5} M

21, 22, 23: méthqualone 10^{-6} M

24, 25, 26: méthqualone 10^{-7} M

3 Les inductions.

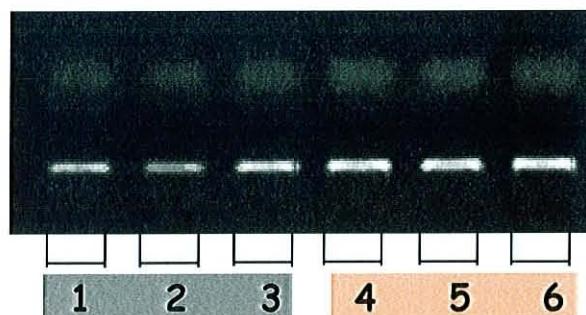
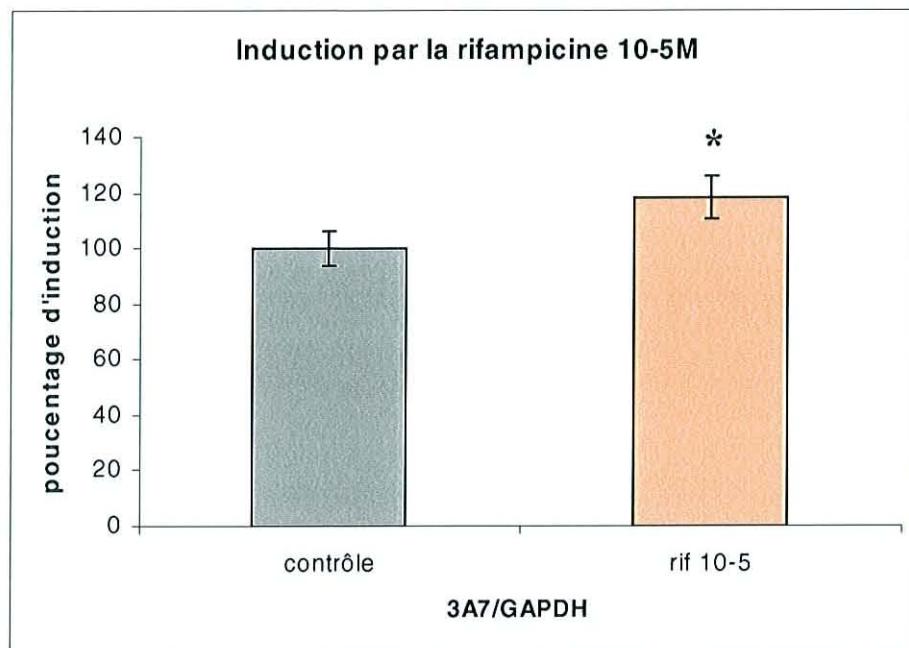
Ces travaux consistent en l'étude de l'induction du cytochrome P 450 3A7 par différents inducteurs. L'intensité des bandes est rapportée à l'intensité des bandes du contrôle GAPDH.

3.1 La rifampicine.

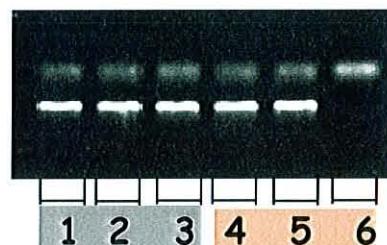
La rifampicine étant un inducteur de référence pour le cytochrome 3A7, il a été vérifié que cette induction était reproductible dans cette étude. Les résultats figurent sur la figure suivante.

La rifampicine à une concentration de $10^{-5}M$ augmente de façon significative le rapport CYP 3A7/GAPDH d'un facteur 1.3.

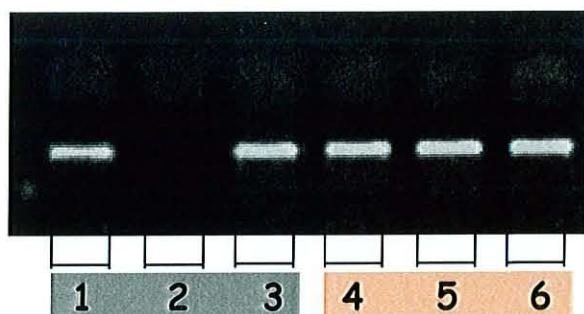
Le résultat obtenu est un peu faible par rapport à ce que nous attendions. En effet, la rifampicine est un inducteur puissant du CYP 3A (35). A une concentration de $10^{-5}M$, la rifampicine augmente généralement le rapport CYP 3A7/GAPDH d'environ un facteur 3 (C.Bertrand, 2000 travaux non publiés).



