

Université de Montréal

**Mise en place d'un nouveau test de perméabilité
membranaire à l'aide de la glycoprotéine-P reconstituée
dans des protéoliposomes**

par Aurore Flandrin

Axe Formulation et Analyse du Médicament
Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences Pharmaceutiques
option formulation et analyse du médicament

Août, 2016

© Aurore Flandrin, 2016

Résumé

Les membranes cellulaires jouent un rôle important dans l'absorption des médicaments et la distribution de ceux-ci dans le corps humain. Elles contiennent différents transporteurs membranaires qui sont responsables des profils pharmacocinétiques, d'innocuité et d'efficacité des xénobiotiques. Lors du développement d'un médicament, il s'avère donc indispensable, de prédire l'interaction des nouveaux composés avec les transporteurs présents dans l'organisme. Le but du projet de recherche est de créer un nouvel outil pour étudier le comportement de la glycoprotéine-P (P-gp), un transporteur membranaire responsable du rejet de nombreux composés, sur différents médicaments. Pour cela, un modèle non cellulaire est développé en utilisant des protéoliposomes : des liposomes dans lesquels des transporteurs sont incorporés.

La méthodologie consiste tout d'abord à produire, extraire et purifier la protéine d'intérêt à partir de deux systèmes d'expression : MDCK-MDR1 (cellules de chien transfectées avec le gène humain MDR1) et *Pichia pastoris* (levures) fin de déterminer les avantages et les limites de ces deux types cellulaires. Différentes méthodes de reconstitution dans des protéoliposomes ont ensuite été testées avec la P-gp obtenue. Puis, l'activité ATPasique de la P-gp reconstituée a été évaluée en présence de différents substrats.

Les protocoles de culture cellulaire, d'extraction et de purification des deux systèmes d'expression ont été implémentés avec succès au sein du laboratoire. Les résultats montrent que les rendements obtenus sont supérieurs avec les levures qu'avec les cellules de mammifère. En outre, *Pichia pastoris* offre les avantages d'être facile et rapide à cultiver et peu coûteux. Les premiers résultats d'activité ATPasique obtenus avec la P-gp reconstituée en protéoliposomes étaient prometteurs mais n'ont pas été reproduits en raison de la dégradation de la protéine membranaire. Les prochaines études du projet porteront sur un autre transporteur membranaire de la famille ABC, BCRP, une protéine de plus petite taille qui devrait montrer une plus grande stabilité pour mener à bien les tests.

Mots-clés : Protéoliposome, Glycoprotéine-P, MDCK-MDR1, *Pichia pastoris*, transporteurs membranaires, perméabilité membranaire

Abstract

Cellular membranes play an important role in the absorption and distribution of drugs in the human body. They contain different membrane transporters, which are responsible for the pharmacokinetic properties of drugs, as well as the safety and efficiency of their diffusion. When developing a new drug, it is thus of utmost importance to study the way that it will interact with the transporters present within the body. The aim of this study was to evaluate a new tool for measuring permeability in order to understand the function and mechanisms of P-glycoprotein (P-gp). P-gp is a transporter that is responsible for the rejection of many different compounds found in various drugs. This study thus seeks to use proteoliposomes to develop non-cellular models of membrane permeability including efflux and uptake transporters. This novel model of permeability will be utilized to study the underlying mechanisms of membrane permeability to xenobiotics.

The human P-gp was produced, extracted and purified using two different expression systems: MDCK-MDR1 cells (Madin-Darby canine kidney cells transfected with the human MDR1 gene) and *Pichia pastoris*. Both expression systems were studied in order to compare the strengths and weaknesses of each system. We then tested different methods of reconstituting the P-gp into proteoliposomes. Finally, we measured the level of ATPase activity using different substrates.

The protocols of cell culture, extraction and purification of both expression systems were accomplished in a laboratory during this study. These results demonstrated that expressing P-gp using yeast was more effective than that of mammalian cells. Furthermore, working with *Pichia pastoris* offers multiple advantages: expressing P-gp was easier, faster and cheaper than working with mammalian cells. The first measurements of ATPase activity using reconstituted P-gp proteoliposomes were promising, however they proved difficult to reproduce due to the possible degradation of the membrane protein. Further studies in this project will look to evaluate another ABC membrane transporter, BCRP. This smaller protein should prove to be more stable than P-gp, facilitating experimentation.

Keywords : Proteoliposome, P-glycoprotein, MDCK-MDR1, *Pichia pastoris*, membrane transporters, membrane permeability

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiii
CHAPITRE 1 : Introduction.....	1
1.1. Mise en contexte.....	1
1.2. Perméabilité membranaire.....	2
1.2.1. Passage transcellulaire.....	4
1.2.2. Passage paracellulaire.....	5
1.2.3. Transporteurs membranaires	5
1.2.4. Tests d'évaluation de la perméabilité membranaire.....	7
1.3. La Glycoprotéine-P	11
1.3.1. La famille ABC	11
1.3.2. Le gène MDR	11
1.3.3. Structure de la P-gp	12
1.3.4. Expression et localisation de la P-gp.....	14
1.3.5. Transport de la P-gp	14
1.3.6. Liaison et hydrolyse de l'ATP par le transporteur	15
1.4. Production et purification d'une protéine membranaire recombinante	17
1.4.1. Les différents systèmes d'expression	18
1.4.2. Lyse cellulaire	19
1.4.3. Extraction des membranes.....	20
1.4.4. Solubilisation des membranes	20

1.4.5. Purification de la protéine membranaire	21
1.5. Reconstitution des transporteurs membranaires dans des protéoliposomes	22
1.5.1. Choix du détergent	23
1.5.2. Techniques de reconstitution	23
1.6. Hypothèse	24
1.7. Objectifs	25
CHAPITRE 2 : Développement des tests de perméabilité Caco-2 et MDCK-MDR1	26
2.1. Introduction	26
2.2. Matériels	28
2.3. Méthodes	29
2.3.1. Culture cellulaire	30
2.3.2. Tests de perméabilités	30
2.3.3. Test d'inhibition de la P-gp	31
2.3.4. Analyse des échantillons	32
2.3.5. Calculs	34
2.4. Résultats	41
2.4.1. Mesures de perméabilités dans les cellules Caco-2 et MDCK-MDR1	41
2.4.2. Test d'inhibition de la P-gp	43
2.5. Conclusion	45
CHAPITRE 3 : Production, extraction et purification de la glycoprotéine-P à partir des cellules de mammifères MDCK-MDR1	47
3.1. Introduction	47
3.2. Matériels	47
3.3. Méthodes	48
3.3.1. Composition des solutions	49
3.3.2. Culture cellulaire	50
3.3.3. Préparation des cellules pour l'extraction	50
3.3.4. Lyse cellulaire	50
3.3.5. Extraction des membranes	50
3.3.6. Solubilisation des membranes	51

3.3.7. Dosage des protéines par la méthode BCA	51
3.3.8. Analyse des échantillons par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et western blot.....	52
3.3.9. Analyse de l'effet du nombre de passage sur l'expression de la P-gp dans les cellules MDCK-MDR1	53
3.3.10. Détermination de l'activité ATPasique	54
3.4. Résultats	56
3.4.1. Culture cellulaire des cellules MDCK-MDR1	56
3.4.2. Analyse des échantillons par gel SDS-Page et western blot	58
3.4.3. Extraction et purification de la P-gp.....	58
3.4.4. Activité ATPasique de la P-gp	61
3.5. Conclusion.....	63
CHAPITRE 4 : Production, extraction et purification de la P-gp à partir de <i>P. pastoris</i>	64
4.1. Introduction	64
4.2. Matériels	65
4.3. Méthodes	66
4.3.1. Composition des milieux de culture et tampons.....	66
4.3.2. Culture cellulaire	68
4.3.3. Analyse de la croissance de <i>P. pastoris</i>	69
4.3.4. Vérification de l'expression de la P-gp	69
4.3.5. Lyse cellulaire	70
4.3.6. Préparation des membranes.....	71
4.3.7. Solubilisation des membranes	71
4.3.8. Purification de la P-gp sur colonne de Nickel	72
4.3.9. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	72
4.3.10. Analyse des échantillons par la technologie « Stain-free » de Bio-Rad.....	72
4.4. Résultats	75
4.4.1. Culture cellulaire	75
4.4.2. Lyse cellulaire	79
4.4.3. Extraction de la P-gp	80

4.4.4. Purification de la P-gp sur colonne de Nickel (par gravité)	82
4.5. Conclusion	83
CHAPITRE 5 : Reconstitution de la P-gp dans des protéoliposomes	85
5.1. Introduction	85
5.2. Matériels	85
5.3. Méthodes	86
5.3.1. Tampons	86
5.3.2. Reconstitution en protéoliposomes par sonication	86
5.3.3. Formation de micelles « lipide-protéine-détergent »	86
5.3.4. Reconstitution en protéoliposomes par filtration sur gel	87
5.3.5. Reconstitution en protéoliposomes par dialyse	88
5.3.6. Mesure de l'activité ATPasique des protéoliposomes	88
5.4. Résultats	89
5.4.1. Reconstitution en protéoliposomes par la méthode de sonication	89
5.4.2. Reconstitution en protéoliposomes par la méthode de dialyse	90
5.4.3. Reconstitution en protéoliposomes par la méthode de filtration	90
5.4.4. Activité ATPasique des protéoliposomes	91
5.5. Conclusion	92
CHAPITRE 6 : Discussion générale	95
Bibliographie	

Liste des tableaux

Tableau 1. Transporteurs de la famille ABC exprimés chez l'humain.	6
Tableau 2. Transporteurs de la famille SLC exprimés chez l'humain	7
Tableau 3. Famille des glycoprotéines-P.....	12
Tableau 4. Caractéristiques des lignées cellulaires Caco-2 et MDCK.....	26
Tableau 5. Liste des produits utilisés dans le chapitre 2.	28
Tableau 6. Tableau récapitulatif des tests de perméabilité réalisés.....	32
Tableau 7. Résumé des paramètres analytiques du LC-MS/MS.....	33
Tableau 8. Résultats des calculs obtenus pour l'aténolol lors du test de perméabilité A vers B dans les conditions « sink ».	37
Tableau 9. Résultats des calculs obtenus pour le lopéramide lors du test de perméabilité B vers A dans les conditions « sink ».	39
Tableau 10. Résultats des calculs obtenus pour le lopéramide lors du test de perméabilité B vers A dans les conditions « non sink ».	39
Tableau 11. Mesures de perméabilité obtenues dans les cellules Caco-2, MDCK-MDR1 et MDCK-WT.....	42
Tableau 12. Liste des produits utilisés dans le chapitre 3.....	48
Tableau 13. Composition des solutions utilisées dans la production et l'extraction de la P-gp à partir des MDCK-MDR1.....	49
Tableau 14. Liste des produits utilisés dans le chapitre 4.....	66
Tableau 15. Composition des milieux et des tampons pour la production et l'extraction de la P-gp à partir de <i>P. pastoris</i>	67
Tableau 16. Liste des produits utilisés dans le chapitre 5.....	85
Tableau 17. Composition des tampons utilisés dans le chapitre 5.....	86
Tableau 18. Pourcentage de P-gp reconstituée dans des protéoliposomes.....	91
Tableau 19. Comparaison des deux systèmes d'expression (MDCK-MDR1 et <i>P. pastoris</i>) pour la production de la P-gp.....	96

Liste des figures

Figure 1. Anatomie du petit intestin.	2
Figure 2. Mécanismes de transport des médicaments dans la barrière intestinale.	3
Figure 3. Expression des transporteurs membranaires dans les tissus humains.	5
Figure 4. Tests actuels pour évaluer la perméabilité membranaire.	8
Figure 5. Structure de la P-gp.	13
Figure 6. Modèles de transport de la P-gp.	15
Figure 7. Cycle catalytique de la P-gp.	17
Figure 8. Étapes de purification des protéines membranaires.	18
Figure 9. Interaction entre la résine Ni-NTA et l'étiquette histidine.	22
Figure 10. Schéma représentatif des tests de perméabilités cellulaires.	30
Figure 11. Fraction transportée cumulée en fonction du temps de l'aténolol du test de perméabilité A vers B.	38
Figure 12. Ratio Net d'Efflux obtenus pour le propranolol, le vérapamil, la colchicine et le lopéramide.	43
Figure 13. Comparaison du ratio d'efflux en présence et en absence d'inhibiteur de la P-gp dans les cellules Caco-2.	44
Figure 14. Résultats du test d'inhibition de la P-gp.	45
Figure 15. Réaction schématique du test BCA.	51
Figure 16. Courbe de croissance cellulaire des cellules MDCK-MDR1.	56
Figure 17. Analyse par western blot de l'expression de la P-gp dans les cellules MDCK-MDR1 en fonction du nombre de passages.	57
Figure 18. Expression de la P-gp en fonction du nombre de passages des cellules MDCK.	57
Figure 19. Effet du chauffage sur la P-gp.	58
Figure 20. Étape d'ultracentrifugation sur coussin de sucrose pour l'extraction des membranes des MDCK-MDR1.	59
Figure 21. Photo du culot après la deuxième ultracentrifugation à 164 000 g.	59
Figure 22. Représentation schématique de la solubilisation progressive des protéines membranaires en fonction du ratio détergent : protéine.	60
Figure 23. Gel SDS-Page (A) et western blot (B) des échantillons de l'extraction de la P-gp.	61

Figure 24. Activité ATPasique spécifique de la P-gp partiellement purifiée des MDCK-MDR1	62
Figure 25. Voie métabolique de la dégradation du méthanol dans <i>P. pastoris</i>	65
Figure 26. Photos des billes de suspension de cellules congelées avant lyse et après lyse.....	71
Figure 27. Courbe de croissance cellulaire de la souche GS115-MDR1 dans le milieu MGY (A). Courbe de croissance cellulaire de la souche GS115-MDR1 dans le milieu MGY en échelle logarithmique (B).....	76
Figure 28. Western blot des échantillons pendant l'étape d'induction.....	77
Figure 29. Photo des erlenmeyers après 72h d'induction au méthanol.	77
Figure 30. Comparaison des profils de croissance de la souche GS115-MDR1 dans l'erlenmeyer classique et avec baffles lors de l'étape d'induction.	78
Figure 31. Influence de l'aération sur l'expression de la P-gp.....	79
Figure 32. Photo des cellules au microscope (100X).	79
Figure 33. Étape d'ultracentrifugation sur coussin de sucrose.....	80
Figure 34. Stain free gel et western blot des échantillons de la préparation de membranes de <i>P. pastoris</i>	81
Figure 35. Analyse densitométrique des bandes de la P-gp imagée avec le ChemiDoc MP. ...	81
Figure 36. Stain Free Gel et western blot des échantillons de la purification sur colonne de Nickel de la P-gp.	83
Figure 37. Western blot de la P-gp reconstituée en protéoliposomes par la méthode de sonication.....	89
Figure 38. Western blot de la P-gp reconstituée en protéoliposomes par la méthode de dialyse. 30µL d'échantillon par puits.	90
Figure 39. Analyse par western blot des protéoliposomes formés par filtration sur gel avec les lipides PC/cholestérol.	91
Figure 40. Stimulation de l'activité de la P-gp par le Vérapamil à différentes concentrations.	92

Liste des abréviations

ADMET : Absorption Distribution Métabolisme Excrétion Toxicité

APS : Persulfate d'Ammonium

ATP : Adénosine Triphosphate

BCA : Acide bicinchoninique

CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate

CMC : Concentration micellaire critique

Da : Dalton

DLS : Dynamic Light Scattering

DTT : Dithiothréitol

DM : *n*-Dodecyl β -D-maltoside

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

ECL : Enhanced chemiluminescent

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EGTA : Acide éthylène glycol-bis(β -aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-tétraacétique

FTC : Fraction Transportée Cumulée

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HRP : Peroxydase de raifort (Horseradish Peroxidase)

MDCK : Mardin-Darby canine kidney

MDR : Multiple Drug Resistance

MES : Acide 2-(N-morpholino) éthane sulfonique

MGY : Milieu minimal de Glycérol

MM : Milieu de méthanol

MOPS : Acide 3-Morpholin-4-yl-propane-1-sulfonique

NTA : Acide Nitriloacétique

OG : Octyl β -D-glucopyranoside

P. pastoris : *Pichia pastoris*

P_{app} : Perméabilité Apparente

PC : Phosphatidylcholine

P-GP : Glycoprotéine-P

RE : Ratio d'efflux

RNE : Ratio Net d'efflux

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SLC : Solute Carrier

TEMED : Tétraméthyléthylènediamine

WT : Wild Type

YNB : Yeast Nitrogen Base

Remerciements

La première personne que je tiens à remercier est Dr Grégoire Leclair, mon directeur de recherche, qui m'a donné l'opportunité de travailler avec une grande liberté sur un projet passionnant et très varié. Je le remercie pour son incroyable gentillesse, pour ses conseils et remarques pertinentes mais aussi pour son soutien tout au long de mon parcours.

Je tiens à remercier les employés de la Plateforme de Biopharmacie car c'est avec eux que mon aventure sur la perméabilité membranaire a commencé. D'abord Amandine, pour avoir été une excellente tutrice de stage et une très bonne amie. Merci à Mihaela pour sa gentillesse et sa disponibilité à n'importe quel moment. Merci à Martin pour son aide avec le MS et tous ses conseils sur le Québec.

Merci au Lab BioD particulièrement Alex pour son aide, ses commentaires, son soutien, son organisation de soupers des cycles supérieures et les bonnes discussions au labo / au bureau. Wided pour son amabilité et son aide avec Pichia et la bio mol en général. Sans oublier les anciens : Isabelle et Sarra, toutes deux de bonnes amies.

Merci au 4^e étage et aux amis du 4^e étage pour m'avoir aidé de près ou de loin dans ce projet, pour les bons moments passés à midi et aux 5à7. Merci à Mouna, Warren et Flo pour les potins, réconforts et fous rires.

Merci à l'AFAM pour les nombreux conseils lors des « journal club » et pour m'avoir permis d'assister à la CRS à Seattle.

Merci à Josée, Julie-Eve et Alex(s) pour leur bonne humeur et leur aide.

Merci à Martine Raymond et Sandra Weber pour leurs précieux conseils sur Pichia. Merci à Yann Burelle, Denis DeBlois, Marc Servant et Florence Do pour leurs précieuses remarques qui m'ont permise d'avancer dans le projet.

Merci à mes parents et mon frère Fabrice qui m'ont toujours soutenu même de l'autre côté de l'Atlantique.

Merci à Elo, Leo, Vivi, Thibault, Nico, Pierre, Alex, Flore, Iri.... Pour les nombreuses soirées montréalaises, concerts, campings, chalets...

Enfin, je tiens particulièrement à remercier Julien (sans qui je n'aurais pas fait cette maîtrise) pour son soutien, sa patience, ses encouragements, ses corrections, son écoute et sa complicité.

CHAPITRE 1 : Introduction

1.1. Mise en contexte

Le développement d'un nouveau médicament est un travail laborieux, risqué et extrêmement coûteux. Les échecs sont pour la plupart, liés aux propriétés pharmacocinétiques des nouvelles molécules. Le grand défi de la recherche pharmaceutique, dans le développement de nouveaux principes actifs, est d'identifier le plus tôt possible les candidats qui auront le plus de chances d'arriver sur le marché. Les obstacles liés à chaque molécule doivent être prédits dans les étapes préliminaires afin d'évaluer la faisabilité du développement [1].

Auparavant, les nouvelles entités chimiques étaient sélectionnées en fonction de leurs activités pharmacologiques, puis différents tests étaient effectués pour évaluer le profil pharmacocinétique de la molécule. Aujourd'hui, les entreprises pharmaceutiques abordent une nouvelle approche dans laquelle l'efficacité pharmacologique et le profil pharmacocinétique sont évalués parallèlement. La sélection des molécules pour les étapes ultérieures se fait ainsi sur plus de caractéristiques comme la solubilité, la perméabilité intestinale ou la stabilité métabolique [1]. Les industries recherchent donc des techniques fiables, à faible coût et de haute précision pour examiner rapidement les nouvelles molécules dans l'étape de criblage.

Les études *in vivo* sont essentielles pour l'évaluation des profils pharmacocinétiques, pharmacologiques et toxicologiques des nouvelles molécules, puisque les animaux représentent les meilleurs modèles du corps humain. Cependant, elles ne répondent pas à tous les critères énumérés ci-dessus. De plus, devant la polémique croissante sur les recherches animales, les gouvernements sont contraints à mettre en place des lois plus restrictives afin d'utiliser les animaux d'une manière contrôlée et éthique. Les modèles *in vitro* sont quant à eux attrayants. Ainsi, aucun ou peu d'animaux sont utilisés, une faible quantité de principe actif est nécessaire, plusieurs composés peuvent être testés en parallèle, les mécanismes de transport et le métabolisme peuvent être étudiés. Les études *in vitro* sont surtout appréciés pour leurs faibles coûts, leurs reproductibilités et leurs simplicités [2]. Il s'avère donc

primordial de développer des modèles *in vitro* de la perméabilité et de l'absorption présentant des bonnes corrélations avec l'être humain.

1.2. Perméabilité membranaire

L'évaluation de la perméabilité membranaire est une étape cruciale du développement de nouveaux principes actifs. Après une administration par voie orale, la majorité des médicaments (approximativement 90%) est absorbée dans l'intestin grêle qui possède une anatomie de sorte à augmenter l'absorption des nutriments dans le corps humain. Ainsi, la surface de l'intestin grêle qui est de forme cylindrique est constituée de valvules conniventes qui multiplient par trois la surface de l'intestin [1]. Ces valvules sont recouvertes de villosités qui sont elles-mêmes formées de cellules avec des bordures en brosse (Figure 1). Tous ces repliements permettent d'augmenter la surface de l'intestin de 30 fois et de 600 fois respectivement.