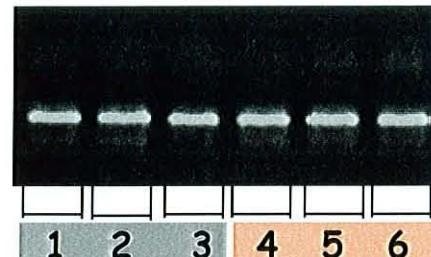
CYP 3A7



1, 2, 3: contrôle
4, 5, 6: rifampicine 10-5M



GAPDH

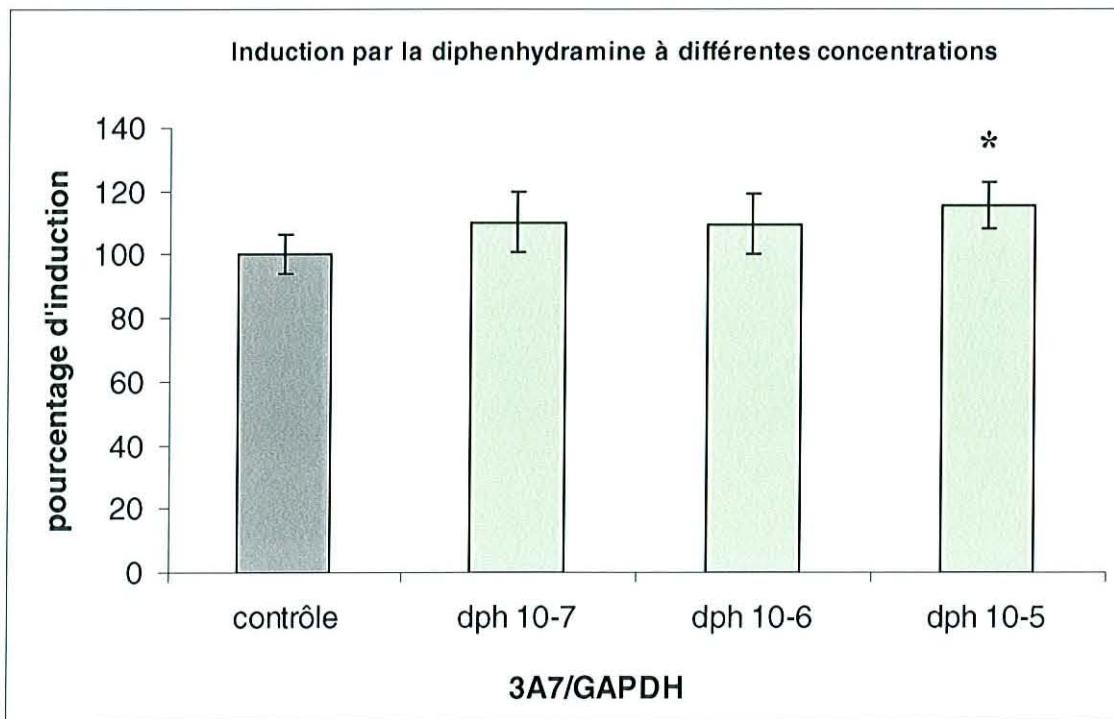


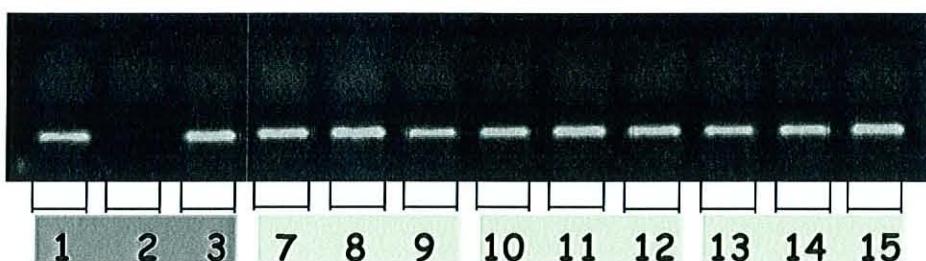
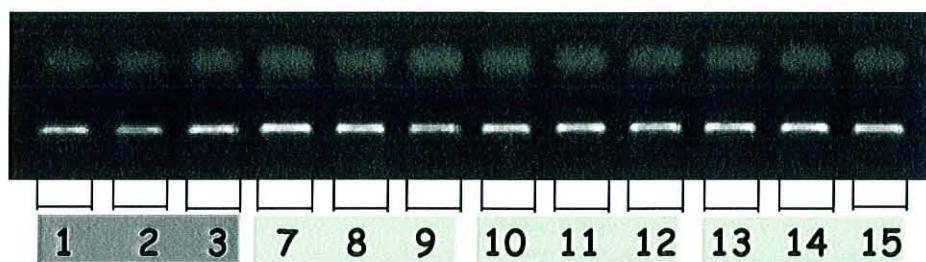
3.2 La diphenhydramine.

L'effet de la diphenhydramine à différentes concentrations sur la transcription du cytochrome P450 3A7 a été étudié. Les résultats sont présentés sur la figure suivante.

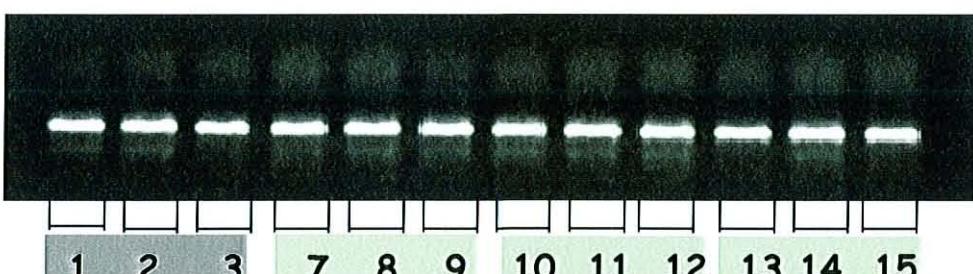
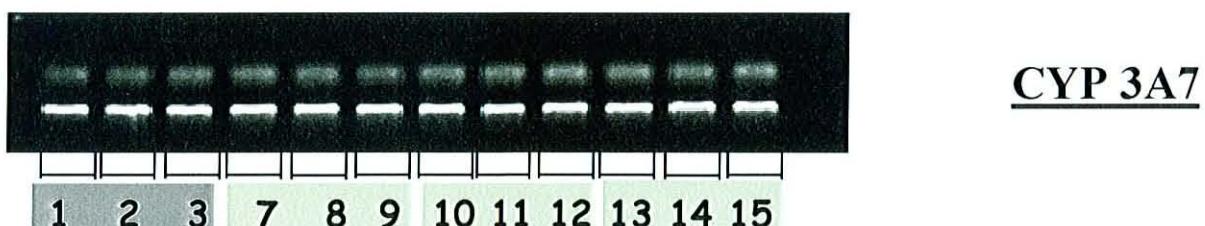
La diphenhydramine augmente le rapport CYP 3A7/GAPDH d'environ un facteur 1.25. Ce résultat est significatif à 5%.

La diphenhydramine induit le cytochrome P450 3A7.





1, 2, 3: contrôle
7, 8, 9: diphenhydramine 10^{-5} M
10, 11, 12: diphenhydramine 10^{-6} M
13, 14, 15: diphenhydramine 10^{-7} M



3.3 La méthqualone.

Pour l'étude de l'induction du CYP 3A7 par la méthqualone, deux séries de produits de RT (série 1 et 2) ont été réalisées.

Nous avons dû ajuster les conditions de PCR à notre étude :

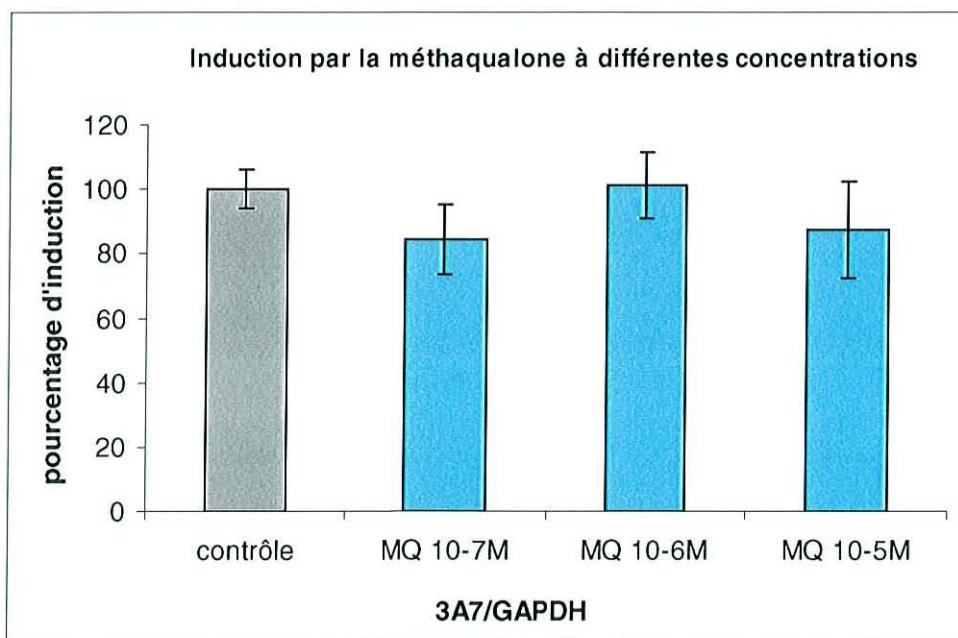
- Utilisation de 4 µl de produits de RT.