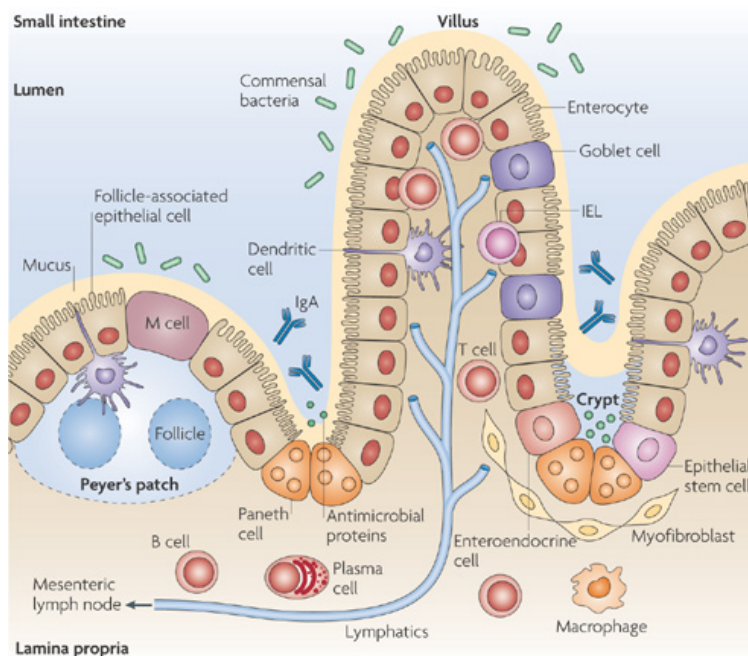


Figure 1. Anatomie du petit intestin. Adaptée avec permission [3]

Le petit intestin a pour rôle principal d'absorber les nutriments mais il sert également de barrière aux substances étrangères. Les cellules épithéliales englobent les entérocytes, les cellules globulaires, les cellules entéroendocrines, les cellules de Paneth, les cellules M et les

cellules tuft et cup. Les entérocytes, très présentes dans la région intestinale, sont responsables de l'absorption de la majorité des principes actifs. Ces cellules présentent un côté apical et un côté basolatéral et elles sont séparées entre elles par des jonctions serrées.

La principale barrière que les médicaments vont rencontrer dans les intestins avant de rejoindre la circulation générale est la membrane cellulaire des entérocytes. Les membranes cellulaires régulent l'absorption des xénobiotiques selon différents mécanismes; elles jouent donc un rôle clé dans la distribution des médicaments dans le corps humain.

Les médicaments peuvent traverser la membrane selon deux types de passages : le passage transcellulaire et le passage paracellulaire. Les différents mécanismes sont représentés sur la Figure 2. La composition en lipides et en transporteurs membranaires ainsi que l'étroitesse des jonctions entre les cellules ont un impact direct sur la perméabilité des médicaments.

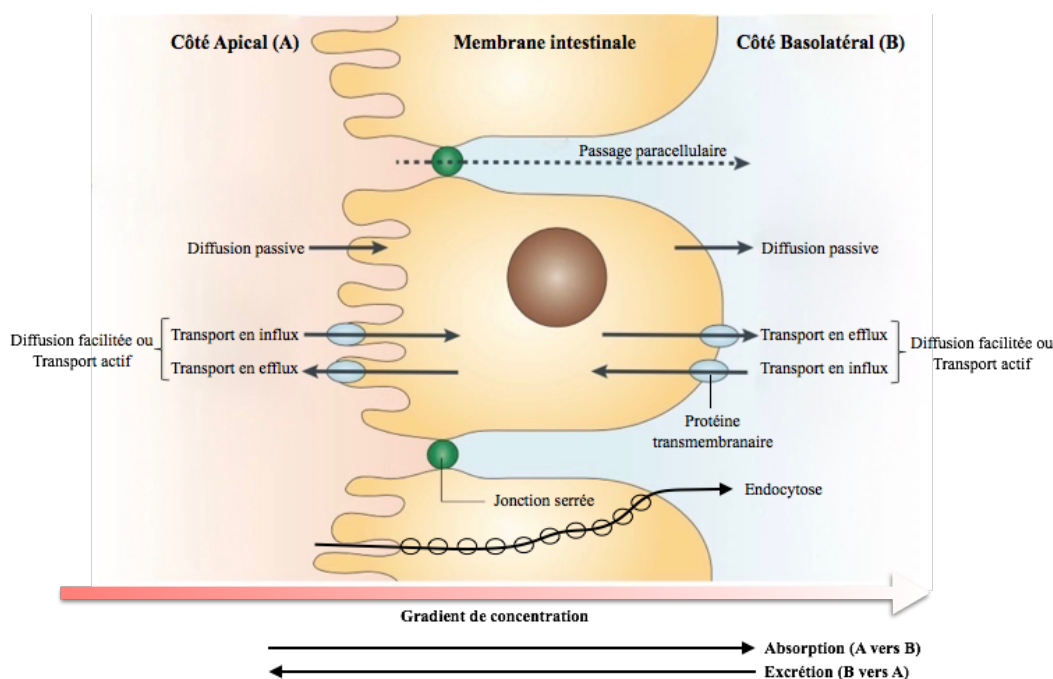


Figure 2. Mécanismes de transport des médicaments dans la barrière intestinale. Adaptée avec permission de [4]

1.2.1. Passage transcellulaire

La voie transcellulaire est divisée en quatre principaux mécanismes : la diffusion passive, la diffusion facilitée, le transport actif et l'endocytose. Pour la diffusion passive, les molécules traversent la bicouche lipidique de la membrane selon un gradient de concentration. Lors de l'absorption intestinale, les médicaments passent du côté le plus concentré, la lumière gastrique, vers le côté le moins concentré, les vaisseaux sanguins capillaires. Le passage ne nécessite pas d'apport énergétique, n'est pas saturable et est non spécifique. Pour ce type de passage, la taille de la molécule, sa lipophilie et son état d'ionisation sont des caractéristiques importantes. Les composés lipophiles sont plus susceptibles de passer à travers la membrane que les composés polaires. Les molécules neutres sont plus perméables que les ions cationiques ou ioniques [5].

Dans la diffusion facilitée, les molécules traversent la membrane à l'aide de protéines transmembranaires de transport (canaux ioniques ou transporteurs). Les sucres et les acides aminés sont absorbés par cette voie. Ce transport ne nécessite pas d'apport énergétique et se fait selon un gradient de concentration. Ce mécanisme est saturable à des concentrations élevées en médicament.

Dans le transport actif, les molécules passent à travers la membrane à l'aide d'une protéine transmembranaire. Le transport actif nécessite un apport d'énergie et s'effectue contre un gradient de concentration [5]. Le transport est divisé en deux catégories : le transport actif primaire dans lequel les molécules d'ATP (Adénosine Triphosphate) sont directement utilisées comme source d'énergie et le transport actif secondaire dans lequel une différence de potentiel électrochimique, généré par le transport actif primaire, est utilisée pour transporter les molécules. Les deux principales formes de transport actif secondaire sont le symport et l'antiport. Ce mécanisme est saturable, peut être inhibé et soumis à une compétition entre les molécules transportées.

Enfin, le mécanisme d'endocytose permet de faire traverser les grosses molécules. Dans ce passage, les membranes cellulaires vont englober les macromolécules et du fluide extracellulaire pour former des vésicules, appelées endosomes, qui vont pénétrer la cellule.

1.2.2. Passage paracellulaire

Dans le passage paracellulaire, les médicaments traversent par les jonctions serrées qui ont pour rôle de joindre les cellules épithéliales entre elles pour former un tapis. Ce type de passage ne concerne que les petites molécules (inférieures à 180 Da) polaires [5].

1.2.3. Transporteurs membranaires

Les transporteurs membranaires sont donc très impliqués dans l'absorption des médicaments. Ces protéines sont présentes dans toutes les cellules mais elles sont très nombreuses au niveau de l'épithélium intestinal, des hépatocytes, des cellules épithéliales des tubules rénaux et de la barrière hémato-encéphalique (Figure 3). Il existe deux grandes familles de transporteurs : les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et les transporteurs SLC (Solute Carrier) [6].

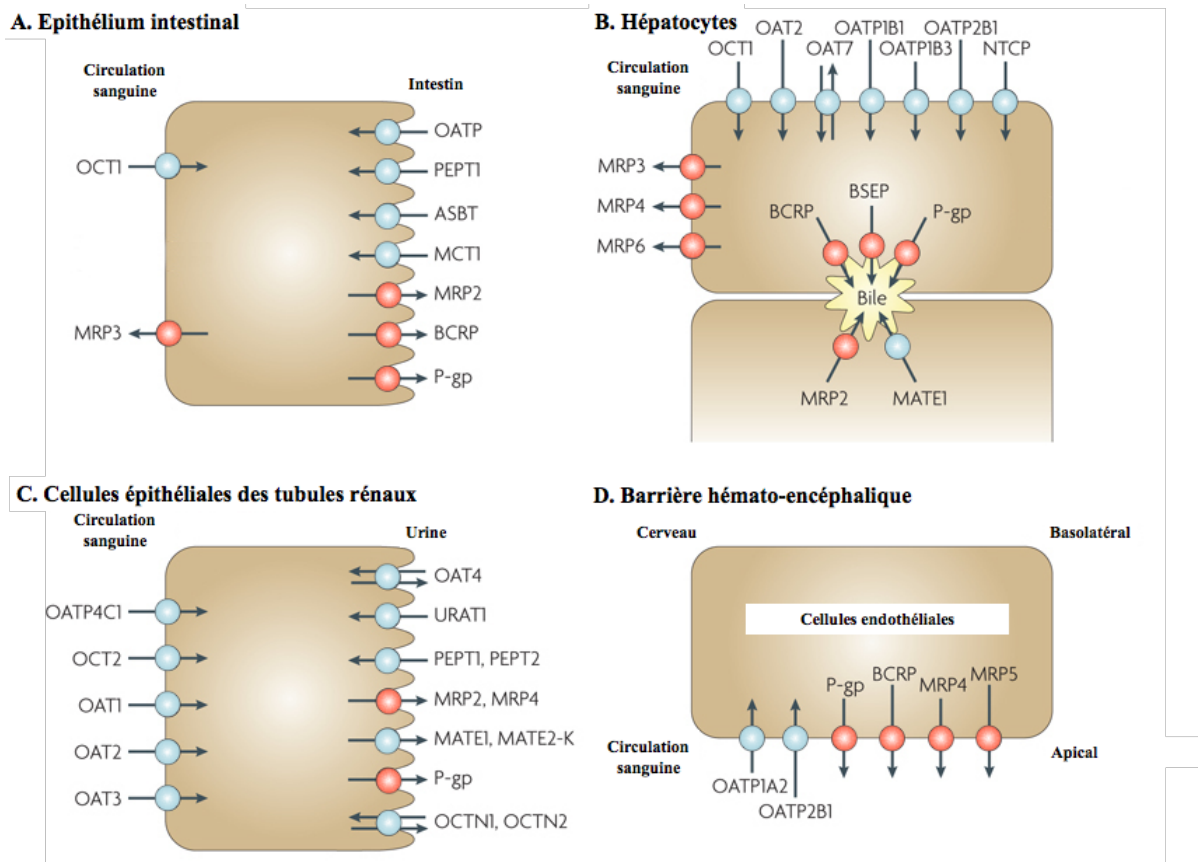


Figure 3. Expression des transporteurs membranaires dans les tissus humains. Transporteurs ABC représentés en rouge et transporteurs SLC représentés en bleu. Adaptée avec permission [6]

Dans le système ABC, les protéines utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour fonctionner. Sept sous-familles encodant pour 49 protéines différentes ont été identifiées dans le génome humain [7]. Les transporteurs ABC impliqués dans le transport des xénobiotiques font partis des familles *ABCB*, *ABCC* et *ABCG*. La majorité est impliquée dans le phénomène de résistance des anti-cancéreux engendrant des échecs thérapeutiques. Les transporteurs les plus importants sont présentés dans le Tableau 1.

Famille	Gène	Protéine	Exemples de médicaments substrats
<i>ABCB</i>	<i>ABCB1</i> <i>ABCB11</i>	MDR1/ Glycoprotéine-P BSEP	Vinblastine, vincristine, doxorubicine, colchicine, docetaxel, paclitaxel, ortataxel... Pravastatine, taurocholate...
<i>ABCC</i>	<i>ABCC2</i> <i>ABCC3</i> <i>ABCC4</i>	MRP2 MRP3 MRP4	Vinblastine, vincristine, doxorubicine, etoposide, cisplatine, methotrexate... Conjugués glucuronide (morphine, acétaminophène, etoposide, ethinylestradiol)... Methotrexate, leucovorine, topotecane, 6-mercaptopurine, adefovire...
<i>ABCG</i>	<i>ABCG2</i>	BCRP	Mitoxantrone, flavopiridole, topotecane, SN-38, camptothecine, methotrexate, imatinibe...

Tableau 1. Transporteurs de la famille ABC exprimés chez l'humain [7, 8].

Le système SLC est la famille de protéines la plus abondante. Plus de 380 séquences humaines ont été répertoriées et classées dans 48 sous-familles [9]. Les transporteurs SLC rejettent les médicaments ou facilitent leur absorption par le mécanisme de diffusion facilitée ou de transport actif secondaire [8]. Les transporteurs SLC les plus impliqués dans l'absorption des médicaments sont énumérés dans le Tableau 2.

Famille	Gène	Protéine	Classe de substrats transportés
SLC10	SLC10A1 SLC10A2	NTCP ASBT	Divers substrats
<i>SLC15</i>	<i>SLC15A1</i> <i>SLC15A2</i>	PEPT1 PEPT2	Oligopeptides Protons dépendant
<i>SLC16</i>	<i>SLC16A1</i>	MCT1	Divers substrats
<i>SLC22</i>	<i>SLC22A1</i> <i>SLC22A2</i> <i>SLC22A4</i> <i>SLC22A5</i>	OCT1 OCT2 OCTN1 OCTN2	Cations organiques
	<i>SLC22A6</i> <i>SLC22A7</i> <i>SLC22A8</i> <i>SLC22A9</i> <i>SLC22A11</i> <i>SLC22A12</i>	OAT1 OAT2 OAT3 OAT7 OAT4 URAT1	Anions organiques
<i>SLC47</i>	SLC47A1 SLC47A2	MATE1 MATE2-K	Cations organiques
<i>SLCO</i>	<i>SLCO1A2</i> <i>SLCO1B1</i> <i>SLCO1B3</i> <i>SLCO2B1</i> <i>SLCO4C1</i>	OATP1A2 OATP1B1 OATP1B3 OATP2B1 OATP4C1	Anions organiques

Tableau 2. Transporteurs de la famille SLC exprimés chez l'humain [8, 10].

1.2.4. Tests d'évaluation de la perméabilité membranaire

Les principaux tests d'évaluation de la perméabilité membranaire sont détaillés dans cette sous-partie et sont représentés dans la Figure 4.

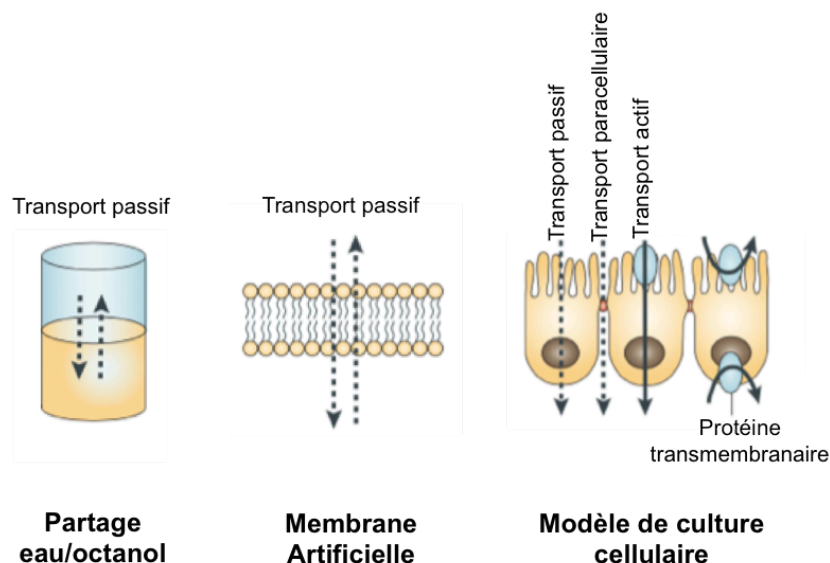


Figure 4. Tests actuels pour évaluer la perméabilité membranaire. Adaptée avec permission [4]

1.2.3.1. Système de partage solvant organique /eau

Le test de coefficient de partage n-octanol/eau permet de mesurer la lipophilie de la molécule et donne une indication du comportement du médicament à travers une membrane biologique. L'octanol est utilisé puisqu'il possède une polarité similaire aux membranes lipidiques. Le coefficient de partage est égal au rapport de la concentration de la substance à l'équilibre dans l'octanol sur la concentration de la substance à l'équilibre dans l'eau. Ainsi, une molécule lipophile aura un coefficient de partage supérieur à 1 alors qu'une molécule hydrophile aura un coefficient de partage inférieur à 1. Malheureusement, même si l'octanol est capable de créer des interactions hydrophobes et hydrogènes avec les composés, il ne pourra jamais reproduire les interactions ioniques des phospholipides présents dans les membranes biologiques avec les molécules [11].

1.2.3.2. Système avec une membrane artificielle

Plusieurs tests utilisant des membranes artificielles ont été mis en place. Les films noirs font partis des premiers modèles de membrane plane pour évaluer la perméabilité. La bicouche artificielle de composition connue est formée dans un trou d'un matériau inerte qui sépare deux compartiments remplis d'un électrolyte [12]. Pour former la bicouche, l'orifice, d'un diamètre d'une centaine de microns, est tout d'abord enduit d'un solvant hydrocarboné puis,

une fois que l'ouverture est sèche, les deux compartiments sont remplis d'une solution aqueuse. Des lipides solubilisés dans un solvant hydrophobe comme le décane sont ensuite appliqués sur le trou. La bicouche lipidique se forme spontanément puisque l'excès de solvant est drainé vers les parois de l'ouverture qui sont hydrophobes. En conséquence, la membrane s'amincit. Ce phénomène peut être suivi en éclairant le trou. Lorsque la membrane devient noire, d'où le terme de film noir, cela signifie que la membrane a atteint une épaisseur de quelques nanomètres. Comme l'épaisseur est négligeable, toutes les longueurs d'onde subissent une interférence destructive donc aucune couleur n'est perçue [13]. La concentration, la force ionique, le pH et le champ électrique peuvent être contrôlés avec ce système. De part et d'autre de la membrane, des conditions différentes peuvent être appliquées.

Un autre modèle utilise les liposomes. Les liposomes sont des vésicules artificielles formées par des bicouches lipidiques concentriques enfermant un volume aqueux. Ils ont l'avantage d'avoir des propriétés similaires aux membranes biologiques. Ils imitent la partie hydrophobe et la surface chargée polaire extérieure des phospholipides [14]. Les tailles des liposomes varient de 20 nm à 100 µm. Ils sont préparés en dissolvant les lipides dans un solvant organique qui est par la suite évaporé. Le film lipidique sec est ensuite réhydraté dans un tampon [14]. La suspension de liposomes est finalement extrudée pour obtenir une population de taille homogène. Les interactions hydrophobes, ioniques et hydrogènes peuvent être étudiées par ce système [11].

La chromatographie par membrane artificielle immobilisée est un autre test qui est simple à réaliser et facilement automatisable puisque cette technique utilise une chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et une phase stationnaire sur laquelle des phospholipides ont été greffées [15]. La colonne chromatographique imite donc la surface des membranes cellulaires et permet d'évaluer les interactions polaires des médicaments avec celle-ci. Le facteur de rétention augmente avec l'affinité des molécules pour les phospholipides. Ce test permet donc d'évaluer rapidement la diffusion passive des xénobiotiques [16].

Le test PAMPA reste le modèle le plus utilisé par les entreprises pharmaceutiques et des centaines de composés ont déjà été testés par cet essai [17]. Ce test permet d'étudier la

diffusion passive des molécules et présente l'avantage d'être simple et rapide à utiliser [18]. Le principe de ce test consiste à évaluer la perméabilité des molécules d'un compartiment donneur à un compartiment receveur à travers une couche de phospholipides [5].

1.2.3.3. Test *in vitro* cellulaire

Même si les tests énumérés ci-dessus permettent d'obtenir rapidement des résultats sur la perméabilité des nouveaux composés, ils présentent un inconvénient majeur. Ils n'évaluent pas l'effet des transporteurs membranaires, soit le transport actif. Cela peut donc conduire à des prédictions d'absorption chez l'homme erronées [19, 20].

Les modèles cellulaires de perméabilité fournissent des informations supplémentaires sur le transport actif et le transport paracellulaire. Ce sont donc jusqu'à présent les tests de choix pour évaluer l'absorption des nouvelles molécules par les entreprises pharmaceutiques. Les lignées cellulaires Caco-2 et MDCK, dans lesquelles des transporteurs membranaires sont surexprimés, sont les plus utilisées. Le principe et les limites des tests *in vitro* seront vues plus en détail dans le chapitre 2 de ce mémoire.

Des nouveaux modèles *in vitro* intestinal en 3D ont récemment été développés mais ils sont encore à optimiser. Un test utilisant les cellules Caco-2 et HT29-MTX et deux types de cellules stromales, les fibroblastes intégrées dans du collagène de type 1 et les immunocytes a été développé. Ce modèle souffre cependant d'une diminution de l'intégrité des jonctions serrées et d'un plus faible niveau d'expression de protéines transmembranaires comparativement à l'homme [21].

De nombreuses études montrent l'importance des transporteurs membranaires dans l'étude des profils pharmacocinétique, toxicologiques et d'efficacité des médicaments [6]. Ce sont donc des protéines à ne pas négliger dans l'étude de la perméabilité. Parmi les transporteurs membranaires du corps humain, la glycoprotéine (P-gp) est la protéine la plus étudiée parce qu'elle est exprimée dans de nombreuses parties du corps et parce qu'elle est impliquée dans le rejet de nombreux médicaments. Il a été montré que la P-gp couplée avec le cytochrome P450, enzyme métabolisant les médicaments, jouait un rôle primordial dans l'absorption au niveau de la paroi intestinale [22].

1.3. La Glycoprotéine-P

1.3.1. La famille ABC

La glycoprotéine-P (P-gp), aussi connue sous le nom de ABCB1 ou *mdr1*, est un transporteur membranaire appartenant à la superfamille ABC (ATP Binding Cassette). Dans cette famille, toutes les protéines se caractérisent par la présence d'un domaine ATPasique qui a démontré lier et hydrolyser l'ATP. L'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP est utilisée dans de nombreux processus biologiques [23]. Les transporteurs ABC utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter à travers la membrane contre un gradient de concentration une grande variété de substances [24]. Sur les 48 transporteurs humains de la famille ABC, la P-gp est la protéine la plus étudiée du fait qu'elle joue un rôle important dans la résistance de médicaments cytotoxiques contre le cancer dans les cellules cancéreuses [25]. Elle est responsable de transporter à l'extérieur de la cellule de nombreux composés situés dans le cytosol ou dans la bicouche lipidique.

1.3.2. Le gène MDR

La P-gp fut découverte dans les années 1970 avec le phénomène de résistance multiple aux anti-cancéreux (MDR) [26]. La famille multigénique MDR comprend deux gènes chez l'homme et trois gènes chez les rongeurs (Tableau 3) [27]. Les glycoprotéines sont réparties en trois classes. Seules les classes I et II sont capables de conférer le phénotype de résistance lorsque les glycoprotéines-P sont surexprimées. Chez l'homme, il s'agit des glycoprotéines codées par le gène MDR1 [24]. La classe III concerne le transport de la phosphatidylcholine à travers la membrane caniculaire des hépatocytes [28].