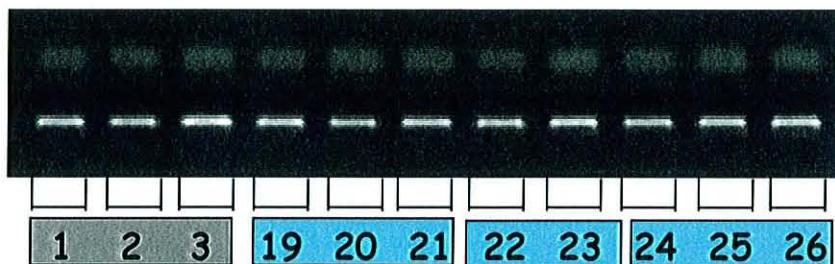
En effet la culture et les traitements des cellules ayant été faits en plaque 6 puits, la quantité d'ARN récupéré est plus faible que lors des traitements en boîtes de pétri.

- Nombre de cycles abaissé à 32.

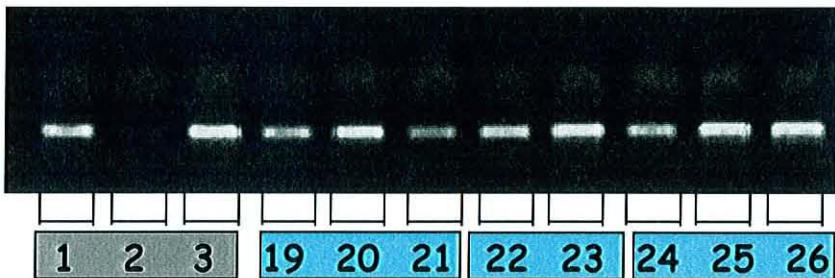
Au-delà de 32 cycles nous avions un problème de saturation.

Les résultats obtenus sont les suivants



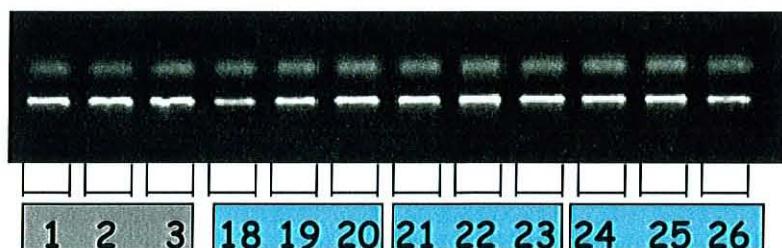


CYP 3A7

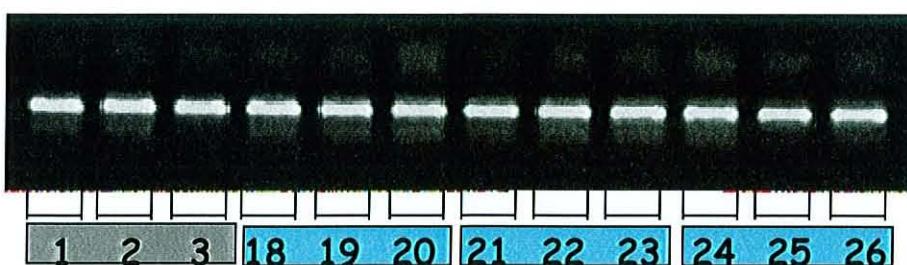


GAPDH

1, 2, 3: contrôle
19, 20, 21: méthqualone 10⁻⁵M
22, 23: méthqualone 10⁻⁶M
24, 25, 26: méthqualone 10⁻⁷M



CYP 3A7



GAPDH

Chapitre 5

DISCUSSION / CONCLUSION

Discussion / Conclusion

L'objectif de ce travail était de vérifier par une étude *in vitro* l'existence d'une induction de CYP 3A4 par la méthqualone et par la diphenhydramine. Utilisées en Suisse en association dans la spécialité TOQUILONE compositum®, la méthqualone et la diphenhydramine sont incriminées dans plusieurs cas de syndromes de sevrage aux opiacés chez des patients sous traitements de substitution à la méthadone. En effet, l'équipe du Docteur CB.EAP, Département de Psychiatrie adulte à Lausanne, constate qu'un usage abusif et périodique de TOQUILONE® lors de traitement méthadone peut conduire à ce syndrome de manque. Le temps de latence avant l'apparition des premiers symptômes étant en accord avec un mécanisme d'induction, et la méthadone étant essentiellement métabolisée par le CYP 3A4 (67), nous avons tenté de mettre en évidence dans cette étude *in vitro*, l'augmentation de la synthèse de cette enzyme après traitements par la méthqualone et par la diphenhydramine à différentes concentrations.

Le modèle HepG2, lignée d'hépatocarcinomes d'origine humaine, choisi pour ce travail est très souvent utilisé dans l'étude du métabolisme des médicaments. Les cellules HepG2 sont en effet de culture facile et conservent certaines des propriétés des hépatocytes, notamment en matière de régulation.

Les cellules HepG2 n'expriment pas ou peu le *CYP 3A4*, mais expriment *CYP 3A7* (32). *CYP 3A7* est inductible dans ce modèle cellulaire (49). Il possède 91% d'homologie de séquences avec *CYP 3A4* au niveau de la région 5' flanquante (48). La qualité d'induction de *CYP 3A7* n'est pas comparable quantitativement à celle de *CYP 3A4*, car la variation de deux acides nucléiques au niveau des séquences ER6 est responsable d'une plus faible réponse de *CYP 3A7* à l'induction. En conséquence, la réponse à l'induction de CYP 3A obtenue *in vitro* pourrait être plus faible que celle observée *in vivo* (cas cliniques).

Les tests de viabilité cellulaire nous ont permis de vérifier qu'aucune cytotoxicité due aux traitements ne modifiait l'interprétation des études d'induction. En effet, nous avons constaté que seule la dose de diphenhydramine 10^{-5} M affectait la viabilité cellulaire, avec seulement

une diminution d'environ 20 % du nombre de cellules après 18 à 24 heures de traitement. Ceci ne peut affecter en aucune mesure les résultats obtenus.

Durant notre travail, les phénomènes de saturation ayant été écartés, nous n'avons pas mis en évidence d'induction de CYP 3A7 lors de traitements par la méthqualone. Pourtant, lors d'une étude ancienne chez le rat, il avait été démontré que l'administration répétée pendant cinq jours de méthqualone augmentait l'aminopyrine déméthylase, ceci suggérant effectivement une induction du système enzymatique CYP 3A4 (94).

Il existe cependant des différences de réponse à l'induction entre les espèces (106). En effet, CYP 3A est induit par la dexaméthasone chez le rat, le lapin et chez l'homme. Par contre, le 16- α carbonitrile (PCN), anti-glucocorticoïde induit seulement CYP 3A chez le rat. D'autre part, la rifampicine induit CYP 3A chez le lapin et chez l'homme, mais pas chez le rat. Ces différences de réponse à l'induction sont dues, non pas à la différence d'éléments de réponse à l'ADN existant entre les espèces (ER6 chez l'homme et le lapin, DR3 chez le rat), mais à une spécificité d'espèces des récepteurs nucléaires. En effet, il existe 96% d'homologie de séquences en acides aminés entre le domaine de fixation à l'ADN (DBD) du récepteur nucléaire PXR du rat et celui de l'homme. Par contre, il y a seulement 75% d'homologie de séquences en acides aminés entre leur domaine de liaison au ligand (LDB). C'est cette variation au niveau du LDB qui est responsable de la différence de réponse à l'induction entre les espèces. Il existe donc une spécificité de ligand selon l'espèce. Ceci expliquerait la différence de résultat obtenu pour la méthqualone chez le rat et dans notre étude *in vitro* menée sur des hépatocarcinomes humains.

Les résultats obtenus pour la diphenhydramine, en absence de phénomènes de saturation montre une induction faible mais significative de CYP 3A pour une concentration de 10^{-5} M, avec une augmentation du rapport CYP 3A7/GAPDH d'un facteur 1.25. La faiblesse de cette induction, malgré les limites du modèle utilisé conduit à plusieurs hypothèses :

- La diphenhydramine est un inducteur faible par PXR,
- La diphenhydramine induit CYP 3A4 par le récepteur CAR et non pas par PXR.

Le récepteur nucléaire PXR est impliqué dans la régulation de CYP 3A. Son activation par différents xénobiotiques et notamment par la rifampicine conduit à l'induction de CYP 3A.

Le mécanisme de cette induction met en jeu la formation d'un hétérodimère PXR-RXR se liant à l'élément de réponse ER6 du promoteur du gène.

Nous avons obtenu une induction significative de CYP 3A7 après traitement par rifampicine à la concentration de 10^{-5} M. La rifampicine étant un inducteur puissant des CYP 3A (35), l'augmentation du rapport CYP 3A7/GAPDH d'un facteur 1.3 est un peu faible par rapport à

ce qui était attendu. Dans une étude récente Pascussi *et coll.*, 2000, montre l'implication de la rifampicine dans l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes, eux-mêmes mis en jeu dans l'induction de CYP 3A (27). Le modèle cellulaire HepG2 possède peu de récepteurs aux glucocorticoïdes et est peu sensible à ses phénomènes d'induction (107).

D'autre part, des données anciennes au laboratoire, ont montré que le phénobarbital induisait CYP 3A7 dans les cellules HepG2. Des études récentes décrivent en effet, l'implication du phénobarbital et du récepteur CAR dans l'induction de CYP 3A (28). De la même façon nous ne pouvons déterminer si l'induction de CYP 3A dans les cellules HepG2 par la méthqualone et la diphenhydramine implique l'activation du récepteur PXR ou l'activation des récepteurs PXR et GR, voire même l'activation du récepteur CAR.

Pour cela, il faudrait déterminer l'identité des récepteurs activés et examiner l'induction éventuelle de CYP 2B6 et de CYP 2C (en particulier 2C9).

Finalement ces résultats nous paraissent avoir une valeur indicative et une preuve de cette induction devrait être obtenue en ayant recours à quelques échantillons d'hépatocytes humains en culture.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- (1) BATT AM., LIVERTOUX MH. Et FERRARI L.
TOXICOLOGIE : Les biotransformations des médicaments et des toxiques
Tome 1, 2^{ème} édition, Le moniteur internat, 1999, 21-35
- (2) HASLER J., ESTABROOK R.W., MURRAY M., PIKULEVA.I., WATERMAN M., CAPDEVILA J., HILLA V., HELVIG C., FALCK J., FARRELL G., KAMINSKY L., SPIVACK S., BOITIER E., BEAUNE P.
Human cytochromes P450
Molecular Aspects of Medecine., 1999, 20, 1-137
- (3) NEBERT D.W., ADESNICK M., COON M.J., ESTABROOK R.W., GONZALEZ F.J., GUENGERICH F.P., GUNSAULUS I.C., JOHNSON E.F., KEMPER B., LEWIN W., PHILLIPS I.R., SATO R., WATERMAN M.
The P450 Gene Superfamily : Recommended Nomenclature
DNA., 1987, 6, 1-11
- (4) Disponible sur Internet : < <http://www.drnelsong.utmem.edu/nelsonhome.page.html> >
- (5) GUENGERICH F.P., HOSEA N.A., JOHNSON W.W., GILLAM E.M.J., SHIMADA T.
Catalytic properties of cytochrome P450 3A enzymes
Microsomes and Drug Oxidations, Proceedings of the 12th International Symposium, 1998
- (6) CHALOUPKA K., KRISHNAN V., SAFE S.
Polynuclear aromatic hydrocarbon carcinogens as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: role of the Ah receptor.
Carcinogenesis. 1992 Dec;13(12):2233-9.
- (7) SESARDIC D., BOOBIS A.R., MURRAY B.P., MURRAY S., SEGURA J., DE LA TORRE R., DAVIES DS.
Furafylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P4501A2 in man.
Br J Clin Pharmacol. 1990 Jun;29(6):651-63.
- (8) BROSEN K., SKJELBO E., RASMUSSEN B.B., POULSEN H.E., LOFT S.
Fluvoxamine is a potent inhibitor of cytochrome P4501A2.
Biochem Pharmacol. 1993 Mar 24;45(6):1211-4.
- (9) RETTIE A.E., KORZEKWA K.R., KUNZE K.L., LAWRENCE R.F., EDDY A.C., AOYAMA T., GELBOIN H.V., GONZALEZ F.J., TRAGER W.F..
Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions.
Chem Res Toxicol. 1992 Jan-Feb;5(1):54-9.