		Espèces		
		Humain	Rat et souris	Hamster
Résistance multiple	Classe I	MDR1	mdr 1a (mdr 3)	pgp 1
	Classe II	MDR1	mdr 1b (mdr 1)	pgp 2
Transport phosphatidylcholine	Classe III	MDR3 ou MDR2	mdr 2	pgp 3

Tableau 3. Famille des glycoprotéines-P (modifié d'après Bendayan *et al.*, 2002)

1.3.3. Structure de la P-gp

La P-gp a une masse moléculaire de 130 kDa et est composée de 1280 acides aminés organisés en deux sous-unités presque identiques (Figure 5). Chacune de ces deux sous-unités (représentées dans deux couleurs différentes dans la Figure 5) est constituée de 6 hélices transmembranaires et de deux domaines cytoplasmiques de liaisons aux nucléotides (NBD) qui sont responsables de lier et d'hydrolyser l'ATP [29]. Des sites de glycosylation, responsables de la variation du poids moléculaire de la protéine entre les espèces, se retrouvent sur la première boucle extracellulaire de la sous-unité de la portion N-terminale de la P-gp.

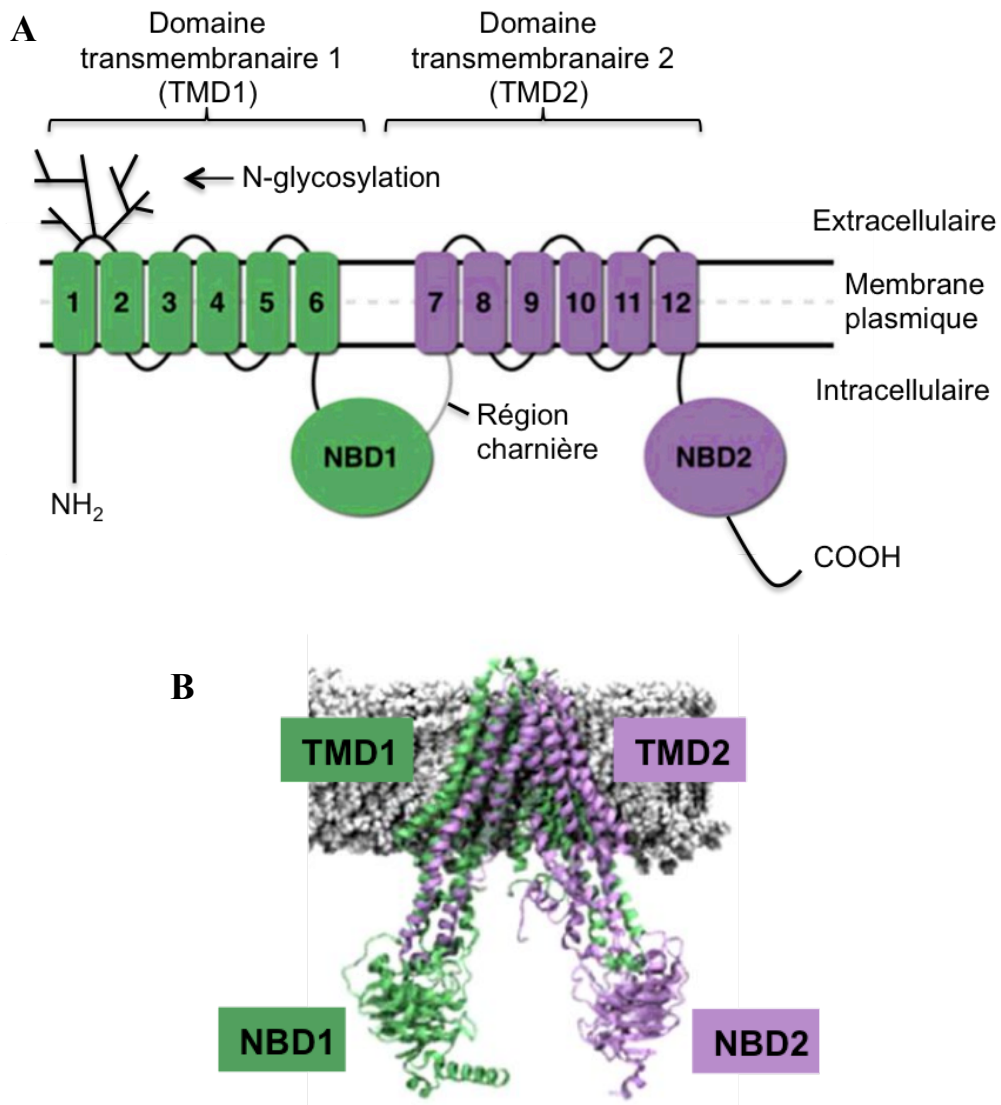


Figure 5. Structure de la P-gp. A : Structure schématique de la P-gp. B : Structure cristalline de la P-gp. Adaptée avec permission [30]

Les deux sites de liaisons aux nucléotides forment un dimère symétrique dans lequel deux molécules d'ATP peuvent se lier. Ce dimère est souvent comparé dans la littérature à un sandwich. Trois caractéristiques sont retrouvées dans les NBDs: les motifs de Walker A et B qui sont communs aux sites de liaisons de l'ATP et la séquence signature qui est retrouvée chez tous les transporteurs de la famille ABC. Une molécule d'ATP peut se lier par

l'intermédiaire du motif Walker A ou B à l'un des sites NBD et par l'intermédiaire de la séquence signature à l'autre site de liaison NBD [31].

1.3.4. Expression et localisation de la P-gp

La P-gp est exprimée dans de nombreux tissus humains. Elle est retrouvée dans les membranes des cellules épithéliales de la lumière intestinale, dans les hépatocytes, dans les cellules de la barrière hémato-encéphalique et au niveau des cellules du tubule proximal du rein [6]. L'omniprésence de la P-gp dans le corps humain justifie pourquoi cette protéine joue un rôle important dans l'absorption intestinale des médicaments, dans la protection des organes sensibles des substances étrangères et enfin dans l'élimination des principes actifs et métabolites [32].

La P-gp possède une grande variabilité d'expression entre les individus, à cause du polymorphisme du gène MDR1. Par exemple, l'expression de la protéine dans les entérocytes peut varier d'un facteur 8 chez l'homme [33]. Cela joue donc sur le parcours du médicament dans le corps humain.

1.3.5. Transport de la P-gp

La P-gp a la capacité de transporter de nombreux composés avec des propriétés physico-chimiques différentes. En général, les substrats sont lipophiles et de petite taille. Il devient donc difficile de prédire l'affinité d'un nouveau composé à la P-gp. De nouvelles substances transportées par la P-gp sont couramment découvertes.

Le mécanisme de transport de la P-gp n'est pas encore totalement élucidé. Plusieurs modèles ont été développés pour expliquer le processus [34]. Dans le premier modèle, la P-gp fonctionnerait comme une pompe classique. Les composés situés dans le cytoplasme seraient relargués vers le milieu extracellulaire sans être au contact de la bicouche lipidique de la membrane (Figure 6). Dans le deuxième modèle, la P-gp agirait comme une flippase [35], le substrat interagit d'abord avec les lipides avant d'interagir avec le transporteur [36]. Les médicaments intercalés dans le feuillet interne de la membrane sont basculés dans le feuillet externe de la bicouche lipidique à la suite de l'interaction avec le site de liaison aux substrats de la P-gp. Ils diffusent ensuite vers l'extérieur de la cellule ou reviennent spontanément en

flippant dans le feuillet interne [37]. Dans le dernier modèle qui est de nos jours le plus retenu, la P-gp agirait comme une pompe à efflux. Le médicament serait intercepté par le transporteur lorsqu'il essaye d'entrer dans la cellule à partir de la bicouche lipidique. Le médicament se lie ensuite au site de liaison du substrat de la P-gp. Puis l'ATP, en se liant aux domaines de liaison aux nucléotides, s'hydrolysera en ADP et phosphate libérant une quantité important d'énergie. Cette énergie provoque un changement de conformation du transporteur, ce qui lui permettra d'éjecter en dehors de la cellule le médicament.

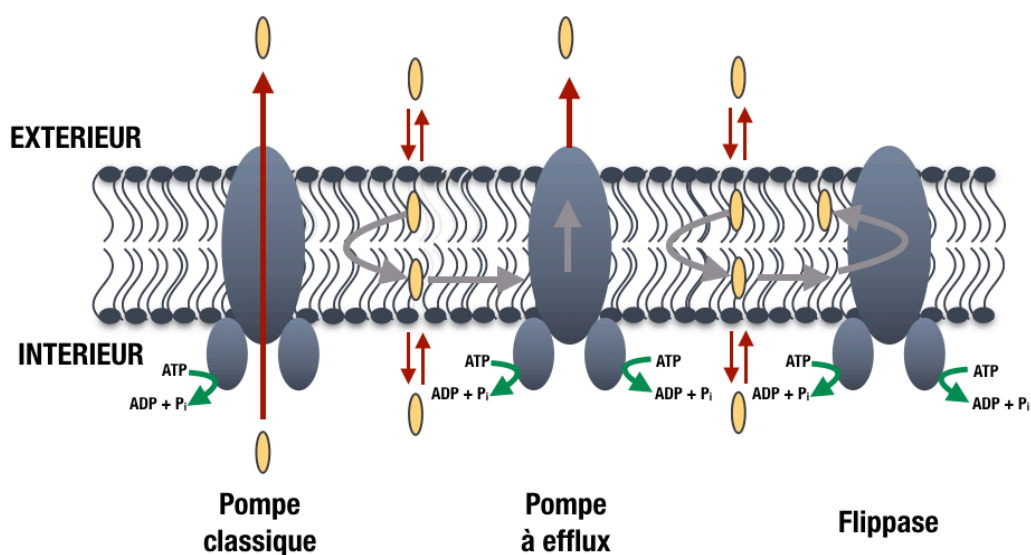


Figure 6. Modèles de transport de la P-gp. Adapté avec permission [34]

1.3.6. Liaison et hydrolyse de l'ATP par le transporteur

L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire pour transporter les substrats par la P-gp. La P-gp se distingue des autres ATPase du fait qu'elle possède une activité ATPasique basale élevée en l'absence de substrats. Le transport des médicaments par les domaines transmembranaires et l'hydrolyse de l'ATP par les sites de liaisons aux nucléotides seraient donc des processus distincts. Certains médicaments stimulent l'activité ATPasique alors que

d'autres l'inhibent. Certains médicaments, comme le vérapamil, ont un effet stimulant à faible concentration et un effet inhibiteur à haute concentration [29].

Le mécanisme d'hydrolyse de l'ATP par la P-gp n'est aujourd'hui pas très bien compris. Un des modèles proposé postule que la P-gp hydrolyse une molécule d'ATP par substrat transporté [38]. Dans ce modèle, l'hydrolyse de l'ATP s'effectue par alternance entre les deux sites de liaisons nucléotidiques. Dans l'état symétrique de la protéine, le sandwich de dimère est ouvert, les molécules d'ATP ne sont pas étroitement liées (ATP_L sur la Figure 7). Si le transporteur est actif, celui-ci passera en position asymétrique dans laquelle une molécule d'ATP est liée à un site de liaison nucléotidique (ATP_T sur la Figure 7) engendrant une fermeture du sandwich. La molécule d'ATP liée au NBD subit ensuite une hydrolyse fournissant l'énergie nécessaire pour transporter le médicament. Après l'hydrolyse de l'ATP, l'ADP produite est faiblement liée et provoque la réouverture du sandwich de dimère. Le second site de liaison devient aussitôt disponible pour une nouvelle molécule d'ATP, son affinité pour le nucléotide est élevée. Le sandwich se referme de nouveau. L'hydrolyse de cette deuxième molécule d'ATP permet le transport d'un autre substrat [39].

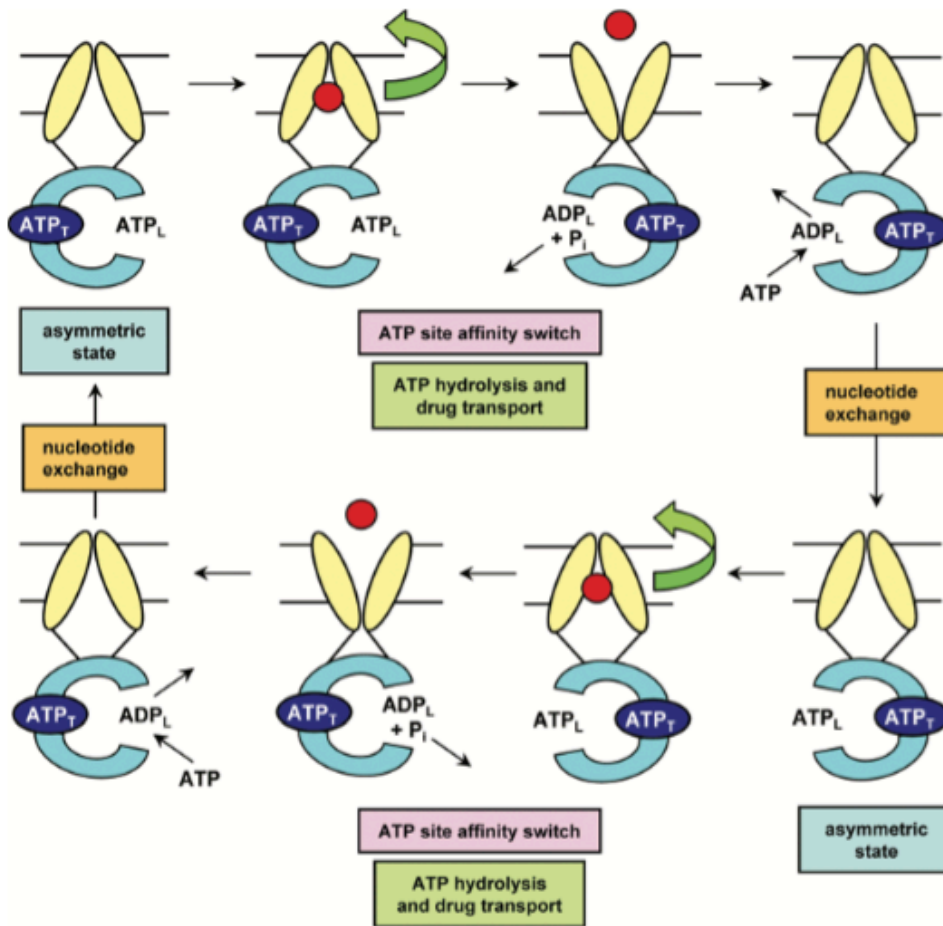


Figure 7. Cycle catalytique de la P-gp. Adaptée avec permission de [29].

Afin d'étudier les transporteurs membranaires, comme la P-gp, et de mieux comprendre leurs fonctionnements dans le corps humain, il est nécessaire de produire des grandes quantités de protéines purifiées. La méthodologie est décrite dans la partie ci-dessous.

1.4. Production et purification d'une protéine membranaire recombinante

Les protéines recombinantes sont des protéines produites par une cellule dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique. Les techniques de production, de manipulation et de purification sont couramment réalisées et optimisées pour les protéines

solubles dans un environnement aqueux [40]. En revanche, elles le sont moins pour les protéines membranaires, ce qui rend les manipulations plus difficiles à réaliser. Pour pouvoir travailler avec des protéines membranaires, celles-ci doivent être dispersées dans un milieu aqueux à l'aide d'un détergent. Cette étape de solubilisation, qui est indispensable, s'avère aussi être la plus critique puisqu'elle engendre fréquemment des agrégations, une dénaturation ou une perte d'activité de la protéine. À cela s'ajoute des difficultés dans la production : les niveaux d'expression sont souvent faibles. Il n'existe pas de protocole unique pour la purification de protéines membranaires, mais les grandes lignes seront détaillées dans ce chapitre. La Figure 8 présente les grandes étapes permettant d'augmenter la pureté de la protéine membranaire d'intérêt [41].

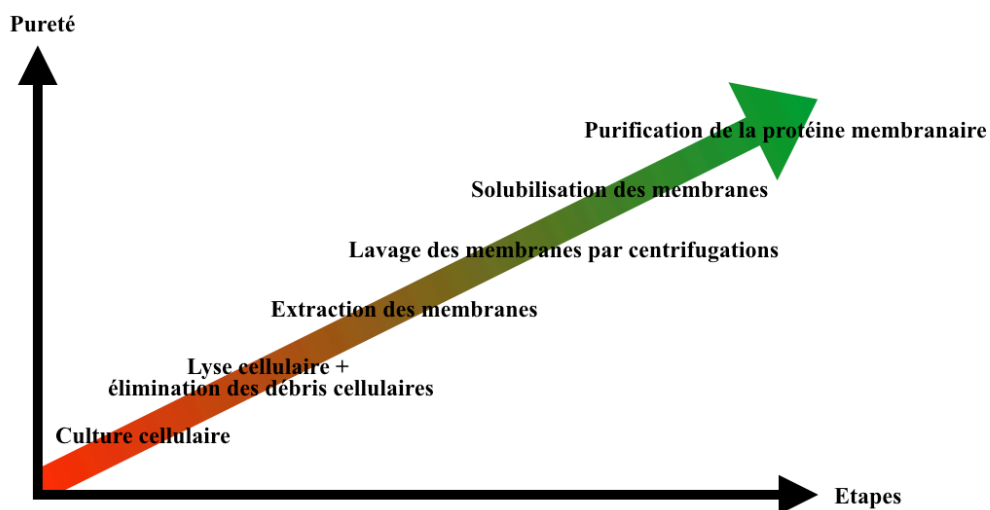


Figure 8. Étapes de purification des protéines membranaires

1.4.1. Les différents systèmes d'expression

Différents systèmes d'expression sont disponibles pour produire des protéines de l'espèce humaine. Plusieurs facteurs sont à prendre en compte pour sélectionner un système d'expression : facilités d'utilisation, matériel requis et expertise dans le laboratoire, rendement élevé à obtenir, méthode et simplicité de la purification, cout de production et enfin le temps

de production. Les protéines membranaires recombinantes ont besoin en plus d'un environnement lipidique adéquat pour permettre un bon repliement et une bonne stabilité [42].

Les systèmes d'expression procaryote, comme *Escherichia coli* (*E. coli*), sont très facile d'utilisation et permettent d'obtenir des rendements élevés à faible cout. En revanche, les protéines produites par ce système, souffrent d'un mauvais repliement tridimensionnel et de l'absence de glycosylation [43]. Or, ces caractéristiques s'avèrent indispensables au bon fonctionnement enzymatique des protéines.

Plusieurs systèmes d'expression eucaryote sont disponibles pour la production de protéines membranaires. Les cellules de mammifères, ont l'avantage de fournir un environnement et des modifications post-traductionnelles identiques à l'homme, engendrant un bon repliement et donc une bonne activité de la protéine. Les levures sont populaires puisqu'elles ont une croissance rapide et peuvent produire des glycosylations. Les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) sont les systèmes d'expression les plus utilisées pour surexprimer les protéines membranaires eucaryotes [44, 45]. Les cellules d'insecte sont également très utilisées puisqu'elles produisent des protéines avec un bon repliement et les glycosylations sont similaires aux cellules de mammifères [46].

1.4.2. Lyse cellulaire

La lyse cellulaire est la première étape à réaliser dans la purification de protéines membranaires. Elle permet d'obtenir une suspension de fragments membranaires soit des vésicules membranaires qui contiennent la protéine d'intérêt. L'homogénat de cellules contient également des cellules non lysées, des débris cellulaires, des protéines solubles ainsi que d'autres contaminants à éliminer. Il existe plusieurs méthodes pour lyser les cellules [41] : mécaniques (broyage, sonication, congélations et décongélations successives, pressage), chimiques (solution contenant des détergents et/ou des réactifs qui vont déstabiliser les liaisons chimiques des protéines membranaires) ou enzymatiques (enzymes lytiques comme le lysozyme).

Lors de cette étape, les protéines membranaires restent stables puisqu'elles sont toujours intégrées dans la membrane cellulaire. Le principal risque est lié à la protéolyse engendrée par la libération de protéases lors de la lyse cellulaire; ceci risquerait d'avoir un

impact sur l'activité de la protéine. Pour pallier ce problème, des inhibiteurs de protéases sont ajoutés dans les tampons.

1.4.3. Extraction des membranes

La méthode la plus classique d'extraction des membranes consiste à effectuer différentes étapes de centrifugations et des centrifugations sur coussin de sucrose [47]. À cause de différences de densités liées à une différence de composition en lipides et en protéines, il est possible de séparer les membranes des autres organelles. Les différentes ultracentrifugations et centrifugations sur un gradient de sucrose permettent d'éliminer les contaminants de l'homogénat de cellules (noyaux, débris cellulaires, fractions mitochondriales...). Malheureusement, toutes ces centrifugations engendrent des pertes à chaque étape. Il s'avère donc indispensable de travailler avec des protéines membranaires qui proviennent de cellules faciles à cultiver et qui y sont fortement exprimées.

1.4.4. Solubilisation des membranes

L'étape de solubilisation des membranes permettant d'extraire la protéine membranaire de son environnement lipidique est indispensable et est la plus critique. La solubilisation des membranes s'effectue à l'aide de détergents [48] qui vont désintégrer la bicouche lipidique. Les détergents sont des molécules amphiphiles qui miment l'environnement lipidique de la protéine : ils ont une tête polaire et une queue hydrophobe. La solubilisation peut se diviser en plusieurs étapes : tout d'abord, les molécules de détergent se lient à la membrane puis celle-ci va commencer à se désintégrer pour finalement former des complexes lipide/protéine/détergent [47]. L'augmentation de la concentration du détergent permet de diviser ces complexes et de former des micelles protéine/détergent et lipide/détergent [49].

Il n'existe malheureusement pas de protocole standard de solubilisation; la méthode doit être optimisée pour chaque protéine membranaire [50]. Les détergents sont classés en trois principaux groupes : ioniques, non-ioniques et zwitterioniques. Par rapport aux détergents ioniques, les détergents non ioniques sont largement utilisés parce qu'ils dénaturent moins les protéines. En revanche, ils sont moins efficaces dans la solubilisation. Les

détergents zwitterioniques donnent des bons rendements de solubilisation mais sont plus dénaturants que les détergents non ioniques [41].

1.4.5. Purification de la protéine membranaire

Une fois que les protéines membranaires sont solubilisées, la protéine d'intérêt doit être isolée. Cette étape est la plus critique et est spécifique à chaque protéine. La purification doit se faire en présence de détergent. Or, une concentration trop élevée en détergent peut réduire la stabilité de la protéine puisque les protéases sont plus susceptibles de la dégrader, et interférer avec les techniques de séparation. La présence de détergents peut également inactiver de manière irréversible les protéines. Un autre problème qui arrive fréquemment est la formation d'agrégats par les protéines membranaires, même en présence de détergent, réduisant considérablement l'efficacité de la purification [48, 51].

Une des méthodes simple mais moins efficace consiste à effectuer différentes ultracentrifugations en faisant varier le ratio protéine:détergent. Les étiquettes d'affinité, attachées à la protéine d'intérêt par génie génétique, sont des outils plus puissants qui permettent de réaliser des purifications avec succès [40]. L'étiquette Histidine est la plus utilisée. Six ou dix résidus sont insérés consécutivement à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine. Ainsi, la protéine étiquetée peut être purifiée par chromatographie d'affinité IMAC (immobilized metal affinity chromatography). Avec cette résine, un ion de nickel est utilisé comme site actif. Quatre des six liens de coordination de l'ion interagissent avec l'acide nitriloacétique (NTA) pour l'immobiliser sur les matrices de chromatographie (Figure 9). Les deux derniers liens de coordination du nickel sont sollicités par les résidus histidines par l'intermédiaire des atomes d'azote du cycle. La méthode d'élution la plus populaire utilise un composé, l'imidazole qui va entrer en compétition avec l'histidine pour le nickel libérant ainsi la protéine cible.

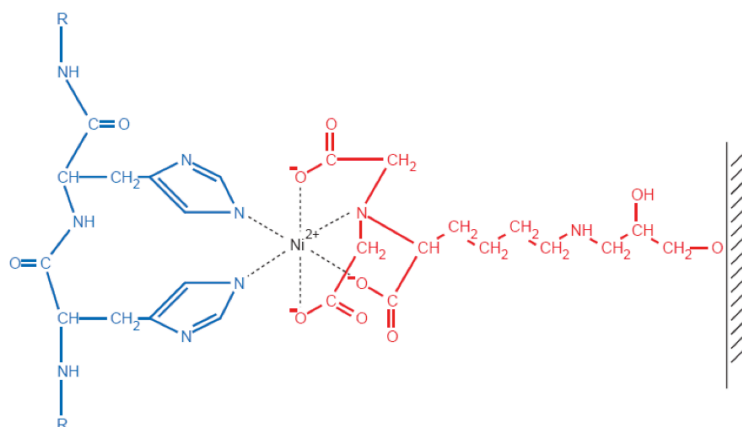


Figure 9. Interaction entre la résine Ni-NTA (en rouge) et l'étiquette histidine (en bleu) [52].

La purification de transporteurs membranaires est donc un vrai défi. Après cette étape, il devient indispensable de reconstituer les protéines dans une bicouche lipidique. En effet, ces protéines ont besoin d'être imbriquées dans des membranes pour exercer leur fonction correctement [53]. Les liposomes qui sont des vésicules de phospholipides s'avèrent être un outil couramment utilisé pour étudier les fonctions des protéines membranaires. La prochaine partie s'intéressera à la reconstitution des protéines membranaires dans des protéoliposomes.

1.5. Reconstitution des transporteurs membranaires dans des protéoliposomes

La méthode générale de reconstitution consiste à extraire le détergent d'une solution contenant les transporteurs membranaires solubilisés ainsi que les lipides sélectionnés qui forment spontanément des complexes phospholipides-protéine-détergent. Avec le retrait du détergent, il y a formation de protéoliposomes, c'est-à-dire, des liposomes dans lesquels les protéines membranaires sont incorporées [54].

1.5.1. Choix du détergent

Les différents types de détergents utilisés dans la purification et la reconstitution de protéines membranaires ont été discutés dans la partie 1.3.5. La concentration micellaire critique (CMC), spécifique à chaque détergent, est un facteur important à prendre en compte dans l'étape de reconstitution. Il s'agit de la concentration à laquelle les micelles se forment dans un milieu aqueux et donc la concentration à laquelle l'extraction de la protéine est possible. Les détergents avec des CMC élevés seront plus faciles à éliminer lors de la reconstitution en protéoliposomes [49].

1.5.2. Techniques de reconstitution

Les techniques de reconstitution sont diverses et chacune présente ses avantages et inconvénients. Il existe principalement trois méthodes : la première utilise une force mécanique, la deuxième consiste à insérer les protéines membranaires dans des liposomes préalablement formés et la troisième repose sur l'élimination du détergent après une étape de solubilisation des phospholipides avec les protéines membranaires.

1.5.3.1. Par sonication

Il s'agit d'une technique mécanique qui repose sur la sonication d'un mélange de phospholipides avec les protéines membranaires. Par cette méthode, les phospholipides auront tendance à former des liposomes. Si le milieu aqueux contient des protéines membranaires, celles-ci seront incorporées dans la bicouche lipidique formant ainsi des protéoliposomes [55]. L'inconvénient avec cette méthode est la faible présence de détergent dans la solution finale qui risque de désintégrer les protéoliposomes fraîchement formés.

1.5.3.2. Par Filtration sur gel

Le détergent peut être enlevé de la solution micellaire de lipide, protéine et détergent par chromatographie de filtration sur gel à l'aide d'une colonne Sephadex. Cette méthode a l'avantage d'être rapide et minimise le temps de contact entre la protéine membranaire et le détergent. Avec cette technique, les protéines membranaires sont reconstituées de manière symétrique dans les protéoliposomes. C'est-à-dire, environ la moitié des protéines se retrouve

dans le même sens que dans les membranes d'origine et l'autre moitié se retrouve inversée [54].

1.5.3.3. Par dialyse

Il s'agit de la méthode de reconstitution la plus classique. La solution micellaire de lipide, protéine et détergent est dialysé plusieurs fois contre un tampon sans détergent pendant au moins 24h. Les monomères de détergent diffusent à travers la membrane de dialyse alors que les micelles et vésicules restent piégés à l'intérieur du sac. Selon la littérature, cette technique permet d'obtenir des vésicules de taille homogène mais elle souffre d'une faible reproductibilité. A cela s'ajoute une possible dégradation des protéines à cause de la durée [54, 56].

1.6. Hypothèse

Ce projet de recherche repose sur le développement d'un nouveau test de perméabilité membranaire *in vitro* à partir de la P-gp reconstituée dans des protéoliposomes. Les protéoliposomes, formant une bicouche lipidique dans laquelle des protéines membranaires sont insérées, ressemblent à des cellules. L'hypothèse est que ce protéoliposome permettra l'évaluation spécifique de deux mécanismes de perméabilité membranaire sur des médicaments d'intérêt soit la diffusion passive et le transport actif. Ceci n'est pas possible avec les tests non-cellulaires présentement disponibles.

1.7. Objectifs

L'objectif général de ce projet est d'évaluer la perméabilité membranaire de différents médicaments à l'aide de la P-gp reconstituée dans des protéoliposomes. Afin d'atteindre cet objectif, plusieurs étapes de développement et d'optimisation sont nécessaires. Ce mémoire abordera les objectifs suivants :

1. Développer les tests de perméabilité cellulaires actuels au sein du laboratoire et en déterminer les limites.
2. Mettre en place les différentes techniques et différents protocoles de purification de protéines membranaires au sein du laboratoire.
3. Produire, extraire et purifier la P-gp à partir des cellules MDCK-MDR1 et *Pichia pastoris* et déterminer le meilleur système d'expression.
4. Évaluer les différentes techniques de reconstitution en protéoliposomes.
5. Évaluer l'activité ATPasique de la P-gp en présence de différents substrats et comparer avec les valeurs de perméabilité obtenues avec les tests cellulaires.

CHAPITRE 2 : Développement des tests de perméabilité

Caco-2 et MDCK-MDR1

2.1. Introduction

De nos jours, les cellules Caco-2 et MDCK sont utilisées pour modéliser l'absorption intestinale des nouveaux composés chez l'humain et les interactions de ceux-ci avec les transporteurs membranaires [57]. La lignée cellulaire Caco-2, d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique humain, est capable de se différencier en un épithélium à colonne formant des jonctions serrées, sur des membranes semi-perméables, mimant des entérocytes humains. Les cellules MDCK, dérivées d'un rein normal de femelle de chien Cocker, sont également capables de former une monocouche de cellules épithéliales de type rénal avec des jonctions serrées. Ces deux modèles cellulaires permettent de prédire l'absorption (élevée ou faible) intestinale humaine [58]. L'expression de nombreux transporteurs dans ces cellules permet d'étudier les phénomènes d'efflux (Tableau 4) donc les tests de perméabilités peuvent être utilisés pour déterminer si un médicament est substrat ou inhibiteur d'un transporteur. Ces tests permettent également d'évaluer les interactions médicamenteuses [58].

	Caco-2	MDCK
Provenance	Adénocarcinome colique humain	Rein de chien
Morphologie cellulaire	Épithélium intestinal	Épithélium tubulaire distal
Temps de culture	15 – 20 jours	3 – 4 jours
Transporteurs d'influx	OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, PepT1, OCT1, OCT2 et OCT3	Oct2, peptides et acides monocarboxyliques
Transporteurs d'efflux	P-gp (MDR1), MRP2, MRP4 et BCRP	Mdr1, Mrp1, Mrp2 et Mrp5

Tableau 4. Caractéristiques des lignées cellulaires Caco-2 et MDCK. Adapté avec permission [58]

Le test de perméabilité MDCK-MDR1 est aussi utilisé pour identifier et caractériser les substrats de la P-gp. Les cellules MDCK-MDR1 sont des cellules MDCK qui ont été transfectées par un rétrovirus portant le gène P-gp humain MDR1. Cet essai présente l'avantage de se focaliser sur la P-gp spécifiquement, à l'inverse du test Caco-2 ou du test MDCK qui ne distingue pas les effets des différents transporteurs membranaires présents dans les cellules. Des approches complémentaires qui utilisent un inhibiteur de la P-gp sont également effectuées pour confirmer le rôle de substrat de certains médicaments. En présence de l'inhibiteur (comme le vérapamil et le kétoconazole [59]), l'efflux du substrat sera modifié [60]. Le test MDCK-MDR1 s'avère donc être un test cellulaire de choix pour évaluer le comportement de la P-gp sur les médicaments.

Il a été décidé de mettre en place, au sein du laboratoire, des tests de perméabilité membranaire et des tests d'inhibition de la P-gp avec les trois lignées cellulaires énumérées ci-dessus afin de mieux comprendre le fonctionnement, les avantages et les limites des tests cellulaires. Plusieurs composés ayant des profils de perméabilité différents ont été testés. Pour le test Caco-2, l'aténolol a été choisi car il est faiblement perméable, le métoprolol et le propranolol parce qu'ils sont fortement perméables [61] et le lopéramide car il est référencé comme substrat de la P-gp [59]. Pour le test MDCK-MDR1, le propranolol est testé car il est fortement perméable, le vérapamil car il s'agit d'un inhibiteur de la P-gp et la colchicine et le lopéramide car ils sont des substrats de la P-gp. Les valeurs de perméabilités et de ratios d'efflux obtenues des différents médicaments testés pourront être comparées avec les valeurs obtenues avec les protéoliposomes.

2.2. Matériels

Le Tableau 5 récapitule tous les produits utilisés dans ce chapitre ainsi que leurs numéros de référence et leurs fournisseurs.

Produit	Numéro de produit	Fournisseur
Acides aminés non essentiels	11140-050	Invitrogen
Aténolol	A7655	Sigma Aldrich
Colchicine	C9754	Sigma Aldrich
DMEM	319-015-CL	Wisent
FBS	085-250	Wisent
HBSS	14025-092	Invitrogen
HEPES	H4034	Sigma Aldrich
Kétoconazole	K1003	Sigma Aldrich
Labétalol hydrochloride	L1011	Sigma Aldrich
Lopéramide	L4762	Sigma Aldrich
MES	M8250	Sigma Aldrich
Métoclopramide hydrochloride	M0763	Sigma Aldrich
Métoprolol	M5391	Sigma Aldrich
Pénicilline-streptomycine (10 000 U/mL)	15140-122	Invitrogen
Propranolol hydrochloride	70716C	AK Scientific
Trypsine-EDTA 0,25%	325-043-CL	Wisent
Vérapamil hydrochloride	V4629	Sigma Aldrich
Plaques 24 puits stériles Costar HTS	3397	Fisher Scientifique
Réservoir des 24 inserts	3395	Fisher Scientifique
Electrode TEER	MERSSTX01	EMD Millipore
Voltmètre	MERS00001	EMD Millipore

Tableau 5. Liste des produits utilisés dans le chapitre 2.

Les cellules MDCK-MDR1 et MDCK-WT ont été gracieusement fournies par Alfred Schinkel (the Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Pays-Bas). Elles ont été cultivées dans le milieu de culture DMEM auquel ont été ajoutés 10% de sérum foetal bovin et 1% de solution d'antibiotiques pénicilline-streptomycine (10 000 U/mL). Les cellules Caco-2 (#HTB-37) ont été achetées chez ATCC (Manassas, USA) et sont cultivées dans le même

milieu additionné de 1% d'acides aminés non essentiels. Lors des passages, les cellules des deux lignées cellulaires sont détachées avec la Trypsine-EDTA 0,25%.

Les tests sont réalisés dans des plaques de 24 puits stériles Costar, avec des inserts composés de filtres en polycarbonate (diamètre des inserts transwell : 6.5 mm, aire des membranes : 0.33 cm², membrane en polycarbonate de 0.4 μM). Pour faciliter les manipulations, les plaques HTS dans lesquelles les 24 filtres sont liés ensemble sont utilisées. Les plaques contenant un réservoir unique sont utilisés pendant la culture de la monocouche cellulaire. La TEER est mesurée à l'aide de l'électrode MERSSTX01 et du voltmètre MERS00001. Le tampon utilisé pour le test de perméabilité est le tampon de Hank, HBSS (*Hanks balanced saline solution*) contenant du calcium et du magnésium. Il a la caractéristique de fournir des sels essentiels aux cellules et d'empêcher les cellules de devenir trop acide ou basique.

2.3. Méthodes

Les tests de perméabilités Caco-2 et MDCK reposent sur le même principe. Les cellules sont cultivées sur une membrane poreuse dans un insert qui plonge dans une chambre de culture individuelle. Après une période de culture qui varie selon le type cellulaire, les cellules forment une monocouche qui isole le compartiment apical du compartiment basolatéral. Le composé à tester est alors ajouté dans le compartiment apical et le transport du composé à travers la membrane est étudié en prélevant des échantillons dans les deux compartiments (Figure 10). Afin d'analyser l'efflux du composé, il est nécessaire d'étudier le transport dans le sens inverse, c'est-à-dire, du côté basolatéral vers le côté apical.

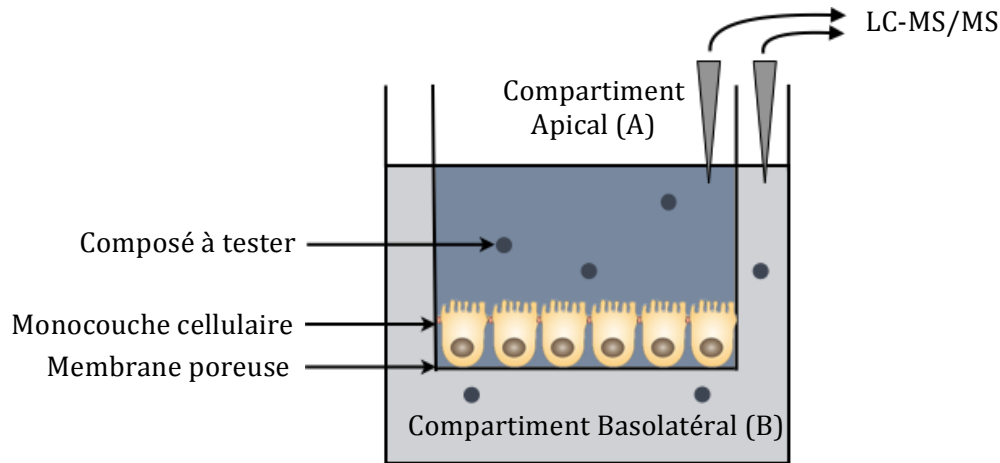


Figure 10. Schéma représentatif des tests de perméabilités cellulaires

2.3.1. Culture cellulaire

Les cellules Caco-2, MDCK-WT et MDCK-MDR1 sont cultivées à 37°C, dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂. Les trois types cellulaires sontensemencés sur des filtres Transwell en polycarbonate, à une densité de 250 000 cellules/cm². Le milieu de culture est remplacé par du milieu frais tous les deux-trois jours. Pour les cellules MDCK-MDR1 et MDCK-WT, le test est effectué trois à quatre jours après l'ensemencement alors que pour les cellules Caco-2, le test est effectué 15 à 18 jours après l'ensemencement.

La bonne formation de la monocouche de cellules et des jonctions serrées est testée et confirmée en mesurant la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) à travers les monocouches de cellules. Les valeurs obtenues sont ensuite multipliées par l'aire du filtre (0.33 cm²) afin d'obtenir une valeur de TEER en ohm.cm² [62]. Les puits avec des valeurs de TEER supérieures à 200 ohm.cm² sont utilisés.

2.3.2. Tests de perméabilités

Avant de commencer le test, la monocouche cellulaire est équilibrée pendant 30 minutes avec le tampon apical et le tampon basolatéral. Pour le test Caco-2, le tampon apical est le tampon HBSS contenant 0.25% de BSA et 25 mM MES à pH 6 et le tampon basolatéral est le tampon HBSS contenant 0.25% BSA et 25 mM HEPES à pH 7,4. Les composés MES et

HEPES sont ajoutés pour maintenir le pH stable en dehors de l'incubateur. En effet, le bicarbonate de sodium contenu dans le milieu de culture, en présence de CO₂ fourni par l'incubateur agit comme régulateur de pH. Or, une fois que les cultures sont enlevées de l'incubateur, le milieu devient rapidement alcalin à cause de l'absence de CO₂ [63]. Pour le test MDCK-WT et MDCK-MDR1, le tampon apical est le même que le tampon basolatéral; il s'agit du tampon HBSS contenant 25 mM HEPES à pH 7,4. Les composés à tester (Aténolol, Propranolol, Métoprolol, Lopéramide, Vérapamil et Colchicine) sont dissous dans du DMSO à une concentration de 10 mM. Pour les tests de perméabilités, les dilutions sont préparées dans le tampon apical. Les composés sont testés à une concentration de 10 μM dans les deux directions (A→B et B→A) en triplicats. À cette dilution, la concentration finale en DMSO n'excède pas 1%; celui-ci ne devrait donc pas affecter l'intégrité de la monocouche et le processus du transport actif [64]. Les volumes ajoutés dans le côté apical et basolatéral sont de 200 μL et 600 μL respectivement. Le test est réalisé à 37°C dans un incubateur sous agitation (50 rpm).

Pour le test Caco-2, des échantillons sont prélevés dans le compartiment receveur à 60, 120 et 180 minutes et le volume prélevé est remplacé par du milieu pré-chauffé à 37°C. Pour le test A vers B, 200 μL d'échantillons sont prélevés dans le côté basolatéral alors que dans le test B vers A, 70 μL d'échantillons sont prélevés dans le côté apical. Pour les tests MDCK-WT et MDCK-MDR1, un seul prélèvement est effectué à 60 min dans le compartiment receveur. Tous les échantillons sont analysés au LC-MS/MS.

2.3.3. Test d'inhibition de la P-gp

Des études de transport bidirectionnelles sont effectuées pour identifier les inhibiteurs de la P-gp avec les cellules MDCK-WT et MDCK-MDR1. Le lopéramide est utilisé comme substrat de la P-gp tel que recommandé par la FDA [59]. Deux inhibiteurs de la P-gp (vérapamil et kétoconazole) sont testés à cinq concentrations différentes (0,5 ; 1 ; 5 ; 10 et 25 μM). La perméabilité est déterminée comme précédemment en présence et en absence d'inhibiteur de la P-gp. L'équilibration de 30 min avant le début du test se fait en présence de l'inhibiteur à la concentration voulue. L'incubation se fait à 37°C, sous agitation (50 rpm), pendant 60 min. Un tableau récapitulatif des tests réalisés est présenté ci-dessous.

	Test de perméabilité Membranaire		Test d'inhibition de la P-gp	
Type de lignée cellulaire	Caco-2	MDCK-WT et MDCK-MDR1	Caco-2	MDCK-WT et MDCK-MDR1
Tampon côté apical	HBSS + 0,25% BSA + 25 mM MES pH 6	HBSS + 25 mM HEPES pH 7,4	HBSS + 25 mM HEPES + inhibiteur pH 7,4	HBSS + 25 mM HEPES + inhibiteur pH 7,4
Tampon côté basolatéral	HBSS + 0,25% BSA + 25 mM HEPES pH 7,4	HBSS + 25 mM HEPES pH 7,4	HBSS + 0,25% BSA 25 mM HEPES + inhibiteur pH 7,4	HBSS + 25 mM HEPES + inhibiteur pH 7,4
Prélèvements	À 60, 120 et 180 minutes	À 60 minutes	À 60, 120 et 180 minutes	À 60 minutes
Composés testés	Aténolol Propranolol Métoprolol Lopéramide	Propranolol Vérapamil Colchicine Lopéramide	<u>Substrats :</u> Métoprolol Propranolol Lopéramide <u>Inhibiteur :</u> Vérapamil	<u>Substrat :</u> Lopéramide <u>Inhibiteurs :</u> Kétoconazole Vérapamil

Tableau 6. Tableau récapitulatif des tests de perméabilité réalisés

2.3.4. Analyse des échantillons

Tous les échantillons prélevés ont été analysés par LC-MS/MS. Le standard interne labétalol a été utilisé pour les échantillons des tests Caco-2 et des tests d'inhibition de la P-gp avec les cellules MDCK. Pour les échantillons des tests de perméabilité avec les MDCK, le métoclopramide a été utilisé. Le Tableau 7 résume les paramètres analytiques de l'appareil.