- (10) DOECKE C.J., VERONESE M.E., POND S.M., MINERS J.O., BIRKETT D.J., SANSON L.N., MC MANUS M.E.
Relationship between phenytoin and tolbutamide hydroxylations in human liver microsomes.
Br J Clin Pharmacol. 1991 Feb;31(2):125-30.
- (11) CRIBB A.E., SPIELBERG S.P., GRIFFIN G.P.
N4-hydroxylation of sulfamethoxazole by cytochrome P450 of the cytochrome P4502C subfamily and reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine in human and rat hepatic microsomes.
Drug Metab Dispos. 1995 Mar;23(3):406-14.
- (12) TANG C ;, SHOU M., MEI Q., RUSHMORE T.H., RODRIGUES A.D..
Major role of human liver microsomal cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) in the oxidative metabolism of celecoxib, a novel cyclooxygenase-II inhibitor.
J Pharmacol Exp Ther. 2000 May;293(2):453-9.
- (13) BARBEAU A., CLOUTIER T., ROY M., PLASSE L., PARIS S., POIRIER J.
Ecogenetics of Parkinson's disease: 4-hydroxylation of debrisoquine.
Lancet. 1985 Nov 30;2(8466):1213-6.
- (14) RODDAM P.L., ROLLINSON S., KANE E., ROMAN E., MOORMAN A., CARTWRIGHT R., MORGAN G.J.
Poor metabolizers at the cytochrome P450 2D6 and 2C19 loci are at increased risk of developing adult acute leukaemia.
Pharmacogenetics. 2000 Oct;10(7):605-15.
- (15) IVANISEVIĆ A.M., PETRINOVIC R., CURCIĆ I.
The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene polymorphism among breast and head and neck cancer patients.
Clin Chim Acta. 2000 Jun;296(1-2):101-9.
- (16) VIVAN M., PLACIDO F., REGATEIRO F.J.
Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to haematological neoplasias.
Carcinogenesis. 1999 Jul;20(7):1225-9.
- (17) BON M.A., JANSEN STEUR E.N., DE VOS R.A., VERMES I.
Neurogenetic correlates of Parkinson's disease: apolipoprotein-E and cytochrome P450 2D6 genetic polymorphism.
Neurosci Lett. 1999 May 7;266(2):149-51.
- (18) LE COUTEUR D.G.
The association between polymorphisms in the cytochrome P-450 2D6 gene and Parkinson's disease: a case-control study and meta-analysis.
J Neurol Sci. 1997 Dec 9;153(1):50-3.

- (19) KEIPES M., HENTGES F., VIEREGGE P., METZ H.
Genetic variability of the CYP 2D6 gene is not a risk factor for sporadic
Parkinson's disease.
Ann Neurol. 1996 Sep;40(3):463-5.
- (20) LAETHEM R.M., BALAZY M., FALCK J.R., LAETHEL C.L., KOOP D.R.
Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-
inducible cytochrome P450 2E1
J.Biol.Chem., 1993, 268, 12912-12918
- (21) SHIMADA T., YAMAZAKI H., MIMURA M., INUI Y., GUENGERICH F.P.
Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in
the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver
microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians.
J Pharmacol Exp Ther. 1994 Jul;270(1):414-23.
- (22) LI A.P., KAMINSKI D.L., RASMUSSEN A.
Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4.
Toxicology. 1995 Dec 15;104(1-3):1-8. Review.
- (23) EVANS W.E., RELLING M.V.
Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics.
Science. 1999 Oct 15;286(5439):487-91. Review.
- (24) THUMMEL K.E., WILKINSON G.R.
In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A.
Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1998;38:389-430. Review.
- (25) LEHMANN J.M., MCKEE D.D., WATSON M.A., WILLSON T.M.,
MOORE J.T., KLIEWER S.A.
The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate
CYP3A4 gene expression and cause drug interactions.
J Clin Invest. 1998 Sep 1;102(5):1016-23.
- (26) KLIEWER S.A., MOORE J.T., WADE L., STAUDINGER J.L.,
WATSON M.A., JONES S.A., MCKEE D.D., OLIVER B.B., WILLSON T.M.,
ZETTERSTROM R.H., PERLMANN T., LEHMANN J.M.
An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid
signaling pathway.
CELL. 1998 JAN 9;92(1):73-82.
- (27) PASCUSSI J.M., DROCOURT L., FABRE J.M., MAUREL P., VILAREM M.J.
Dexamethasone Induces Pregnan X Receptor and Retinoid X Receptor- α Expression
in Human Hepatocytes : Synergistic Increase of CYP 3A4 Induction by Pregnan X
Receptor Activators
Molecular Pharmacology, 2000, 58, 361-372

- (28) XIE W., BARWICK J.L., SIMON C.M., PIERCE A.M., SAFE S., BLUMBERG B., GUZELIAN P.S., EVANS R.M.
Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR.
Genes Dev. 2000 Dec 1;14(23):3014-23.
- (29) KIVISTO K.T., BOOKJANS G., FROMM M.F., GRIESE E.U., MUNZEL P., KROEMER H.K.
Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue.
Br J Clin Pharmacol. 1996 Sep;42(3):387-9.
- (30) KIVISTO K.T., GRIESE E.U., FRITZ P., LINDER A., HAKKOLA J., RAUNIO H., BEAUNE P., KROEMER H.K.
Expression of cytochrome P 450 3A enzymes in human lung: a combined RT-PCR and immunohistochemical analysis of normal tissue and lung tumours.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1996 Jan;353(2):207-12.
- (31) DOMANSKI T.L., FINTA C., HALPERT J.R. AND ZAPHIROPOULOS P.G.
cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450.
Mol. Pharmacol. 59:386- 392, 2001.
- (32) SCHUETZ J.D., BEACH D.L., GUZELIAN P.S.
Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver.
Pharmacogenetics. 1994 Feb;4(1):11-20.
- (33) BERTZ R.J., GRANNEMAN G.R.
Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions.
Clin Pharmacokinet. 1997 Mar;32(3):210-58. Review.
- (34) EISELT R., DOMANSKI T.L., ZIBAT A., MUELLER R., PRESECAN-SIEDEL E., HUSTERT E., ZANGER U.M., BROCKMOLLER J., KLENK H.P., MEYER U.A., KHAN K.K., HE Y.A., HALPERT J.R., WOJNOWSKI L.
Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants.
Pharmacogenetics. 2001 Jul;11(5):447-58.
- (35) PELKONEN O., MAENPAA J., TAAVITSAINEN P., RAUTIO A., RAUNIO H.
Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes.
Xenobiotica. 1998 Dec;28(12):1203-53. Review. No abstract available.
- (36) GUENGERICH F.P.
Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism.
Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1999;39:1-17. Review.