HPLC	Agilent 1100 series			
MS/MS	MDS sciex 4000 Qtrap			
Logiciel	Analyst® (version 1.6.2)			
Source d'ionisation, mode	Turbo electrospray, ionisation positive			
Scan mode	Multiple reaction monitoring (MRM)			
Paramètres des composés	Composés	DP (V)	MRM	CE (eV)
	Aténolol	80	267 > 145	37
	Vérapamil	60	455 > 165	39
	Métoprolol	80	268 > 116	26
	Propranolol	60	260 > 116	25
	Lopéramide	80	477 > 266	38
	Colchicine	100	400 > 358	30
Standard Interne	Labétalol	65	329 > 91	60
	Metoclopramide	70	300.1 > 184.3	44
Paramètres de la source	Gas température (°C)		600	
	Gas débit (L/min)		50	
	Curtain gaz (psi)		25	
	Capillaire (V)		5500	
Phase mobile	Composition		A: H2O + 0.1% formic acid B: 20/80 Acetonitrile + 0.1% formic acid	
	Gradient		3 à 98% B de 0.3 à 1.8 min, plateau à 98% B pendant 0.9 min	
Débit	0,90 mL/min			
Température de la colonne	45°C			
Volume d'injection	4 µL (2 µL pour le lopéramide)			
Température de l'injection	5°C			
Type de colonne	Luna C18(2), 50 x 4.6mm ,5 µm			

Tableau 7. Résumé des paramètres analytiques du LC-MS/MS

2.3.5. Calculs

2.3.5.1. Perméabilité membranaire apparente

Tous les calculs de perméabilités ont été réalisés à l'aide des feuilles de calculs d'excel proposées par Tavelin et al [65]. Le détail des formules mathématiques utilisées est énoncé dans cette partie. La perméabilité membranaire apparente est calculée selon l'Équation 1. Plusieurs hypothèses doivent être émises pour l'utilisation de cette équation qui dérive de la loi de Fick. Tout d'abord, la quantité de médicament qui s'accumule dans le compartiment receveur est proportionnelle au temps. Puis, le système doit satisfaire aux conditions « sink ». Cela signifie que la concentration de la molécule d'intérêt dans le compartiment receveur n'augmente pas de manière significative. Les conditions « sink » sont respectées lorsque la concentration finale de la molécule à tester dans le compartiment receveur est inférieure à 10% de la concentration initiale dans le compartiment donneur.

Équation 1. Perméabilité membranaire apparente [59]

$$P_{app} = \frac{V_R}{C_{D,0} * S} * \frac{dC}{dt}$$

avec P_{app} : Perméabilité membranaire apparente

V_R : Volume du compartiment receveur (cm^3)

$C_{D,0}$: Concentration du composé à tester dans le compartiment donneur à $t=0$ (mM)

S : Surface du filtre (cm^2)

$\frac{dC}{dt}$: Pente linéaire de la concentration du composé à tester dans le compartiment receveur en fonction du temps (mM/sec)

Lors de l'analyse, il faut prendre en compte des changements de concentrations dans le compartiment donneur. La concentration $C_D(t_i)$ peut être calculée à chaque prélèvement, à partir de la concentration du compartiment donneur au prélèvement précédent $C_D(t_{i-1})$ et de la quantité qui est passée dans le compartiment receveur selon l'Équation 2. Entre deux prélèvements, C_D est considéré comme constant.

Équation 2. Concentration dans le compartiment donneur

$$C_D(t) = C_D(t_{i-1}) - \frac{[C_R(t) - f \times C_R(t_{i-1})] \times V_R}{V_D}$$

avec V_D : Volume du compartiment donneur

$f = 1 - \frac{V_{éch}}{V_R}$: Facteur de dilution lié au remplacement d'échantillon

$V_{éch}$: Volume de l'échantillon prélevé

L'intégration de l'Équation 1 donne l'Équation 3 qui permet de calculer la perméabilité membranaire dans les conditions « sink ».

Équation 3. Intégration du calcul de perméabilité membranaire dans les conditions « sink ».

$$P \times t_i = \frac{1}{A} \times \sum_{k=1}^i \frac{[C_R(t_k) - f \times C_R(t_{k-1})] \times V_R}{[C_D(t_{k-1}) + C_D(t_k)]/2} = FTC_i$$

avec t_i : temps de prélèvement d'échantillon

$C_R(t_k)$: Concentration mesurée de l'échantillon prélevé au temps k

FTC_i : Fraction Transportée Cumulée au temps de prélèvement t_i

Lorsque les conditions « sink » ne sont pas respectées, l'Équation 4 est appliquée.

Équation 4. Concentration dans le compartiment receveur dans les conditions « non sink ».

$$C_R(t) = \left(\frac{M_{tot}}{V_D + V_R} \right) + \left(C_{R0} - \frac{M_{tot}}{V_D + V_R} \right) \times e^{-P \times A \times \left(\frac{1}{V_R} + \frac{1}{V_D} \right) \times t}$$

Or, cette équation est seulement applicable entre chaque prélèvement puisqu'elle ne prend pas en compte les perturbations du système avec les volumes enlevés et rajoutés dans le compartiment receveur. La concentration initiale dans le compartiment receveur pour chaque intervalle doit donc être recalculée selon l'Équation 5.

Équation 5. Concentration initiale dans le compartiment receveur pour chaque intervalle de temps

$$C_{R0,i} = C_{R,i-1}(t_{fin,i-1}) \times f$$

avec $C_{R0,i}$: concentration du compartiment receveur au début de l'intervalle de temps i

$C_{R,i-1}(t_{fin,i-1})$: concentration du compartiment receveur à la fin de l'intervalle de temps précédent

La quantité totale de composé pour chaque intervalle est calculée à partir de l'Équation 6 :

Équation 6. Quantité totale de composé pour chaque intervalle de temps

$$M_{tot,i} = M_{tot,i-1} - M_{éch,i-1} = M_{tot,i-1} - C_{R,i-1}(t_{fin,i-1}) \times V_s$$

avec $M_{tot,i}$: quantité de composé dans le système pendant l'intervalle i

$M_{éch,i-1}$: quantité de composé dans l'échantillon prélevé dans l'intervalle de temps précédent

$M_{tot,i-1}$: quantité de composé dans le système dans l'intervalle précédent

Un ajustement de courbe non linéaire entre les valeurs théoriques des concentrations finales de chaque intervalle avec les valeurs expérimentales doit être effectué pour déterminer la perméabilité. L'ajustement de courbe se fait en minimisant la somme des carrés résiduels selon l'Équation 7.

Équation 7. Somme des carrés résiduels.

$$SSE = \sum [C_{R,i,obs} - C_{R,i}(t_{fin,i})]^2$$

Exemple de calcul de perméabilité dans les conditions « sink » pour l'aténolol :

Expérimentalement, les valeurs de $C_D(0)$, $C_R(60 \text{ min})$, $C_R(120 \text{ min})$ et $C_R(180 \text{ min})$ sont obtenues. Le Tableau 8 indique les données mesurées lors du test de perméabilité de l'aténolol de A vers B pour un puits. Les concentrations $C_D(60 \text{ min})$, $C_D(120 \text{ min})$ et $C_D(180 \text{ min})$ sont ensuite calculées à l'aide de l'Équation 2. Les ratios C_R/C_D sont calculés pour vérifier que les conditions « sink » sont respectées (inférieurs à 0,1). La fraction transportée cumulée est ensuite calculée à l'aide de l'Équation 3. La perméabilité est enfin déterminée en traçant la courbe linéaire de la fraction cumulée en fonction du temps. Elle est de $3,84 \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$.

Temps (secondes)	C _D (Aire/mL)	C _R expérimentales (Aire/mL)	Ratio C _R /C _D	Fraction transportée cumulée (FTC)
0	1737,42	0	0	0
3 600	1734,16	1,09	6,26.10 ⁻⁴	1,14.10 ⁻³
7 200	1729,90	2,14	1,24.10 ⁻³	2,63.10 ⁻³
10 800	1725,67	2,84	1,65.10 ⁻³	4,11.10 ⁻³

Tableau 8. Résultats des calculs obtenus pour l'aténolol lors du test de perméabilité A vers B dans les conditions « sink ».

Détail des calculs :

$$C_{D,3600} = C_{D,0} - (C_{R,3600} \times f) \times \frac{V_R}{V_D}$$

$$C_{D,7200} = C_{D,3600} - (C_{R,7200} \times f) \times \frac{V_R}{V_D}$$

$$C_{D,10800} = C_{D,7200} - (C_{R,10800} \times f) \times \frac{V_R}{V_D}$$

$$FTC_{3600} = \frac{C_{R,3600} - C_{R,0} \times f}{C_{D,3600} + C_{D,0}} \times 2 \times \frac{V_R}{A} + FTC_0$$

$$FTC_{7200} = \frac{C_{R,7200} - C_{R,3600} \times f}{C_{D,7200} + C_{D,3600}} \times 2 \times \frac{V_R}{A} + FTC_{3600}$$

$$FTC_{10800} = \frac{C_{R,10800} - C_{R,7200} \times f}{C_{D,10800} + C_{D,7200}} \times 2 \times \frac{V_R}{A} + FTC_{7200}$$

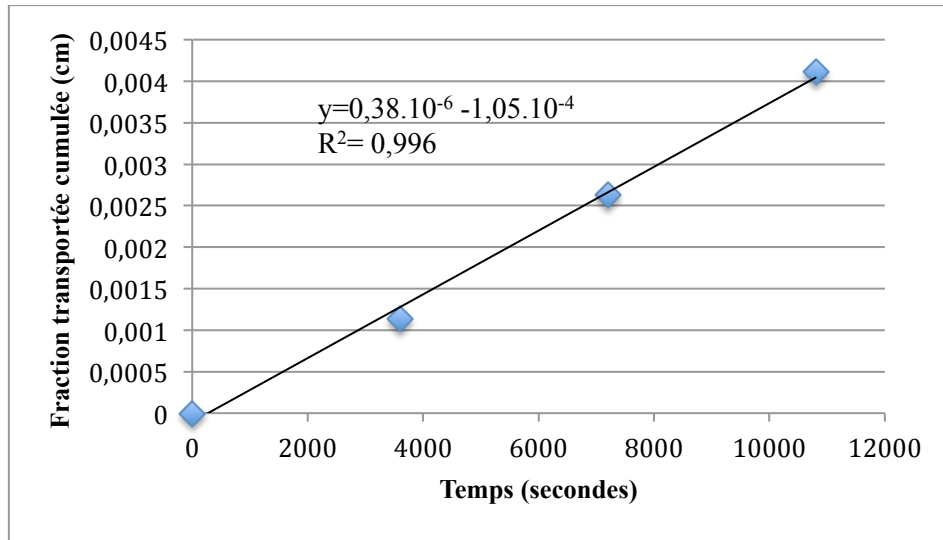


Figure 11. Fraction transportée cumulée en fonction du temps de l'aténolol du test de perméabilité A vers B

Exemple de calcul de perméabilité dans les conditions « non sink » pour le lopéramide :

Expérimentalement, les valeurs de $C_D(0)$, $C_R(60 \text{ min})$, $C_R(120 \text{ min})$ et $C_R(180 \text{ min})$ sont obtenues. Le Tableau 9 indique les données mesurées lors du test de perméabilité du lopéramide de B vers A pour un puits. Dans un premier temps, les calculs sont effectués en supposant que les conditions « sink » sont respectées afin d'avoir une valeur de la perméabilité approximative. Elle est de $9,27.10^{-5}$. Les ratios C_R/C_D calculés confirment que les conditions « sink » ne sont pas respectées. Cette valeur de perméabilité permet de calculer les concentrations dans le compartiment receveur théoriques, pour chaque intervalle de temps, avec l'Équation 4 et l'Équation 5 (Tableau 10). La quantité totale de composé dans le système est déterminée avec l'Équation 6. La perméabilité dans les conditions « non sink » se détermine à l'aide de la fonction Solver de excel. SSE doit être minimisée en faisant varier P_{app} . La contrainte que P_{app} doit être positive doit être rajoutée afin d'éviter d'obtenir des solutions erronées. La fonction solveur d'excel donne une perméabilité de $2,21.10^{-4} \text{ cm/sec}$.

Temps (secondes)	C _D (Aire/mL)	C _R expérimentales (Aire/mL)	Ratio C _R /C _D	Fraction transportée cumulée
0	21 310,60	0	0	0
3 600	17 717,56	10 779,12	0,61	0,33
7 200	14 603,64	16 527,85	1,13	0,69
10 800	12 303,39	17 919,32	1,46	1,00

Tableau 9. Résultats des calculs obtenus pour le lopéramide lors du test de perméabilité B vers A dans les conditions « sink ».

Temps (minutes)	C _R expérimentales (Aire/mL)	C _R théoriques (Aire/mL)	(C _R expérimentale - C _R théorique) ²	M _{tot}
0	0	0	0	-
3 600	10 779,12	13 158,65	5 662 143,47	14 770,06
7 200	16 527,85	14 795,17	3 002 155,11	13 848,95
10 800	17 919,32	14 178,09	13 996 779,3	12 813,29

Tableau 10. Résultats des calculs obtenus pour le lopéramide lors du test de perméabilité B vers A dans les conditions « non sink ».

Détail des calculs :

$$C_{R,3600} = \left(\frac{M_{tot,3600}}{V_D + V_R} \right) + \left(C_{R0} - \frac{M_{tot,3600}}{V_D + V_R} \right) \times e^{-P \times A \times \left(\frac{1}{V_R} + \frac{1}{V_D} \right) \times 3600}$$

$$C_{R,7200} = \left(\frac{M_{tot,7200}}{V_D + V_R} \right) + \left(C_{R,3600} \times f - \frac{M_{tot,7200}}{V_D + V_R} \right) \times e^{-P \times A \times \left(\frac{1}{V_R} + \frac{1}{V_D} \right) \times (7200 - 3600)}$$

$$C_{R,10800} = \left(\frac{M_{tot,10800}}{V_D + V_R} \right) + \left(C_{R,7200} \times f - \frac{M_{tot,10800}}{V_D + V_R} \right) \times e^{-P \times A \times \left(\frac{1}{V_R} + \frac{1}{V_D} \right) \times (10800 - 7200)}$$

$$M_{tot,3600} = C_{D,0} \times V_D$$

$$M_{tot,7200} = M_{tot,3600} - C_{R,3600} \times V_s$$

$$M_{tot,10800} = M_{tot,7200} - C_{R,7200} \times V_s$$

2.3.5.2. Ratio d'efflux (RE) et Ratio net d'efflux (RNE)

Le ratio d'efflux est calculé selon l'Équation 8 [64] :

Équation 8. Ratio d'efflux

$$RE = \frac{P_{app} \text{ (B vers A)}}{P_{app} \text{ (A vers B)}}$$

avec P_{app} (B dans A) : Valeur de P_{app} mesurée dans la direction B vers A

P_{app} (A dans B) : Valeur de P_{app} mesurée dans la direction A vers B

Étant donné que la P-gp canine est fortement présente dans les cellules MDCK, il est recommandé de calculer le ratio net d'efflux pour annuler l'effet de ce transporteur endogène et éviter les faux positifs. Le ratio net d'efflux est calculé selon l'Équation 9 [66]:

Équation 9. Ratio net d'efflux

$$RNE = \frac{RE_{MDR1}}{RE_{WT}}$$

avec RE_{MDR1} : ratio d'efflux obtenu dans les cellules MDCK-MDR1

RE_{WT} : ratio d'efflux obtenu dans les cellules MDCK-WT

2.3.5.3. Pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'Équation 10 [58]:

Équation 10. Pourcentage d'inhibition

$$\% \text{ inhibition} = \frac{RE_A - RE_i}{RE_A - 1} \times 100$$

avec RE_A : ratio d'efflux en l'absence d'inhibiteur

RE_i : ratio d'efflux en présence d'inhibiteur

2.3.5.4. Analyse statistique

Le test-t de Student bilatéral est utilisé pour comparer les perméabilités membranaires et les ratios d'efflux entre deux composés. Une valeur de p inférieure à 0,05 indique une différence significative.

2.4. Résultats

2.4.1. Mesures de perméabilités dans les cellules Caco-2 et MDCK-MDR1

Les valeurs de perméabilité membranaire obtenues avec les cellules Caco-2 sont cohérentes avec celles de la littérature et sont présentées dans le Tableau 11. Les conditions « non sink » ont été rencontrées pour le métoprolol, le propranolol et le lopéramide dans le sens B vers A. Les calculs ont été ajustés en conséquence. La $P_{app}(A-B)$ de l'aténolol qui est faiblement perméable est inférieure à $1,0 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$ [67-69]. On obtient des valeurs de $P_{app}(A-B)$ similaires pour le métoprolol et le propranolol comme attendu. Pour ces deux composés très perméables, les valeurs de perméabilité sont très variables d'un laboratoire à un autre. Ainsi, elles passent de $2,3 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$ et $3,3 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$ [67] pour le métoprolol et le propranolol respectivement à $23,7 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$ et $41,9 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$ [70]. Dans notre cas, les valeurs de $P_{app}(A-B)$ sont d'environ $5,0 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$. Les ratios d'efflux calculés sont élevés pour ces deux composés perméables. Pour déterminer si le métoprolol et le propranolol subissent des phénomènes d'efflux, des tests d'inhibition ont été réalisés. Les résultats sont présentés dans la partie suivante. Enfin, le lopéramide est le composé qui présente le plus grand ratio d'efflux par rapport aux autres composés dans le test Caco-2, ce qui confirme qu'il subit un phénomène d'efflux.

Les résultats du test MDCK-MDR1 montrent que le propranolol est fortement perméable avec une perméabilité de $59,79 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$ (Tableau 11). Celui-ci présente la plus grande perméabilité par comparaison avec les autres composés. Son ratio d'efflux étant très faible ($0,69 \pm 0,07$), cela confirme qu'il n'est pas transporté. Des résultats similaires ont été au préalable obtenus [71-73]. La colchicine et le lopéramide sont fortement transportés dans le sens B vers A comme le montre les ratios d'efflux élevés obtenus ($16,80 \pm 2,62$ et $13,95 \pm 7,45$ respectivement).

Lignée cellulaire	Composé	$P_{app}(A-B)$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Ratio d'efflux
Caco-2	Aténolol	$0,56 \pm 0,26$	$1,15 \pm 0,53$
	Propranolol	$5,01 \pm 0,36$	$35,27 \pm 5,61$
	Métoprolol	$5,10 \pm 0,36$	$60,98 \pm 15,52$
	Lopéramide	$1,77 \pm 0,11$	$158,70 \pm 43,23$
MDCK-MDR1	Propranolol	$59,79 \pm 1,16$	$0,69 \pm 0,07$
	Vérapamil	$34,26 \pm 13,44$	$0,94 \pm 0,37$
	Colchicine	$1,02 \pm 0,12$	$16,80 \pm 2,62$
	Lopéramide	$3,23 \pm 1,69$	$13,95 \pm 7,45$
MDCK-WT	Propranolol	$56,13 \pm 9,92$	$0,72 \pm 0,17$
	Vérapamil	$33,21 \pm 10,29$	$1,01 \pm 0,45$
	Colchicine	$4,16 \pm 2,96$	$2,16 \pm 1,55$
	Lopéramide	$6,13 \pm 1,55$	$3,30 \pm 0,87$

Tableau 11. Mesures de perméabilité obtenues dans les cellules Caco-2, MDCK-MDR1 et MDCK-WT.

Les ratios net d'efflux présentés dans la Figure 12 permettent d'analyser spécifiquement l'effet de la P-gp humaine sur les différents composés testés. Ils sont élevés pour le lopéramide et la colchicine. Selon la FDA, tout composé ayant un ratio d'efflux supérieur ou égal à 2 est considéré comme un substrat de la P-gp [59]. Cela confirme que le lopéramide et la colchicine sont transportés par la P-gp. Pour le propranolol et le vérapamil, les ratios d'efflux obtenus avec les cellules MDCK-MDR1 et les ratios d'efflux obtenus avec les cellules MDCK-WT sont similaires ($p > 0,05$). Cela suggère que ces deux composés ne sont pas substrats de la P-gp à la concentration testée.

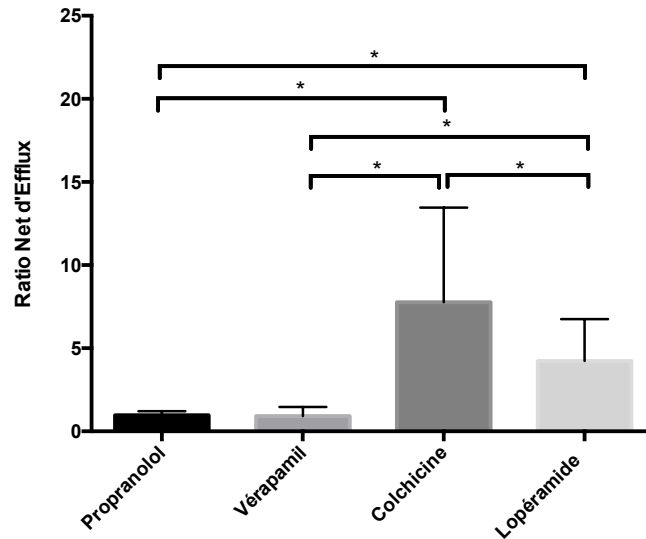


Figure 12. Ratio Net d'Efflux obtenus pour le propranolol, le vérapamil, la colchicine et le lopéramide. * $p < 0,05$: différence significative entre les ratios nets d'efflux

2.4.2. Test d'inhibition de la P-gp

Comme les ratios d'efflux du métoprolol et du propranolol obtenus avec les cellules Caco-2 sont élevés, un test d'inhibition de la P-gp a été réalisé avec la même lignée cellulaire. Le lopéramide a également été testé par comparaison. Le ratio d'efflux en présence et en absence d'un inhibiteur de la P-gp, le vérapamil, a été comparé. Les données montrent qu'il n'y a pas de différence significative pour le métoprolol ($p < 0,05$). Concernant le propranolol, le ratio d'efflux est légèrement plus élevé. Cela confirme que ces deux composés ne subissent pas de phénomène d'efflux dans les cellules Caco-2. En revanche, le ratio d'efflux est sept fois moins élevé pour le lopéramide en présence de l'inhibiteur (Figure 13). Ce résultat confirme que le lopéramide est transporté dans les Caco-2. Du fait de la non-spécificité du vérapamil pour la P-gp, il n'est pas possible de conclure sur l'implication spécifique de la P-gp dans le transport des composés. D'autres transporteurs membranaires pourraient être impliqués.

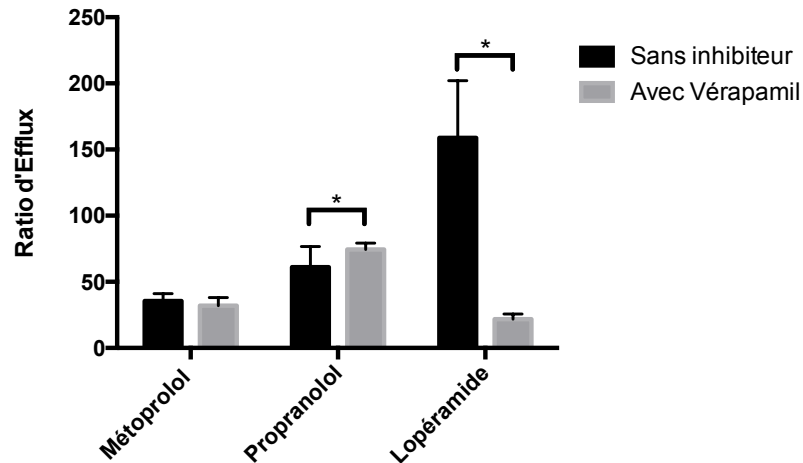


Figure 13. Comparaison du ratio d'efflux en présence et en absence d'inhibiteur de la P-gp dans les cellules Caco-2. * $p < 0,05$: différence significative des ratios d'efflux avec l'ajout du vérapamil.

Afin de prouver que le lopéramide est bien un substrat de la P-gp, celui-ci a été testé avec les cellules MDCK-MDR1 et MDCK-WT avec et en l'absence de l'inhibiteur vérapamil. Un nouveau composé, le kétoconazole, est testé pour vérifier son rôle d'inhibition de la P-gp [59]. Les résultats montrent que le pourcentage d'inhibition augmente avec la concentration en inhibiteur (Figure 14A). Des résultats similaires sont obtenus entre le kétoconazole et le vérapamil et entre les cellules WT et les cellules MDR1. L'analyse du ratio net d'efflux en fonction de la concentration en inhibiteur permet d'évaluer spécifiquement l'effet sur la P-gp humaine. Les deux inhibiteurs testés ont des profils similaires (Figure 14B); une plus grande inhibition est observée pour le kétoconazole par comparaison avec le vérapamil.

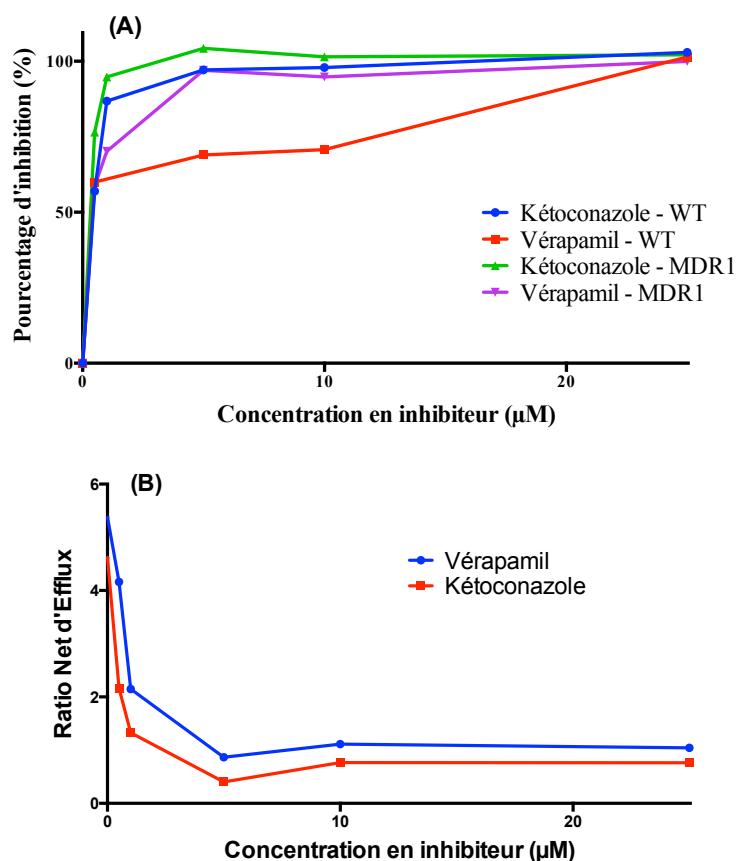


Figure 14. Résultats du test d'inhibition de la P-gp. Pourcentage d'inhibition de l'efflux du Lopéramide en fonction de la concentration en inhibiteur (A). Ratio Net d'Efflux du Lopéramide en fonction de la concentration en inhibiteur de la P-gp (B).

2.5. Conclusion

Le travail effectué avec les différents tests de perméabilité et d'inhibition à l'aide des trois lignées cellulaires nous a permis dans un premier temps, de mettre en place, d'optimiser des protocoles expérimentaux et de générer des données qui seront par la suite utilisés et appliqués au sein de la Plateforme de Biopharmacie à l'Université de Montréal. De plus, les résultats nous ont permis d'approuver la sélection des médicaments qui seront utilisés dans la suite du projet : le lopéramide, la colchicine et le vérapamil. L'affinité de ces trois composés pour la P-gp vient d'être confirmée.

Cette étude a également permis de soulever les limites des tests de perméabilité cellulaires. En effet, les perméabilités apparentes calculées varient beaucoup d'un article à l'autre. Ces variabilités peuvent être dues à la provenance des cellules caco-2, au nombre de passage, aux conditions de culture cellulaire, au manipulateur lui-même [60]. Chaque laboratoire doit donc établir ses propres valeurs de perméabilités et ratios d'efflux. À cela s'ajoute la longue préparation pour les Caco-2, qui diminue la productivité et augmente le risque de contamination [74]. Le présent projet devrait s'affranchir des inconvénients liés aux tests cellulaires. La première étape du projet consistant à produire un transporteur membranaire : la glycoprotéine-P, le prochain chapitre s'attarde sur l'isolement de cette protéine membranaire à partir de la lignée cellulaire MDCK-MDR1.

CHAPITRE 3 : Production, extraction et purification de la glycoprotéine-P à partir des cellules de mammifères

MDCK-MDR1

3.1. Introduction

La lignée cellulaire MDCK-MDR1 a été choisie comme système d'expression pour produire, extraire et purifier la P-gp pour plusieurs raisons. D'une part, le matériel nécessaire à la culture cellulaire, les installations mais aussi les modes opératoires étaient disponibles au sein du laboratoire. D'autre part, ce système d'expression a la caractéristique de produire une P-gp avec une glycosylation similaire à celle retrouvée dans les cellules humaines.

3.2. Matériels

Le Tableau 12 récapitule tous les produits utilisés dans ce chapitre ainsi que leurs numéros de référence et leurs fournisseurs.

Produit / Matériel	Numéro de produit / Matériel	Fournisseur
Acétate de zinc	223352	Sigma Aldrich
Acide Ascorbique	A7506	Sigma Aldrich
Acrylamide (30% solution)	161-0158	BioRad
Ammonium molybdate	A7302	Sigma Aldrich
Anticorps C219	NB600-1036	Novus Biologicals
Anticorps Na,K-ATPase	3010	Cell Signaling Technology
Anticorps anti-mouse IgG	074-1806	KPL
APS	161-0700	BioRad
ATP	A2383	Sigma Aldrich
β -mercaptoéthanol	M3148	Sigma Aldrich
CHAPS	C3023	Sigma Aldrich
DMEM	319-015-CL	Wisent
DMSO	D128-4	Fisher Scientifique
DPBS	311-425-CL	Wisent
DTT	D0632	Sigma Aldrich

ECL	170-5060	BioRad
EDTA	BP120-1	Fisher Scientific
FBS	085-250	Wisent
Glycine	G8898	Sigma Aldrich
Leupeptine	L9783	Sigma Aldrich
MgCl ₂	M8266	Sigma Aldrich
NaN ₃	S2002	Sigma Aldrich
NH ₄ Cl	254134	Sigma Aldrich
Pefabloc	11585916001	Sigma Aldrich
Pénicilline-streptomycine	15140-122	Invitrogen
Pepstatine A	P5318	Sigma Aldrich
SDS	190522	MP Biomedicals
Sucrose	SU164-500	Galenova
TEMED	161-0800	BioRad
Tris-Hcl	T5941	Sigma Aldrich
Trypsine-EDTA 0,25%	325-043-CL	Wisent
Membrane de Nitrocellulose	10600001	GE Healthcare
Kit BCA pour déterminer la concentration en protéines	PI-23227	Fisher Scientifique
Appareil à cavitation	4639 Cell Disruption Vessel	Parr Instrument Company
Hémacytomètre	3110	Hausser Scientific
Centrifugeuse IEC Multi (RF)	8466 – 120V – 60Hz	Thermo IEC
Spectrophotomètre	Optima L-90K	Beckman Coulter
Ultracentrifugeuse pour grand volume (12mL)	Rotor SW41	
Micro ultracentrifugeuse pour petits volumes (0,5 mL)	Sorvall Discovery M150 SE	Hitachi
	Rotor S120AT3	

Tableau 12. Liste des produits utilisés dans le chapitre 3

3.3. Méthodes

La P-gp humaine est extraite des cellules MDCK-MDR1 selon le même protocole d'extraction et de purification de la P-gp des cellules CH^RC5 développé par Doige et Sharom [75, 76].

3.3.1. Composition des solutions

La composition des différents tampons et solutions utilisés dans ce chapitre est présentée dans le Tableau 13.

Nom de la solution	Composition de la solution
Tampon d'homogénéisation	10 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, 0,2 mM CaCl ₂ , 0,02% NaN ₃ , 1 µg/ml de Pefabloc, 1µg/ml d'aprotinine, 1µg/ml de leupeptine, 1µg/ml de pepstatine A à pH 7,5
Tampon post-homogénéisation	10 mM Tris-Hcl, 25 mM sucrose, 0.02% NaN ₃ à pH 7,5
Tampon de sucrose	10 mM Tris-Hcl, 1 mM EDTA, 35% (w/w) sucrose, 0,02% NaN ₃ à pH 7,5
Tampon de congélation	10 mM Tris-Hcl, 250 mM sucrose, 0,02% NaN ₃ à pH 7,5
Tampon de solubilisation A	25 mM CHAPS, 50 mM Tris-Hcl, 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 0,02% NaN ₃ , 1 mM DTT à pH 7,5
Tampon de solubilisation B	15 mM CHAPS, 50 mM Tris-Hcl, 0,15 M NH ₄ Cl, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 0,02% NaN ₃ à pH 7,5
Gel de concentration	125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 3,9% Acrylamide, 0,1% TEMED, 0,05% APS
Gel de séparation	375 mM Tris pH 8,8, 0.1% SDS, 7,5% Acrylamide, 0,05% TEMED et 0,05% APS
Laemmli 5X	60 mM Tris-Hcl à pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 5% β-mercaptoéthanol, 0,01% bleu de bromophénol
Solution de coloration au bleu de Coomassie	50% méthanol, 10% acide acétique glacial, 0,05% (w/v) bleu de coomassie R-250
Solution de décoloration	10% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique glacial
Tampon de transfert	25 mM Tris, 192 mM glycine, 10% méthanol
TBS-T	50 mM Tris-Hcl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 à pH 7,6
Blotto 5%	5% de lait en poudre dans du TBS-T
Solution d'anticorps primaire	Anticorps C219 dans la solution de blotto 5% (dilution 1 :1000)
Solution d'anticorps secondaire	Anticorps secondaire anti Mouse IgG dans la solution de blotto 5% (dilution 1:25 000)
Tampon de réaction pour le test ATPasique	50 mM MOPS-Tris, 0,1 mM EGTA, 50 mM KCl, 5 mM Sodium azide, 2 mM DTT, 1 mM ouabain
Solution de révélation pour le test ATPasique	8 % acide ascorbique, 7 mM ammonium molybdate, 3 mM acétate de zinc

Tableau 13. Composition des solutions utilisées dans la production et l'extraction de la P-gp à partir des MDCK-MDR1

3.3.2. Culture cellulaire

Les cellules MDCK-MDR1 sont cultivées selon la même méthode que dans le deuxième chapitre jusqu'à obtenir environ deux milliards de cellules au total. Les cellules utilisées sont à faible passage (inférieur à 8).

3.3.3. Préparation des cellules pour l'extraction

Les cellules sont lavées une première fois dans du DPBS puis la suspension de cellules est centrifugée à 1000 rpm pendant cinq minutes et est resuspendue dans un tampon d'homogénéisation à 4°C pour avoir une concentration de 5.10^8 cellules/mL. Le tampon utilisé a un fort pouvoir tampon pour empêcher les variations de pH suite à la libération du contenu cellulaire. Ainsi, à pH acide, les enzymes lysosomiques pourraient dégrader les protéines cellulaires. Le sucrose permet de stabiliser les interactions entre protéines. L'ajout d'inhibiteurs de protéases prévient la dégradation de la P-gp. L'azoture de sodium (NaN_3) est utilisé dans le tampon comme agent de conservation.

3.3.4. Lyse cellulaire

Les cellules sont lysées à l'aide d'une bombe à disruption. De l'azote est dans un premier temps dissous dans les liquides, dans une chambre pressurisée. Ensuite, la pression est soudainement libérée provoquant un changement d'état de l'azote : il passe de l'état liquide à gazeux provoquant la formation de bulles à l'intérieur des cellules. Les membranes cellulaires sont étirées jusqu'à se rompre et libérer les constituants cellulaires [77].

La méthode consiste à déposer la suspension de cellules (4 à 5mL environ) au fond de l'instrument. L'appareil est fermé et une pression de 400 psi d'azote est appliquée à l'échantillon. La pression est relâchée au bout de cinq minutes par la valve d'échappement à la base de l'instrument. L'homogénat de cellules est récupéré.

3.3.5. Extraction des membranes

L'homogénat de cellules est dilué dans une solution d'EDTA afin d'obtenir une concentration de 1 mM puis la suspension est diluée deux fois avec le tampon post-homogénéisation. Trois centrifugations à 700 g pendant 5 min permettent de retirer les débris

cellulaires. Les surnageants sont récupérés, regroupés ensemble, déposés à la surface du tampon de sucrose et centrifugés à 95 000 g pendant 1h à 4°C. Les membranes sont récupérées à l'interphase, diluées dans le tampon de congélation et centrifugées à 100 000 g pendant 30 min. Le culot qui contient les membranes est resuspendu dans 200 µL tampon de congélation et congelé à -80°C.

3.3.6. Solubilisation des membranes

L'échantillon contenant les membranes est décongelé et centrifugé à 164 000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans un premier tampon de solubilisation A pour avoir une concentration finale de 10 mg/ml. La suspension est incubée à 4°C pendant 30 min puis centrifugée de nouveau à 164 000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans un deuxième tampon de solubilisation B pour avoir une concentration finale en protéines de 0,45 mg/mL. La suspension est incubée à 4°C pendant 30 min puis centrifugées à 15 000 g pendant 15 min. Le surnageant qui contient la P-gp purifiée est aliquoté et congelé à -80°C.

3.3.7. Dosage des protéines par la méthode BCA

Le dosage des protéines est effectué à l'aide du kit commercial BCA de Pierce. Le principe de ce test est basé sur la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ en milieu alcalin. Les ions Cu^+ forment ensuite un complexe de couleur violette avec l'acide bicinchoninique (BCA) qui absorbe à 562 nm (Figure 15). L'absorbance est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon [78]. La concentration finale en protéines dans les échantillons est estimée à l'aide d'une courbe standard réalisée avec la protéine de référence BSA.

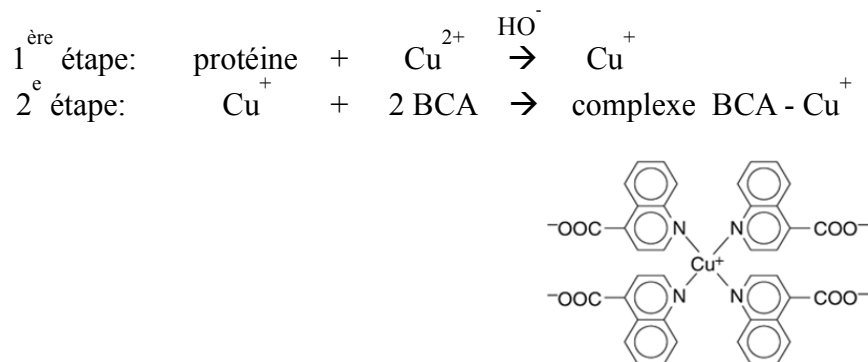


Figure 15. Réaction schématique du test BCA [79]

3.3.8. Analyse des échantillons par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et western blot

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE) est la méthode la plus commune pour identifier toutes les protéines présentes dans les échantillons. Le principe consiste à dissocier les protéines en chauffant les échantillons en présence du détergent anionique sodium dodecyl sulfate (SDS) et de l'agent réducteur, β -mercaptoéthanol. En se liant à la protéine, le SDS la dénature et lui confère une charge nette négative. La quantité de SDS liée est relativement proportionnelle à la masse moléculaire des protéines. Ainsi, la migration, sous un courant électrique, des complexes formés de détergent et de protéines est proportionnelle à la taille des polypeptides. Il est alors possible d'évaluer la masse moléculaire des protéines présentes dans les échantillons par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire. Le gel est ensuite coloré au bleu de coomassie afin de détecter toutes les protéines ou transféré sur membrane (western blot) pour identifier spécifiquement la protéine d'intérêt et confirmer sa taille.

Le principe du western blot consiste à transférer les protéines sur une membrane qui est par la suite exposée à un anticorps primaire spécifique à la P-gp (C219). Le tout est ensuite mis en présence d'un anticorps secondaire lié à l'enzyme peroxydase de raifort (HRP). Le complexe protéine-anticorps primaire-anticorps secondaire est visualisé par une réaction chimiluminescence à l'aide du substrat ECL (Enhanced Chemiluminescence) qui réagit avec l'HRP [80].

3.3.8.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les échantillons sont analysés sur des gels de polyacrylamide à 7.5% constitués d'un gel de concentration et d'un gel de séparation [80]. Le persulfate d'ammonium est utilisé comme initiateur de la copolymérisation de l'acrylamide et de bis-acrylamide. Le TEMED accélère la réaction de polymérisation en catalysant la formation de radicaux libres à partir de l'APS. Les échantillons à tester sont dilués deux fois avec la solution de Laemmli 5X. La migration s'effectue sous un courant de 150 mA pendant 1h environ.

3.3.8.2. Coloration au bleu de Coomassie

Le bleu de coomassie R-250 est un colorant aminotriarylméthane qui forme des complexes avec les protéines par des forces de van der Waals et des interactions électrostatiques avec les groupes NH_3^+ . La quantité de colorant liée est proportionnelle à la quantité de protéines [80]. Pour ce faire, le gel est coloré pendant 1h, à température ambiante, sous une agitation lente, dans la solution de coloration au bleu de Coomassie. Le gel est ensuite décoloré toute la nuit dans la solution de décoloration [81].

3.3.8.3. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Une fois la migration terminée, les protéines peuvent être transférées sur une membrane de nitrocellulose avec un seuil de rétention de $0,2 \mu\text{m}$ pour rendre les protéines accessibles aux anticorps. La membrane est collée au gel SDS-PAGE et un courant électrique est appliqué provoquant la migration des protéines chargées depuis le gel vers la membrane. Le transfert des protéines s'effectue dans le tampon de transfert à 100 V pendant 1h à 4°C . L'efficacité du transfert est vérifiée au rouge ponceau.

3.3.8.4. Révélation

La membrane est tout d'abord saturée dans une solution de Blotto 5% par une incubation d'1 heure à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite incubée avec la solution d'anticorps primaire C219 toute une nuit à 4°C . Puis la membrane est rincée trois fois au TBS-T pendant cinq minutes avant d'être incubée avec la solution d'anticorps secondaire « Anti-Mouse » pendant une heure sous agitation à température ambiante. La membrane est de nouveau rincée trois fois dans la solution de TBS-T et est révélée à l'aide du système de détection ECL. L'anticorps primaire C219 ne distingue pas la P-gp humaine de la P-gp canine donc l'expression totale de la P-gp pourra seulement être déterminée [82].

3.3.9. Analyse de l'effet du nombre de passage sur l'expression de la P-gp dans les cellules MDCK-MDR1

Les culots de 200 000 cellules à différents passages sont comparés par western blot selon la méthode décrite précédemment. Après trypsination, 200 000 cellules sont prélevées

puis lavées avec du DPBS. Le culot sec de cellules est congelé à la suite d'une centrifugation à 15000 rpm pendant dix minutes. Afin de comparer les échantillons entre eux, une normalisation est effectuée avec la protéine (Na⁺ + K⁺)-ATPase et l'anticorps correspondant. Pour cela, la membrane de nitrocellulose est hybridée toute une nuit avec l'anticorps Na,K-ATPase à une dilution de 1 :1000 dans 5% BSA TBS-T selon les recommandations du fournisseur. La deuxième hybridation se fait avec l'anticorps secondaire Rabbit à une dilution de 1 :10 000 dans une solution de Blotto. L'intensité des bandes de chaque protéine est ensuite déterminée. Pour chaque échantillon, le ratio de l'intensité de la bande correspondante à la P-gp sur l'intensité de la bande correspondante à la pompe (Na⁺ + K⁺)-ATPase est calculé.

3.3.10. Détermination de l'activité ATPasique

3.3.10.1. Principe

L'activité ATPasique des échantillons est déterminée par un test colorimétrique. Le principe de ce test repose sur le fait que la P-gp transporte des substrats grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. En conséquence, il est possible d'évaluer l'interaction des différents médicaments avec le transporteur membranaire en déterminant l'activité ATPasique de la protéine. Dans ce test, la quantité de phosphate inorganique générée par l'hydrolyse de l'ATP est déterminée par colorimétrie.

La procédure générale du test consiste à ajouter du MgATP au tampon de réaction contenant la P-gp et le composé substrat. Le mélange est incubé pendant 60 min à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par addition de SDS. L'ajout d'ammonium molybdate permet de former un complexe coloré avec le phosphate inorganique dans des conditions acides. L'activité ATPasique observée dans l'échantillon est calculée à partir de la quantité de phosphate inorganique libéré déterminée par colorimétrie.

Plusieurs contrôles sont effectués lors de chaque essai :

- Contrôle sans composé test : il permet de mesurer l'activité basale ATPasique du transporteur en l'absence de substrat
- Contrôle Background : il permet de mesurer la quantité de phosphate inorganique dérivée du tampon de réaction

- Contrôle avec l'orthovanadate : l'activité de la P-gp étant inhibée par l'orthovanadate, il permet de mesurer l'activité ATPasique spécifique au transporteur.