- (37) WAXMAN D.J., LAPENSON D.P., AOYAMA T., GELBOIN H.V., GONZALEZ F.J., KORZEKWA K.
Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s.
Arch Biochem Biophys. 1991 Oct;290(1):160-6.
- (38) HARLOW G.R., AND HALPERT, J.R.
Analysis of human cytochrome P450 3A4 cooperativity: Construction and characterization of a site-directed mutant that displays hyperbolic steroid hydroxylation kinetics.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6636-6641, 1998.
- (39) SHOU M., GROGAN J., MANCEWICZ J.A., KRAUSZ K.W., GONZALEZ F.J., GELBOIN H.V., KORZEKWA K.R..
Activation of CYP3A4: evidence for the simultaneous binding of two substrates in a cytochrome P450 active site.
Biochemistry. 1994 May 31;33(21):6450-5.
- (40) WANG R.W., NEWTON D.J., LIU N., ATKINS W.M., LU A.Y..
Human cytochrome P-450 3A4: in vitro drug-drug interaction patterns are substrate-dependent.
Drug Metab Dispos. 2000 Mar;28(3):360-6.
- (41) GOLDFARB P.
Molecular mechanisms of cytochrome P-450 gene regulation.
Biochem Soc Trans. 1990 Feb;18(1):30-2. Review.
- (42) GONZALES F.J., FERNANDEZ-SALGUERO P.
The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice.
Drug Metab Dispos. 1998 Dec;26(12):1194-8. Review.
- (43) MANGELSDORF D.J., EVANS R.M.
The RXR heterodimers and orphan receptors.
Cell. 1995 Dec 15;83(6):841-50. Review.
- (44) WATKINS R.E., WISELY G.B., MOORE L.B., COLLINS J.L., LAMBERT M.H., WILLIAMS S.P., WILLSON T.M., KLIEWER S.A., REDINBO M.R.
The human nuclear xenobiotic receptor PXR : structural determinants of directed promiscuity
Science, 2001, 22, 292(5525) :2329-33
- (45) FORMAN B.M., UMESONO K., CHEN J., EVANS R.M.
Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors.
Cell. 1995 May 19;81(4):541-50.

- (46) KLIJEWER S.A., UMESONO K., NOONAN D.J., HEYMAN R.A., EVANS R.M.
 Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling
 pathways through heterodimer formation of their receptors.
Nature. 1992 Aug 27;358(6389):771-4.
- (47) WILLY P.J., UMESONO K., ONG E.S., EVANS R.M.,
 HEYMAN R.A., MANGELSDORF D.J.
 LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway.
Genes Dev. 1995 May 1;9(9):1033-45.
- (48) HASHIMOTO H., TOIDE K., KITAMURA R., FUJITA M., TAGAWA S.,
 ITOH S., KAMATAKI T.
 Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human
 livers, and its transcriptional control.
Eur J Biochem. 1993 Dec 1;218(2):585-95.
- (49) SCHUETZ E.G., SCHUETZ J.D., STREM S.C., THOMPSON H.T.,
 FISCHER R.A., MOLOWA D.T., LI D., GUZELIAN P.S.
 Regulation of human liver cytochromes P450 in family 3A in primary and continuous
 culture of human hepatocytes.
Hepatology, 1993, 18(5), 1254-62.
- (50) SYNOLD T.W., DUSSAULT I., FORMAN B.M.
 The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and
 efflux.
Nat Med. 2001 May;7(5):584-90.
- (51) TUCKERMANN J.P., REICHARDT H.M., ARRIBAS R., RICHTER K.H.,
 SCHUTZ G., ANGEL P.
 The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates
 repression of AP-1-dependent genes in skin.
J Cell Biol. 1999 Dec 27;147(7):1365-70.
- (52) REICHARDT H.M., TUCKERMANN J.P., GOTTLICHER M., VUJIC M.,
 WEIH F., ANGEL P., HERRLICH P., SCHUTZ G.
 Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the
 glucocorticoid receptor.
EMBO J. 2001 Dec 17;20(24):7168-7173.
- (53) FORMAN B.M., TZAMELI I., CHOI H.S., CHEN J., SIMHA D., SEOL W.,
 EVANS R.M., MOORE D.D.
 Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta.
Nature. 1998 Oct 8;395(6702):612-5.
- (54) Disponible sur INTERNET : <http://www2.biam2.org/www/sub_1399.htm>
- (55) D.M. PATEL, A.J. VISALLI, J.J. ZALIPSKY, N.H. REAVY-CANTWELL
 ANALYTIC PROFILES OF DRUG SUBSTANCES : Methaqualone
 Ed by Klaus Florey, vol 4, 245-267

- (56) I.J. HOLCOMB, S.A. FUSARI
ANALYTIC PROFILES OF DRUG SUBSTANCES :
Diphenhydramine hydrochloride
Ed by Klaus Florey, vol 3, 173-232
- (57) CHIOU W.L., ATHANIKAR N.K., HUANG S.M.
Long half-life of chlorpheniramine
N Engl J Med, 1979, 300 :501
- (58) HUANG S.M., ATHANIKAR N.K., SRIDHAR K., HUANG Y.C., CHIOU W.L.
Pharmacokinetics of chlorpheniramine after intravenous and oral administration in normal adults
Eur J Clin Invest, 1982, 22 :359-365
- (59) HAMELIN B.A., BOUAYAD A., DROLET B., GRAVEL A., TURGEON J.
In vitro Characterization of Cytochrome P450 2D6 Inhibition by Classic Histamine H1 Receptor Antagonists
Drug Metab and Dispos, 1998, 26 :536-539
- (60) WOLFF A., HAY A., RAISTRICK D.
High-dose methadone and the need for drug measurements in plasma
Clin Chem, 1991, 37, 1651-1664
- (61) VIGANO A., FAN D., BRUERA E.
Individualizes use of methadone and opioid rotation in the comprehensive management of cancer pain associated with poor prognostic indicators
Pain, 1996, 67, 115-119
- (62) GARRIDO M.J, TROCÓNIZ I.F
Methadone : a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties
J Pharmacol Toxicol, 1999, 42, 61-66
- (63) SÄWE J.
High-dose morphine and methadone in cancer patients : clinical pharmacokinetic considerations of oral treatment
Clin Pharmacokinet, 1986, 11, 87-106
- (64) WOLFF K., HAY A.W.M., RAISTRICK D., CALVERT R.
Steady-state pharmacokinetics of methadone in opioid addicts
Eur J Clin Pharmacol, 1993, 44, 189-194
- (65) INTURRISI C.E., COLBURN W.A., KAIKO R.F., HOODE R.W., FOLEY K.M.
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methadone in patients with chronic pain
Clin Pharmacol Ther, 1987, 41, 392-401
- (66) R.H. BISHARA
ANALYTIC PROFILES OF DRUG SUBSTANCES : Methadone hydrochloride
Ed by Klaus Florey, vol 3, 365-439