3.3.10.2. Méthode

Le protocole réalisé est basé sur le protocole de GenoMembranes [83]. Les échantillons de membranes ou de P-gp sont dilués dans le tampon de réaction dans une plaque 96 puits (volume final de 40 μ L). L'EGTA permet d'inhiber l'activité des protéines transmembranaires Ca^{2+} -ATPase et l'ouabain inhibe l'activité des pompes sodium-potassium [84]. Les médicaments à tester sont ajoutés dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). La concentration finale en DMSO est de 1%. Trois substrats de la P-gp sont testés : le vérapamil à une concentration de 5 μ M et la colchicine et le lopéramide à une concentration de 50 μ M. Le vérapamil est testé à une concentration dix fois moins élevée que les autres composés puisqu'il a été démontré qu'il avait un effet biphasique sur l'activité ATPasique : à une concentration inférieure à 10 μ M, il produit une nette stimulation alors que pour des concentrations plus élevées, il joue un rôle d'inhibiteur [76]. Pour le contrôle sans composé, une solution de DMSO est ajoutée pour obtenir la même concentration finale de 1%. La réaction démarre avec l'addition de 4 mM MgATP dans les puits à 37°C. Le MgATP sera gardé sur glace après décongélation pour limiter la formation de phosphate inorganique par l'hydrolyse spontanée de l'ATP. Le test est effectué en présence ou en absence de 0,5 mM d'orthovanadate. Après une heure, la réaction est arrêtée avec l'ajout de 30 μ L de 10% SDS. Pour le background, la réaction est bloquée par ajout de la solution de SDS avant le début de la réaction ATPasique avec l'ajout de l'ATP. Puis 200 μ L de la solution de révélation sont ajoutés par puits sont ajoutés par puits. La plaque est incubée pendant 20 min à 37°C pour développer la coloration puis l'absorbance est déterminée à 750 nm.

3.4. Résultats

3.4.1. Culture cellulaire des cellules MDCK-MDR1

3.4.1.1. Croissance cellulaire

La courbe de croissance cellulaire des cellules MDCK-MDR1 obtenue (Figure 16) comporte trois phases qui sont caractéristiques des populations cellulaires : la phase d'adaptation pendant le premier jour, la phase exponentielle pendant deux jours et enfin la phase stationnaire après le troisième jour. Les passages des cellules Mdrk-Mdr1 ont donc été effectués tous les deux jours à une concentration de 20-30 000 cellules /cm² afin d'éviter toute détérioration des cellules.

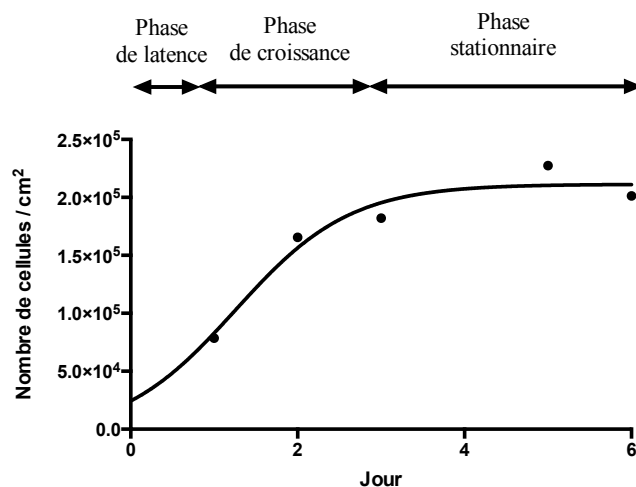


Figure 16. Courbe de croissance cellulaire des cellules MDCK-MDR1

3.4.1.2. Influence des passages sur l'expression de la P-gp

Le western blot des culots des cellules MDCK-MDR1 à différents passages est présenté dans la Figure 17A. Le comptage des cellules par l'hémacytomètre étant trop approximatif, il était préférable de normaliser les résultats du western blot pour pouvoir les comparer entre eux (Figure 17B). La normalisation s'est faite avec la pompe sodium-potassium puisqu'elle est exprimée dans les cellules MDCK-MDR1. Le niveau d'expression de cette protéine est supposé être constant suivant les passages lorsque les mêmes conditions de culture sont appliquées.

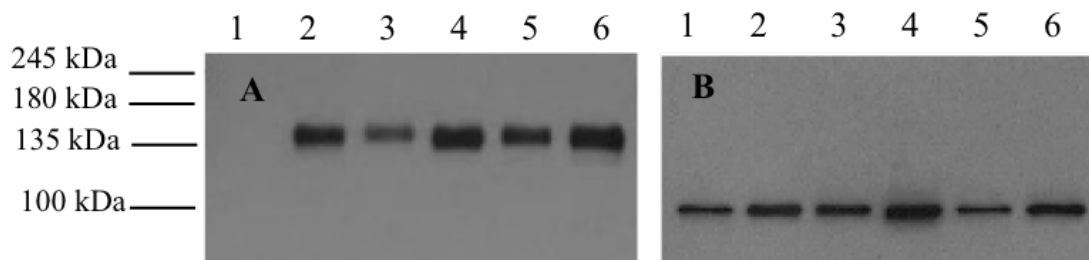


Figure 17. Analyse par western blot de l'expression de la P-gp dans les cellules MDCK-MDR1 en fonction du nombre de passages. A : Hybridation avec l'anticorps C219 ; temps d'exposition de 20 secondes. B : Hybridation avec l'anticorps Na,K-ATPase; temps d'exposition de 5 secondes.

Les résultats montrent que le ratio P-gp / Na,K-ATPase diminue et donc que l'expression de la P-gp dans les cellules MDCK-MDR1 diminue avec l'augmentation du nombre de passages (Figure 18). Ce phénomène avait été au préalable démontré par Tang *et al* [85]. Aucune bande correspondante à la P-gp n'a été observée dans les cellules MDCK-WT avec le temps d'exposition effectué. Afin d'obtenir des meilleurs rendements dans l'extraction de la protéine membranaire, les cellules à faibles passages (inférieurs à 8) seront utilisées dans la suite du projet.

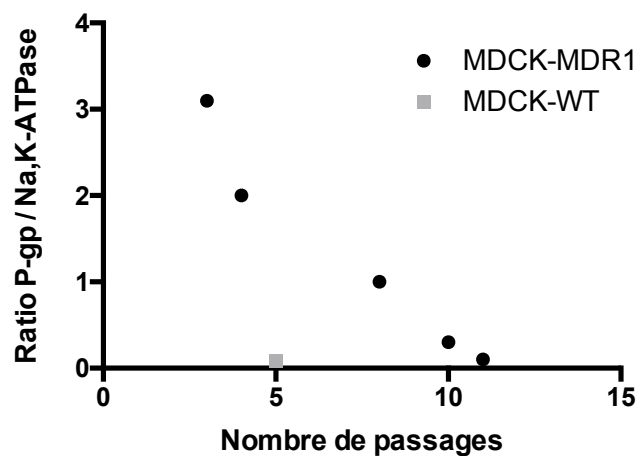


Figure 18. Expression de la P-gp en fonction du nombre de passages des cellules MDCK

3.4.2. Analyse des échantillons par gel SDS-Page et western blot

Les échantillons à analyser par SDS-Page ou western blot n'ont pas été au préalable chauffés à 95°C puisqu'il a été constaté que le chauffage à haute température réduisait le signal de la P-gp et ralentissait la migration de celle-ci (Figure 19). En effet, les protéines membranaires ont tendance à s'agréger à forte température. À la place, les échantillons sont chauffés à 37°C pendant 20-30 minutes [86].

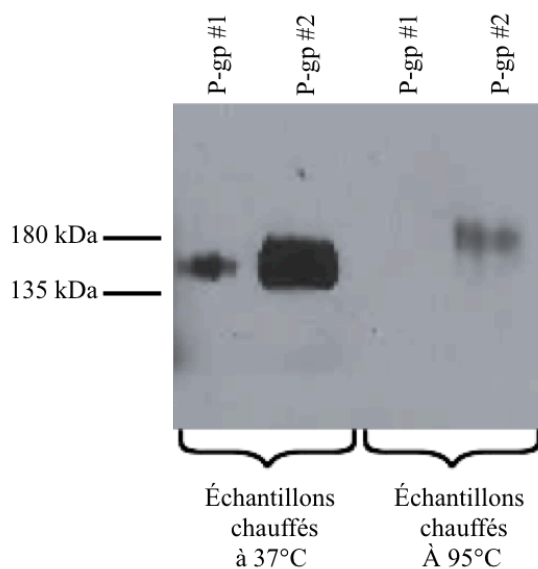


Figure 19. Effet du chauffage sur la P-gp.

3.4.3. Extraction et purification de la P-gp

La méthode d'extraction des membranes des cellules MDCK-MDR1 est une combinaison de différentes centrifugations et centrifugation sur un coussin de sucrose (Figure 20). À cause de leurs compositions en lipides et en protéines membranaires, les membranes possèdent des densités différentes qui leur permettent d'être facilement séparées des autres organelles. Cette étape permet d'éliminer les protéines solubles, la majorité des mitochondries et les noyaux. La P-gp étant intégrée dans les membranes récoltées, il est nécessaire d'utiliser un détergent afin de solubiliser la protéine membranaire dans un milieu aqueux. Le détergent CHAPS est utilisé dans l'étape de solubilisation puisqu'il a la caractéristique d'être non dénaturant, c'est-à-dire qu'il a la capacité de solubiliser les protéines membranaires sans les

inactiver. De plus, ce détergent possède une concentration critique micellaire élevée, faisant de lui un composé de choix pour la future étape de reconstitution en protéoliposomes.

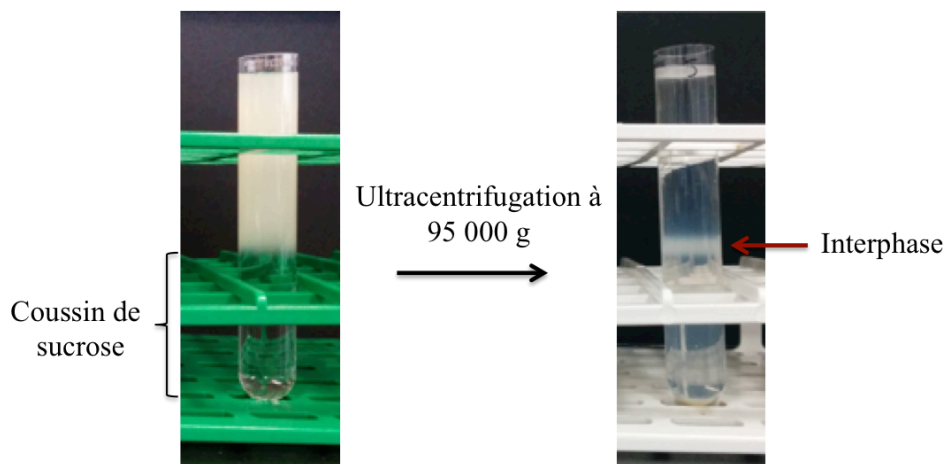


Figure 20. Étape d'ultracentrifugation sur coussin de sucrose pour l'extraction des membranes des MDCK-MDR1

Afin de purifier la P-gp, différentes solubilisations à différents ratios détergent-protéine ont été effectuées. La première solubilisation à un faible ratio détergent:protéine (w:w) de 1,5:1 permet dénaturer les membranes et de former des complexes micellaires larges composés de protéines membranaires, de détergent et de lipides [87]. L'ultracentrifugation permet de récolter les complexes micellaires dans le culot et d'éliminer les protéines solubles. Le premier culot obtenu est représenté dans la Figure 21. Lors de la deuxième solubilisation, le ratio est augmenté à 10 :1 (w :w) permettant de former des complexes micellaires composés de protéines membranaires et de détergent (Figure 22) [88]. L'ultracentrifugation qui suit permet de récupérer les protéines membranaires dans le surnageant et d'éliminer dans le culot les impuretés.



Figure 21. Photo du culot après la deuxième ultracentrifugation à 164 000 g

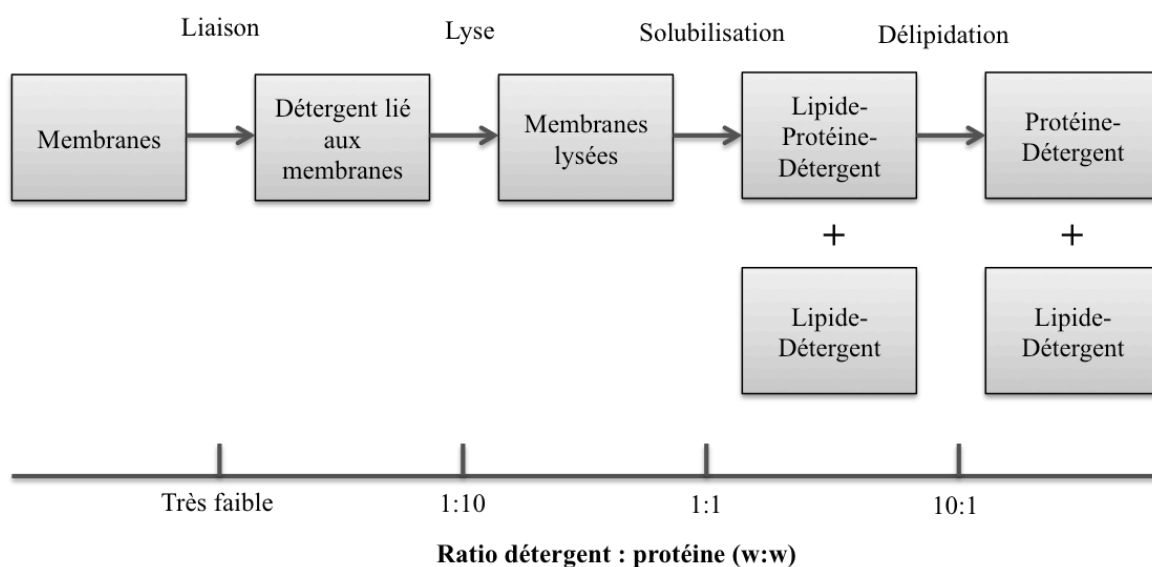


Figure 22. Représentation schématique de la solubilisation progressive des protéines membranaires en fonction du ratio détergent : protéine. Adapté avec permission de [88]

Plusieurs échantillons sont prélevés au cours de l'extraction et de la purification de la P-gp afin de confirmer la présence du transporteur membranaire. La P-gp n'étant pas majoritaire dans les échantillons prélevés, il est impossible d'affirmer la présence de la protéine après analyse par gel SDS-Page (Figure 23 A). Il est donc nécessaire d'analyser les échantillons par western blot, une méthode plus sensible et plus spécifique que l'analyse sur gel de polyacrylamide. Le western blot confirme que les échantillons comportent le transporteur d'intérêt dans les membranes et dans l'échantillon final de la P-gp purifiée (Figure 23 B). La P-gp n'est pas distinguable dans l'échantillon de l'interphase; soit parce qu'elle est présente en quantité infime, soit que la protéine s'est dégradée, soit que le temps d'exposition du western blot est trop faible.

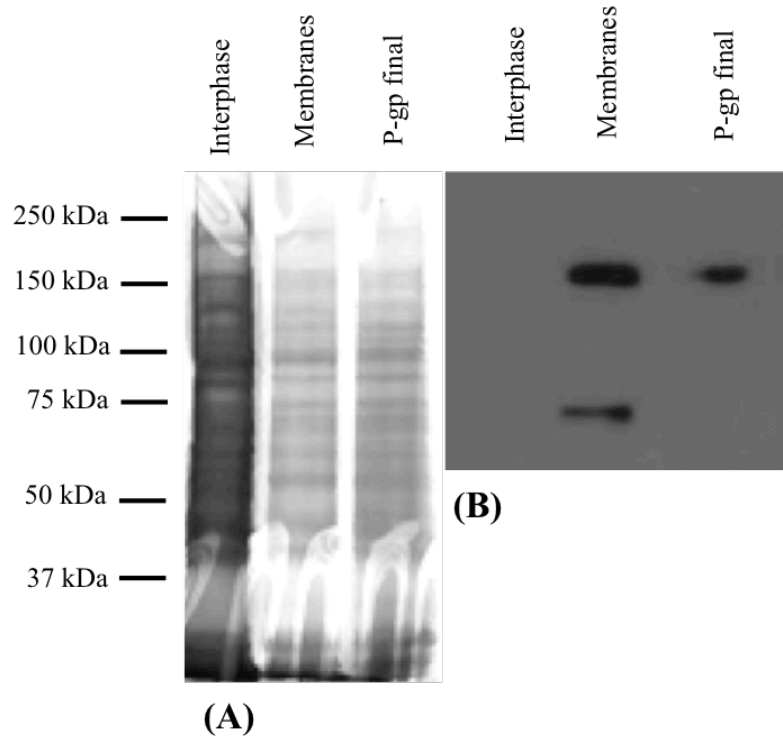


Figure 23. Gel SDS-Page (A) et western blot (B) des échantillons de l'extraction de la P-gp. Gel SDS-Page 7.5% coloré au bleu de Coomassie avec 5,6 μ g de protéines totales dans chaque puits. Anticorps C219. 2,2 μ g de protéines totales par puits pour le western blot.

L'étape de purification par solubilisations ne semble pas être efficace. En effet, le gel SDS-Page prouve la présence d'autres protéines dans le matériel final. Beaucoup de P-gp se retrouve dans le culot de la dernière ultracentrifugation au lieu de se retrouver dans le surnageant (données non présentées). Cela signifie que le ratio détergent:protéine utilisé n'est pas adéquate puisque toute la P-gp ne s'est pas solubilisée. Il faudrait, faire varier les concentrations en protéines et en détergent afin d'améliorer la purification. Le protocole d'extraction et de purification de la P-gp est donc à optimiser.

3.4.4. Activité ATPasique de la P-gp

Le test d'activité ATPasique de la P-gp partiellement purifiée montre que l'échantillon a une activité basale ATPasique élevée (110 nmol Pi/min/mg de protéines) (Figure 24). Cela est cohérent avec ce qui a déjà été observé avec les membranes plasmiques des cellules issues d'ovaires de hamster de Chine (CR1R12 [84], CH^RC5 [76] et CH^RB30 [89]). En présence

d'orthovanadate, il n'y a pas de différence significative observée. En présence de substrats de la P-gp comme la colchicine ou le lopéramide, l'activité est diminuée contrairement à ce qui était attendu. Les substrats jouent ici un rôle d'inhibiteur. Étant donné la grande variabilité obtenue avec le vérapamil, il n'est pas possible de conclure avec ce composé.

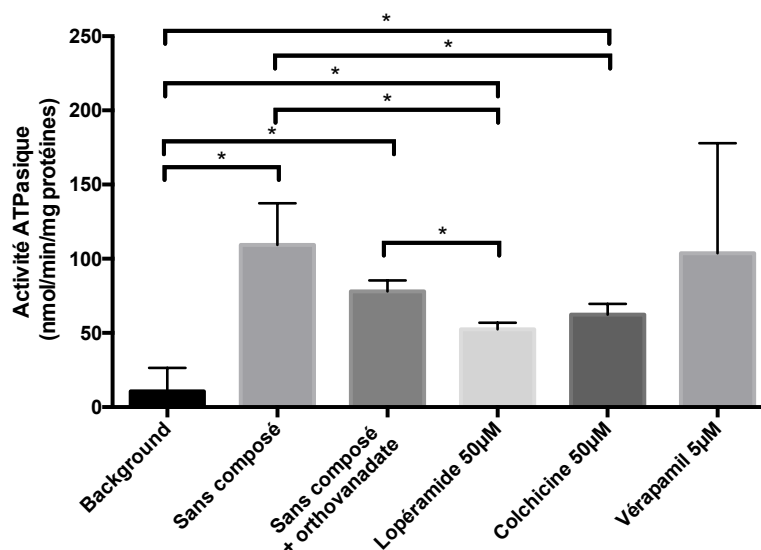


Figure 24. Activité ATPasique spécifique de la P-gp partiellement purifiée des MDCK-MDR1. * $p < 0,05$: différence significative entre les activités ATPasiques

Plusieurs hypothèses peuvent être émises suite à ces résultats : la première, qui semble être la plus probable, postule que la P-gp obtenue a été désactivée au cours des étapes de purification. L'activité ATPasique mesurée pourrait ne pas être liée à la P-gp mais à un autre transporteur ou une enzyme présents dans les membranes. L'activité ATPasique de la P-gp étant fortement dépendante du type de détergent utilisé pour la solubilisation et de l'environnement lipidique [90, 91], il est possible que le protocole utilisé pour la purification de la P-gp humaine à partir des cellules MDCK-MDR1 ne soit pas adéquate et/ou une reconstitution dans des protéoliposomes soit indispensable. D'autres articles mentionnent également que la P-gp voit son activité augmenter en présence de cholestérol [92, 93]. Or, ce lipide n'a pas été ajouté dans les tests d'activité ATPasique.

3.5. Conclusion

Le protocole mis en place pour l'extraction et la purification de la P-gp humaine des cellules MDCK-MDR1 est encore à optimiser. Cette méthode ne permet malheureusement d'obtenir que des centaines de microgrammes de protéines totales (environ 400 µg) à partir de milliards de cellules. En conséquence, il est nécessaire de reproduire régulièrement cette expérience qui est longue et coûteuse pour obtenir assez de matériel avec lequel travailler. De plus, cette méthode fastidieuse ne permet d'avoir que de la P-gp partiellement purifiée. Ainsi, la P-gp n'est pas prédominante dans l'échantillon final recueilli. Même si ce système d'expression produit une P-gp avec des modifications post-traductionnelles similaires à celles du transporteur humain, il présente l'inconvénient de ne pas produire des quantités suffisantes de protéines pour élaborer et optimiser le futur test de perméabilité. En outre, l'activité ATPasique de l'échantillon final n'est pas stimulée en présence de substrats de la P-gp. Pour ces raisons, l'élaboration et l'optimisation du futur test de perméabilité s'avèrent compliquées avec la P-gp provenant des cellules MDCK-MDR1.

Il a été décidé d'abandonner cette voie pour se pencher sur une autre technique d'extraction de la P-gp humaine basée sur un autre système d'expression : la levure *P. pastoris*. Cette levure est largement utilisée pour générer des protéines recombinantes. Plus de 200 protéines ont déjà été exprimées dans les *P. pastoris*. L'utilisation de cette levure permettrait d'obtenir davantage de protéine P-gp purifiée [94].

CHAPITRE 4 : Production, extraction et purification de la P-gp à partir de *P. pastoris*

4.1. Introduction

Les levures *P. pastoris* sont couramment utilisées pour produire des protéines recombinantes puisque ce système d'expression présente de nombreux avantages tels que la facilité d'utilisation, la rapidité de croissance et le faible coût des milieux et du matériel nécessaires à la culture. En outre, *P. pastoris* est connue pour sa capacité à produire des N-glycosylations sur les protéines [95-97].