- (67) FOSTER D.J., SOMOGYI A.A., BOCHNER F.
Methadone N-demethylation in human liver microsomes: lack of stereoselectivity and involvement of CYP3A4.
Br J Clin Pharmacol. 1999 Apr;47(4):403-12.
- (68) ANGGARD E., GUNNE L.M., HOMSTRAND J., MCMAHON R.E., SANDBERG C.G., SULLIVAN H.R.
Disposition of methadone in methadone maintenance.
Clin Pharmacol Ther. 1975 Mar;17(3):258-66.
- (69) HINDMARSH K.W., HAMON N.W., LEGATT D.F., WALLACE S.M.
Effect of diphenhydramine on methaqualone metabolism: an in vitro study.
J Pharm Sci. 1978 Nov;67(11):1547-50.
- (70) HINDMARSH K.W., WALLACE S.M., SCHNEIDER C.B., KORCHINSKI E.D.
Methaqualone-diphenhydramine interaction study in humans.
J Pharm Sci. 1983 Feb;72(2):176-80.
- (71) ALI B., GUPTA K.P., KUMAR A., BHARGAVA K.P.
Differential stimulation of diphenhydramine, pethidine, morphine and aniline metabolism by chronic methaqualone treatment.
Pharmacology. 1980;20(4):181-7.
- (72) SIMONS F.E.
H1-receptor antagonists. Comparative tolerability and safety.
Drug Saf. 1994 May;10(5):350-80. Review.
- (73) DE GROOT M.J., BIJLOO G.J., MARTENS B.J., VAN ACKER F.A., VERMEULEN N.P.
A refined substrate model for human cytochrome P450 2D6.
Chem Res Toxicol. 1997 Jan;10(1):41-8.
- (74) GLASSMAN J.N., DUGAS J.E., TSUANG M.T., LOYD D.W.
Idiosyncratic pharmacokinetics complicating treatment of major depression in an elderly woman.
J Nerv Ment Dis. 1985 Sep;173(9):573-6.
- (75) HAMELIN B.A., BOUAYAD A., METHOT J., JOBIN J., DESGAGNES P., POIRIER P., ALLAIRE J., DUMESNIL J., TURGEON J.
Significant interaction between the nonprescription antihistamine diphenhydramine and the CYP2D6 substrate metoprolol in healthy men with high or low CYP2D6 activity.
Clin Pharmacol Ther. 2000 May;67(5):466-77.
- (76) LESSARD E., YESSINE M.A., HAMELIN B.A., GAUVIN C., LABBE L., O'HARA G., LEBLANC J., TURGEON J.
Diphenhydramine alters the disposition of venlafaxine through inhibition of CYP2D6 activity in humans.
J Clin Psychopharmacol. 2001 Apr;21(2):175-84.

- (77) IRIBARNE C., BERTHOU F., BAIRD S., DREANO Y., PICART D., BAIL J.P., BEAUNE P., MENEZ J.F.
Involvement of cytochrome P450 3A4 enzyme in the N-demethylation of methadone in human liver microsomes.
Chem Res Toxicol. 1996 Mar;9(2):365-73.
- (78) BERTSCHY G., BAUMANN P., EAP C.B., BAETTIG D.
Probable metabolic interaction between methadone and fluvoxamine in addict patients.
Ther Drug Monit. 1994 Feb;16(1):42-5.
- (79) EAP C.B., BERTSCHY G., POWELL K., BAUMANN P.
Fluvoxamine and fluoxetine do not interact in the same way with the metabolism of the enantiomers of methadone.
J Clin Psychopharmacol. 1997 Apr;17(2):113-7.
- (80) BERTSCHY G., EAP C.B., POWELL K., BAUMANN P.
Fluoxetine addition to methadone in addicts: pharmacokinetic aspects.
Ther Drug Monit. 1996 Oct;18(5):570-2.
- (81) DEMARIA P.A. JR, SEROTA R.D..
A therapeutic use of the methadone fluvoxamine drug interaction.
J Addict Dis. 1999;18(4):5-12.
- (82) HERRLIN K., SEGERDAHL M., GUSTAFSSON L.L., KALSO E.
Methadone, ciprofloxacin, and adverse drug reactions.
Lancet. 2000 Dec 16;356(9247):2069-70.
- (83) IRIBARNE C., BERTHOU F., CARLHANT D., DREANO Y., PICART D., LOHEZIC F., RICHE C.
Inhibition of methadone and buprenorphine N-dealkylations by three HIV-1 protease inhibitors.
Drug Metab Dispos. 1998 Mar;26(3):257-60.
- (84) HSU A., GRANNEMAN G.R., BERTZ R.J.
Ritonavir. Clinical pharmacokinetics and interactions with other anti-HIV agents.
Clin Pharmacokinet. 1998 Oct;35(4):275-91. Review.
- (85) HEELON M.W., MEADE L.B..
Methadone withdrawal when starting an antiretroviral regimen including nevirapine.
Pharmacotherapy. 1999 Apr;19(4):471-2.
- (86) ALTICE F.L., FRIEDLAND G.H., COONEY E.L.
Nevirapine induced opiate withdrawal among injection drug users with HIV infection receiving methadone.
AIDS. 1999 May 28;13(8):957-62.

- (87) BANO RODRIGO M.D., AGUJETAS RODRIGUEZ M., LOPEZ GARCIA M.L., GUILLEN LLERA J.L.
[Nevirapine induces abstinence symptoms in patients on a methadone maintenance program with HIV infection]
Rev Clin Esp. 2000 Jan;200(1):12-4. Spanish.
- (88) KREEK M.J., GARFIELD J.W., GUTJAHR C.L., GIUSTI L.M.
Rifampin-induced methadone withdrawal.
N Engl J Med. 1976 May 13;294(20):1104-6.
- (89) KREEK M.J., GUTJAHR C.L., GARFIELD J.W., BOWEN D.V., FIELD F.H.
Drug interactions with methadone.
Ann N Y Acad Sci. 1976;281:350-71. Review.
- (90) TONG T.G., POND S.M., KREEK M.J., JAFFERY N.F., BENOWITZ N.L.
Phenytoin-induced methadone withdrawal.
Ann Intern Med. 1981 Mar;94(3):349-51.
- (91) LIU S.J., WANG R.I.
Case report of barbiturate-induced enhancement of methadone metabolism and withdrawal syndrome.
Am J Psychiatry. 1984 Oct;141(10):1287-8.
- (92) NILSSON M.I., ANGGARD E., HOLMSTRAND J., GUNNE L.M.
Pharmacokinetics of methadone during maintenance treatment: adaptive changes during the induction phase.
Eur J Clin Pharmacol. 1982;22(4):343-9.
- (93) EAP C.B., FINKBEINER T., GASTPAR M., SCHERBAUM N.,
POWELL K., BAUMANN P.
Replacement of (R)-methadone by a double dose of (R,S)-methadone in addicts: interindividual variability of the (R)/(S) ratios and evidence of adaptive changes in methadone pharmacokinetics.
Eur J Clin Pharmacol. 1996;50(5):385-9.
- (94) REINKE L.A., O'CONNOR M.F., PIEPHO R.W., STOHS S.J.
A comparison of the inductive effects of phenobarbital, methaqualone, and mephylpyron on hepatic mixed function oxidase enzymes in the rat.
Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1975 May;11(1):45-53.
- (95) RAISTRICK D., HAY A., WOLFF K.
Methadone maintenance and tuberculosis treatment.
BMJ. 1996 Oct 12;313(7062):925-6. No abstract available.
- (96) BROWN L.S., SAWYER R.C., LI R., COBB M.N., COLBORN D.C.,
NARANG P.K.
Lack of a pharmacologic interaction between rifabutin and methadone in HIV-infected former injecting drug users.
Drug Alcohol Depend. 1996 Dec 2;43(1-2):71-7.

- (97) Disponible sur Internet : <http://www.eudra.org/emea.htm>
- (98) Disponible sur Internet : <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>
- (99) DOOSTDAR H, GRANT MH, MELVIN WT, WOLF CR and BURKE MD
The effects of inducing agents on cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase activities in human HepG2 hepatoma cells.
Biochem. Pharmacol., 1993, 46(4), 629-635.
- (100) ADEN DP, FOGEL A, PLOTKIN S, DAMJANOV I, KNOWLES BB
Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma cell line.
Nature (Lond), 1979, 282(5739), 615-616.
- (101) ANDREOU ER, PROKIPCAK RD
Analysis of human CYP7A1 mRNA decay in HepG2 cells by reverse transcription polymerase chain reaction.
Arch. Biochem. Biophys., 1998, 357(1), 137-146.
- (102) IRIBARNE C., DREANO Y., BARDOU L.G., MENEZ J.F., BERTHOU F.
Interaction of methadone with substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4.
Toxicology. 1997 Feb 14;117(1):13-23.
- (103) MOODY D.E., ALBURGES M.E., PARKER R.J., COLLINS J.M., STRONG J.M.
The involvement of cytochrome P450 3A4 in the N-demethylation of L-alpha-acetylmethadol (LAAM), norLAAM, and methadone.
Drug Metab Dispos. 1997 Dec;25(12):1347-53.
- (104) WU D., OTTON S.V., SPROULE B.A., BUSTO U., INABA T., KALOW W.,
SELLERS E.M.
Inhibition of human cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) by methadone.
Br J Clin Pharmacol. 1993 Jan;35(1):30-4.
- (105) DROCOURT L, PASCUSSI JM, ASSENAT E, FABRE JM, MAUREL P,
VILAREM MJ.
Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes.
Drug Metab Dispos. 2001 Oct;29(10):1325-31.
- (106) WRIGHTON S.A., SCHUETZ E.G., WATKINS P.B., MAUREL P.,
BARWICK J., BAILEY B.S., HARTLE H.T., YOUNG B., GUZELIAN P.
Demonstration in multiple species of inducible hepatic cytochromes P-450 and their mRNAs related to the glucocorticoid-inducible cytochrome P-450 of the rat.
Mol Pharmacol. 1985 Sep;28(3):312-21.

(107) BAUMANN H., JAHREIS G.P., MORELLA K.K.

Interaction of cytokine- and glucocorticoid-response elements of acute-phase plasma protein genes. Importance of glucocorticoid receptor level and cell type for regulation of the elements from rat alpha 1-acid glycoprotein and beta-fibrinogen genes.

J Biol Chem. 1990 Dec 25;265(36):22275-81.



DEMANDE D'IMPRIMATUR

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**présenté par **Elodie LANCERAUX**

Sujet : Induction du métabolisme (CYP 3A dépendant) de la méthadone par la méthqualone et la diphenhydramine

Jury :

Président : Mlle Anne-Marie BATT, Professeur

Juges : Dr Luc FERRARI, Maître de conférences

Dr. Chin B. EAP, Privat-Docent et Maître d'Enseignement et de Recherche,
Université de Lausanne

Vu,

Nancy, le 20 décembre 2001

Le Président du Jury

Mlle Anne-Marie BATT,
Professeur

Le Directeur de Thèse

Dr Luc FERRARI,
Maître de conférences

Vu et approuvé,

Nancy, le 3 janvier 2002

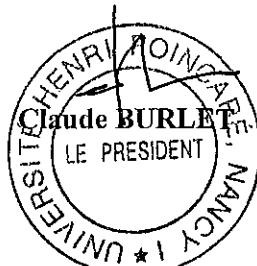
Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré-Nancy I,

Chantal FINANCE

Vu,

Nancy, le 10 janvier 2002
n° 1243

Le Président de l'Université Henri Poincaré-Nancy I



Impression réalisée
par le Service de Reprographie
de la Faculté de Pharmacie de Nancy

N° d'identification : 14 Manu 202 n° 7

TITRE :

INDUCTION DU METABOLISME (CYP 3A DEPENDANT) DE LA METHADONE PAR LA METHAQUALONE ET LA DIPHENHYDRAMINE

**Thèse soutenue le 29 janvier 2002
Par Elodie LANCERAUX**

RESUME :

Ce projet résulte d'une observation clinique faite par l'équipe du Docteur Chin.B EAP, Département Universitaire de Psychiatrie adulte à Lausanne. Une patiente bénéficiant d'une cure de substitution par la méthadone et abusant périodiquement de Toquilone® (somnifère commercialisé en Suisse associant méthaqualone et diphenhydramine) se plaignait de symptômes de manque aux opiacés chaque fois qu'elle prenait ce somnifère. Un dosage plasmatique de méthadone à une période avec ou sans Toquilone® a permis de démontrer une diminution des concentrations de méthadone suite à la prise de ce somnifère. Une discussion avec deux autres patients connus pour abuser par intermittences de Toquilone® a révélé que ces patients ressentaient effectivement des symptômes de manque aux opiacés lorsqu'ils prenaient ce produit, ces symptômes apparaissant environ 3 à 4 jours après le début des prises. L'hypothèse la plus vraisemblable est que cet événement est d'origine métabolique et que l'interaction entre la méthadone et la Toquilone ® résulte d'une induction de cytochrome P450 3A4. Le temps de latence avant l'apparition des symptômes de manque observés par ces patients est en accord avec le mécanisme d'induction du CYP 3A4 impliquant une synthèse *de novo* de l'enzyme.

MOTS CLES : Induction enzymatique, CYP 3A, Méthaqualone, In vitro

Directeur de Thèse	Intitulé du Laboratoire	Nature
Professeur Anne-Marie BATT	INSERM U 525 (équipe 4)	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>

Thèmes :

- | | |
|---------------------------|-----------------------------|
| 1. Sciences fondamentales | 2. Hygiène/Environnement |
| 3- Médicament | 4- Alimentation-Nutrition |
| 5- Biologie | 6- Pratique professionnelle |