P. pastoris est une levure méthylotrophe, c'est-à-dire qu'elle est capable d'utiliser le méthanol comme seule source de carbone [98]. La production de protéines par *P. pastoris* se divise en deux étapes. Les cellules sont dans un premier temps cultivées dans un milieu contenant du glycérol afin d'obtenir une bonne densité cellulaire. Puis, l'induction de la protéine s'effectue par l'ajout de méthanol au milieu de culture [99]. Pour métaboliser le méthanol, la levure utilise l'enzyme spécifique : l'oxydase d'alcool (AOX) qui se trouve dans les péroxysomes (Figure 25). Le méthanol est oxydé pour former du formaldéhyde qui sera par la suite soit utilisé pour fabriquer des constituants cellulaires à l'aide d'une autre enzyme : DAS (dihydroxyacétone synthase); soit oxydé en CO₂ à l'aide des enzymes formaldéhyde deshydrogenase (FALDH) et formate deshydrogenase (FDH) permettant le stockage de l'énergie dans la cellule [100-102].

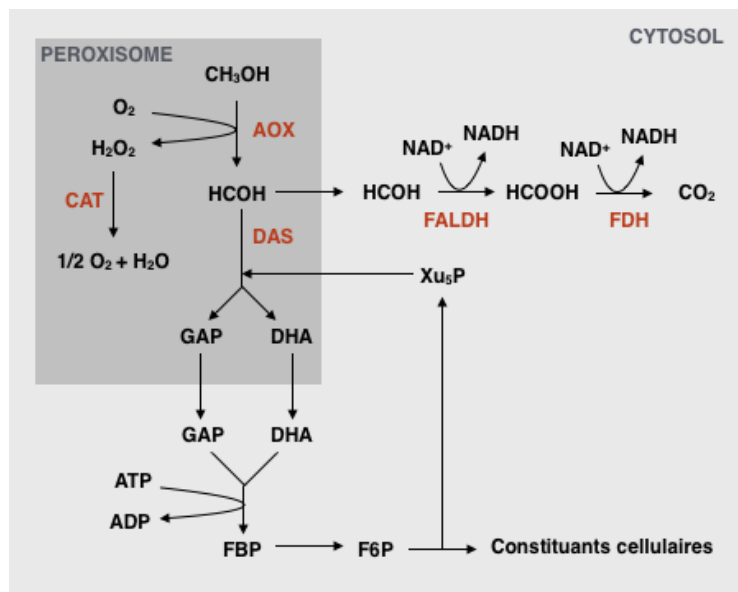


Figure 25. Voie métabolique de la dégradation du méthanol dans *P. pastoris* [100, 102, 103].

4.2. Matériels

La souche GS115-MDR1 a été gracieusement donnée par Ina Urbatsch [104]. La souche GS115 a été transformée avec le vecteur d'expression contenant le gène humain MDR1 sous le promoteur fort *AOX1*, qui code pour l'oxydase d'alcool responsable de l'utilisation du méthanol [80, 104]. Cette souche exprime la P-gp avec une étiquette à l'extrémité C-terminale de la protéine.

Le Tableau 14 récapitule tous les produits utilisés dans ce chapitre ainsi que leurs numéros de référence et leurs fournisseurs.

Produit	Numéro de produit	Fournisseur
Acide 6-aminohexanoïque	7260	Sigma Aldrich
Biotine	B4501	Sigma Aldrich
Bradford réactif	B6916	Sigma Aldrich
Chymostatine	C7268	Sigma Aldrich
DM	D5172	Sigma Aldrich
DTT	D0632	Sigma Aldrich
EDTA	BP120-1	Fisher Scientifique
EGTA	E8145	Sigma Aldrich

Glycérol	G5516	Sigma Aldrich
Imidazole	I5513	Sigma Aldrich
Leupeptine	L9783	Sigma Aldrich
Ni-NTA Agarose	30210	Qiagen
Pefabloc	11585916001	Sigma Aldrich
Pepstatine A	P5318	Sigma Aldrich
Sucrose	SU164-500	Galenova
Tris-HCl	T5941	Sigma Aldrich
YNB	233520	VWR
Stain Free solutions (kit pour les gels)	1610183	BioRad
Centrifugeuse	Sorvall™ Legend RT Refrigerated	Fisher scientifique
Incubateur avec agitation	G25 Shaker incubator	New Brunswick
Spectrophotomètre	Ultropsec™ 2100 pro	GE Healthcare
Trans-Blot® Turbo Transfer System	1704155	BioRad
ChemiDoc™ MP System	1708280	BioRad

Tableau 14. Liste des produits utilisés dans le chapitre 4

4.3. Méthodes

4.3.1. Composition des milieux de culture et tampons

Les milieux de culture ont un rôle primordial dans la croissance cellulaire, ils sont composés de sources de carbone, d'azote de sels et de vitamines nécessaires au bon développement des cellules. Tous les milieux utilisés lors de la culture cellulaire sont préparés de manière stérile et toutes les manipulations sont faites sous une hotte stérile pour éviter tout risque de contamination [105]. La composition des milieux de culture et des tampons est représentée dans le Tableau 15.

Nom du milieu / tampon	Composition des milieux / tampons
MGY (Milieu Minimal de Glycérol)	1.34% YNB (Yeast Nitrogen Base), 1% glycérol et 4.10^{-5} % de biotine
MM (Methanol Medium)	1.34% YNB, 0.5% v/v de méthanol et 4.10^{-5} % de biotine
Tampon d'homogénéisation	0,33 M sucrose, 300 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT et 100 mM d'acide 6-aminohexanoïque, à pH 7,4
Tampon A	50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 30% v/v glycerol, 10 mM imidazole, 2 µg/mL de pepstatine A et de leupeptine, 0,5 µg/mL de chymostatine et 1 mM de Pefabloc, à pH 8,0
Tampon B	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glycérol, 2 µg/mL de pepstatine A et de leupeptine, 0,5 µg/mL de chymostatine et 1 mM de Pefabloc, à pH 7,4
Tampon C	10 mM Tris-HC, 0,1 mM EDTA, à pH 7,4

Tableau 15. Composition des milieux et des tampons pour la production et l'extraction de la P-gp à partir de *P. pastoris*

Le milieu MGY (Milieu Minimal de Glycérol) est constitué de YNB qui contient tous les sels inorganiques et les vitamines nécessaires à la culture des levures. La biotine est une vitamine essentielle pour la croissance cellulaire, elle joue un rôle de coenzyme pour les enzymes carboxylases. Le glycérol joue le rôle de source de carbone. Dans le milieu MM, le glycérol est remplacé par le méthanol comme source de carbone. Le Tris-HCl est utilisé comme pouvoir tampon, le sucrose permet de stabiliser les interactions protéines-protéines. Le glycérol a un également un rôle de stabilisation. Les tampons contiennent de nombreux inhibiteurs de protéases pour éviter la dégradation des protéines. L'EDTA permet d'inhiber les métalloprotéases, la pepstatine A inhibe les protéases aspartiques, la leupeptine inhibe les sérine et cystéine protéases, la chymostatine inhibe les sérines protéases avec une spécificité de type chymotrypsine.

4.3.2. Culture cellulaire

Les cellules de *P. pastoris* GS115 transformée avec le gène humain MDR1 sont décongelées et striées sur une plaque d'agarose de MGY. Après deux jours de croissance à 30°C, une colonie isolée est inoculée dans 10 mL de milieu liquide MGY et incubée à 30°C sous agitation (250-300 rpm) jusqu'à obtenir une densité optique au spectrophotomètre de 2,0 à 600 nm (DO_{600nm}) pendant environ 18h. Puis, ces 10 mL de culture sont inoculés dans 600 mL de milieu MGY dans un erlenmeyer de deux litres couvert avec trois couches de gaze et incubés à 30°C sous agitation pendant 24h. Dans ce milieu de culture, le glycérol, comme seule source de carbone, est en excès et permet une production rapide de biomasse.

Les cellules sont par la suite centrifugées à 2500 g pendant dix minutes à 23°C et resuspendues à une DO_{600nm} de 2,0 dans 600 mL de milieu MM. Le volume de la culture à centrifuger (V_i) est calculé à partir de la densité optique et du volume final de milieu de culture (Équation 11). La suspension est transvasée dans un nouvel erlenmeyer stérile couvert avec trois couches de gaze et est incubée pendant 72h dans les mêmes conditions que précédemment avec ajout de méthanol (0.5% v/v) à 24h et 48h. Lors de l'induction, la croissance cellulaire est suivie par densité optique. Des échantillons sont prélevés à différents instants et l'absorbance à 600 nm est déterminée. Les cultures cellulaires ont dans un premier temps été effectuées dans des erlenmeyers de deux litres classiques. Des erlenmeyers avec baffles de deux litres ont été par la suite utilisées pour évaluer l'influence de l'aération sur la croissance des cellules et sur l'expression de la P-gp. Après 72h, les cellules sont enfin centrifugées à 2500 g pendant dix minutes à 23°C et resuspendues dans le tampon d'homogénéisation à une concentration de 0,5 g de cellules/mL (environ 15 mL) [94].

Équation 11. Calcul du volume de culture à centrifuger pour la resuspension dans le milieu MM

$$V_i = \frac{DO_{f600nm} \times V_f}{DO_{i600nm}}$$

Avec DO_{f600nm} : densité optique à 600nm de la culture finale soit $DO_{f600nm} = 2$

DO_{i600nm} : densité optique à 600nm de la culture initiale

V_f : Volume final de la culture soit $V_f = 600\text{mL}$

4.3.3. Analyse de la croissance de *P. pastoris*

Le suivi de la croissance de la culture de *P. pastoris* est effectué en mesurant la densité optique à 600 nm au cours du temps à l'aide d'un spectrophotomètre. La densité optique ou l'absorbance est proportionnelle à la densité cellulaire. Si besoin, l'échantillon est dilué dans de l'eau purifiée pour respecter la zone de linéarité de l'appareil. L'analyse de l'évolution de la DO_{600nm} en fonction du temps permet d'évaluer les différentes phases de croissance de la souche GS115-MDR1. L'utilisation d'une échelle logarithmique permet de déterminer la vitesse spécifique de croissance (μ). Celle-ci est maximale (μ_{max}) et constante pendant la phase exponentielle de croissance. Il est possible de calculer le temps de génération qui correspond au temps nécessaire pour qu'une population double sa taille à partir de μ_{max} qui se détermine graphiquement (Équation 12).

Équation 12. Calcul du temps de génération

$$Tg = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}}$$

avec Tg : temps de génération (heure)

μ_{max} : vitesse spécifique maximale de croissance ($heure^{-1}$)

4.3.4. Vérification de l'expression de la P-gp

Pour vérifier l'expression de la P-gp dans les cellules, différents échantillons (10 mL de culture) sont prélevés à 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h, 48h et 72h après induction. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1250 g pendant dix minutes à température ambiante puis resuspendues dans 5 mL de tampon d'homogénéisation et congelées à $-80^{\circ}C$. Afin d'analyser rapidement les échantillons sur gel SDS-Page et western blot, une préparation de membranes simplifiée est réalisée [80]. Pour cela, les cellules sont centrifugées après décongélation pendant une dizaine de secondes dans une microcentrifugeuse et resuspendues dans 350 μL de tampon d'homogénéisation auquel des inhibiteurs de protéases sont ajoutées. Puis, 150 μL de billes de verre de diamètre 425 μm – 600 μm (acid-washed) sont ajoutés. Chaque échantillon est vortexé à la vitesse maximale pendant une minute et refroidi pendant deux minutes sur glace pour éviter la dégradation des protéines. Ce cycle est répété six fois. Le tout est ensuite

centrifugé à 3500 g pendant cinq minutes à 4°C afin d'éliminer les cellules non lysées et les noyaux. Le surnageant est prélevé et est de nouveau centrifugé à 14 000 g pendant cinq minutes à 4°C afin d'éliminer les mitochondries et les autres organites cellulaires. Le surnageant récolté contient les protéines cytoplasmiques et les vésicules membranaires. Le dosage en protéines dans les surnageants récoltés se fait par la méthode de Bradford. 10 µg de protéines sont appliquées sur le gel SDS-Page.

4.3.5. Lyse cellulaire

Le Freezer Mill 6850 est utilisé pour lyser les cellules. Le principe de cet appareil consiste à déplacer magnétiquement un barreau d'acier d'un bout à l'autre d'un cylindre fermé contenant un échantillon pour broyer les cellules.

La suspension de cellules resuspendues dans le tampon d'homogénéisation est transformée en billes congelées dans de l'azote liquide (Figure 26). Pour ce faire, la suspension est ajoutée goutte à goutte dans une bouteille contenant de l'azote liquide pour former des petites billes congelées qui peuvent être conservées à -80°C avant d'être utilisées dans le Freezer Mill. L'appareil, le cylindre et le barreau d'acier sont refroidis au préalable avec de l'azote liquide. La cuve doit être remplie au moins aux $\frac{3}{4}$ d'azote liquide. Les billes congelées de suspension de cellules sont disposées dans le cylindre en s'assurant de mettre le barreau au centre de l'échantillon et pas contre une paroi du cylindre. Le cylindre est introduit dans l'appareil. Le protocole utilisé pour broyer les levures est similaire à celui établi pour les levures *Saccharomyces cerevisiae*. Il y a quatre cycles d'effectués : deux minutes de refroidissement puis deux minutes de broyage. Le taux représente la fréquence de l'impact et est programmé à 14. Cela signifie qu'il y a 28 impacts par seconde. Le protocole est effectué deux autres fois avec le même échantillon en s'assurant de remplir la cuve du Freezer Mill d'azote liquide entre chaque cycle. Dans le cas du projet, les 15 mL de billes congelées de suspension de cellules sont broyées en même temps dans le cylindre le plus large en polycarbonate.

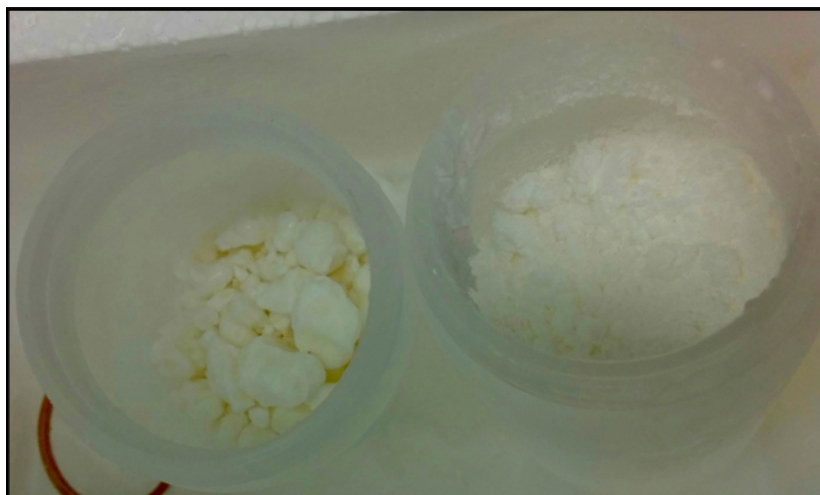


Figure 26. Photos des billes de suspension de cellules congelées avant lyse (à gauche) et après lyse (à droite)

4.3.6. Préparation des membranes

L'homogénat de cellules lysées est décongelé puis centrifugé à 14 000 g pendant 30 min à 4°C pour enlever les cellules non lysées, les noyaux et les fractions mitochondriales. Le surnageant récolté est ensuite centrifugé à 200 000 g pendant 90 min à 4°C. Le culot qui contient les fractions membranaires est resuspendu à l'aide d'un potter elvehjem dans 12 mL et lavé une fois avec le tampon B puis centrifugé de nouveau à 200 000 g pendant 90 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans 4 mL de tampon B comme précédemment, déposé à la surface d'un gradient de sucrose constitué de 16%, 31%, 43% et 53% (w/v) de solutions de sucrose (2 mL de chaque solution) dans le tampon C et centrifugé à 53 000 g pendant 16h à 4°C. Les membranes sont récupérées majoritairement à l'interphase du gradient 43% - 53% et une plus petite fraction a été récupérée à l'interphase 31% - 43%. Les interphases sont diluées dans 12 mL de tampon C puis centrifugées à 200 000 g pendant 3h à 4°C. Le culot qui contient les membranes purifiées est resuspendu dans le tampon A à une concentration entre 2 et 4 mg/mL (4 mL environ) puis congelé à -80°C en plusieurs aliquots.

4.3.7. Solubilisation des membranes

Les membranes sont décongelées et mélangées avec un volume équivalent de tampon A contenant 1,2% w/v n-dodecyl- β -D-maltoside et des inhibiteurs de protéases. La suspension est mélangée plusieurs fois et laissée dans de la glace pendant 10 min.

4.3.8. Purification de la P-gp sur colonne de Nickel

La résine d'agarose Ni²⁺-NTA est au préalable équilibrée avec le tampon A et ajoutée à la suspension de P-gp solubilisée. Le mélange est incubé à 4°C pendant 20h sur un Labquack rotator. La résine est ensuite transférée dans une colonne et lavée avec 25 fois le volume de la colonne de tampon A contenant 0,1% (w/v) de détergent DM puis avec cinq fois le volume de la colonne de tampon A contenant 0,1% (w/v) et 20 mM d'imidazole. L'élution de la P-gp s'effectue avec deux fois le volume de la colonne de tampon A contenant 0,1% (w/v) de DM et 300 mM d'imidazole et une fois le volume de la colonne de tampon A contenant 0,1% (w/v) de DM et 400 mM d'imidazole. La résine est rincée avec 0,5 M de NaOH pendant 30-45 min et conservée dans 30% d'éthanol. Typiquement, des petits volumes d'échantillon (4 mL environ) ont été purifiés à chaque fois avec 1 mL de résine afin d'optimiser la méthode.

4.3.9. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le protocole réalisé est basé sur les recommandations du fabricant, Sigma Aldrich. Le test est effectué dans des plaques 96 puits. La courbe standard est réalisée avec la BSA en utilisant le même tampon de réaction. Un volume de 5 µL de standard ou d'échantillon est utilisé par puits, auquel est ajouté 250 µL de réactif de Bradford à température ambiante. Après dix minutes, la plaque est mesurée trois fois au Sapphire à 595 nm. L'absorbance des échantillons est lue à moins de dix minutes d'intervalle. Les standards et les échantillons sont en triplicata. La courbe standard est tracée à partir de la moyenne des trois mesures effectuées des triplicatas. Les mesures des trois puits d'échantillons sont moyennées et la concentration est déterminée à partir de la régression linéaire tirée de la courbe étalon. Les échantillons sont dilués avec de l'eau au besoin pour satisfaire au tableau de compatibilités du réactif de Bradford.

4.3.10. Analyse des échantillons par la technologie « Stain-free » de Bio-Rad

Principe

La technologie Stain-free est une nouvelle méthode développée par l'entreprise Bio-Rad pour visualiser et quantifier les protéines sur gel SDS-Page et sur membrane. Le principe

de cette méthode se base sur la détection par fluorescence des résidus tryptophane contenus dans les protéines. Ainsi, la formulation du gel comprend un composé trihalogéné qui, lorsqu'il est exposé aux rayons ultraviolets (UV), réagit de manière covalente avec les résidus tryptophane des protéines présents dans le gel les rendant fluorescentes avec une courte photoactivation. De ce fait, les protéines peuvent être facilement détectées par un système d'imagerie après la migration sur gel ou après le transfert sur membrane [106]. Cette méthode élimine les étapes de coloration et de décoloration et n'altère ni la mobilité électrophorétique des protéines, ni le transfert, ni les propriétés d'immunodétection.

Séparation des protéines sur gel

Le gel de séparation est préparé à l'aide de solutions fournies par BioRad. Deux volumes identiques de solution « resolver » A et B sont mélangées avec du TEMED et une solution de 10% APS fraîchement préparée. Le gel de concentration comprend deux volumes identiques de solution « stacker » A et B avec du TEMED et une solution de 10% APS. La polymérisation du gel est rapide et se fait en 30 min. La migration s'effectue sous un courant de 250 V pendant 30-45 min.

Visualisation de la séparation des protéines sur gel

Une fois la migration terminée, le gel est immédiatement visualisé à l'aide de l'imageur ChemiDoc. En sélectionnant l'application « Stain Free Gel », le gel est dans un premier temps activé sous radiations UV pendant une minute puis le logiciel optimise automatiquement le temps d'exposition pour détecter les bandes intenses sur le gel.

Transfert des protéines

Les protéines sont transférées sur des membranes de PVDF ou PVDF Low Fluo à l'aide du Trans-Blot Turbo pendant 10 min à 2,5 A (jusqu'à 25V) pour deux gels ou 1,3 A (jusqu'à 25 V) pour un gel.

Vérification du transfert

Le transfert des protéines est vérifié immédiatement en imageant la membrane avec le ChemiDoc en sélectionnant l'application « Stain Free Blot ». Le gel SDS-Page est aussi imagé

en programmant manuellement le temps d'exposition utilisé pour le même gel avant le transfert des protéines. L'efficacité du transfert est évaluée en comparant l'image prise après le transfert avec l'image prise avant le transfert.

Révélation

Comme précédemment, la membrane est saturée dans une solution de Blotto 5% pendant une heure à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite incubée avec la solution d'anticorps primaire C219 toute une nuit à 4°C. Puis, la membrane est rincée trois fois dans du TBS-T pendant cinq minutes avant d'être incubée avec la solution d'anticorps secondaire pendant une heure sous agitation à température ambiante. La membrane est de nouveau rincée trois fois avec le TBS-T et est révélée à l'aide du système de détection ECL et le ChemiDoc en sélectionnant le protocole « chemi » du logiciel. Le temps d'exposition est optimisé pour chaque membrane.

Normalisation des résultats

La normalisation des résultats se fait avec les protéines totales injectées dans chaque puits. Dans cette méthode, le logiciel détermine la densité de la bande sur la bande chimiluminescente ainsi que la densité totale de chaque ligne sur les membranes et opère les calculs de normalisation selon les équations ci-dessous.

Équation 13. Calculs de normalisation avec la méthode « Stain Free »

$$\text{Facteur de normalisation} = \frac{\text{densité (volume) totale de la ligne de référence}}{\text{densité (volume) totale de chaque ligne}}$$

$$\text{Volume normalisé} = \text{facteur de normalisation} \times \text{volume de la bande}$$

Le logiciel sélectionne la première ligne (qui ne correspond pas à l'échelle de poids moléculaire) comme ligne de référence. Cette méthode permet de comparer l'intensité de la protéine d'intérêt entre les différentes lignes du gel tout en s'affranchissant des variations liées à l'injection des échantillons dans chaque puits.

4.4. Résultats

4.4.1. Culture cellulaire

4.4.1.1. Croissance cellulaire de *P. pastoris*

Une courbe de croissance cellulaire a été tracée pour la souche GS115-MDR1 dans le milieu MGY afin de déterminer les différentes phases de croissance et la densité optique correspondante à la phase stationnaire (Figure 27A). Le maximum de densité optique est atteint après 80h et a une valeur d'environ 9,8. La courbe de croissance en échelle logarithmique permet d'estimer le temps de génération entre 18h et 50h qui est d'environ 5h15 (Figure 27B).

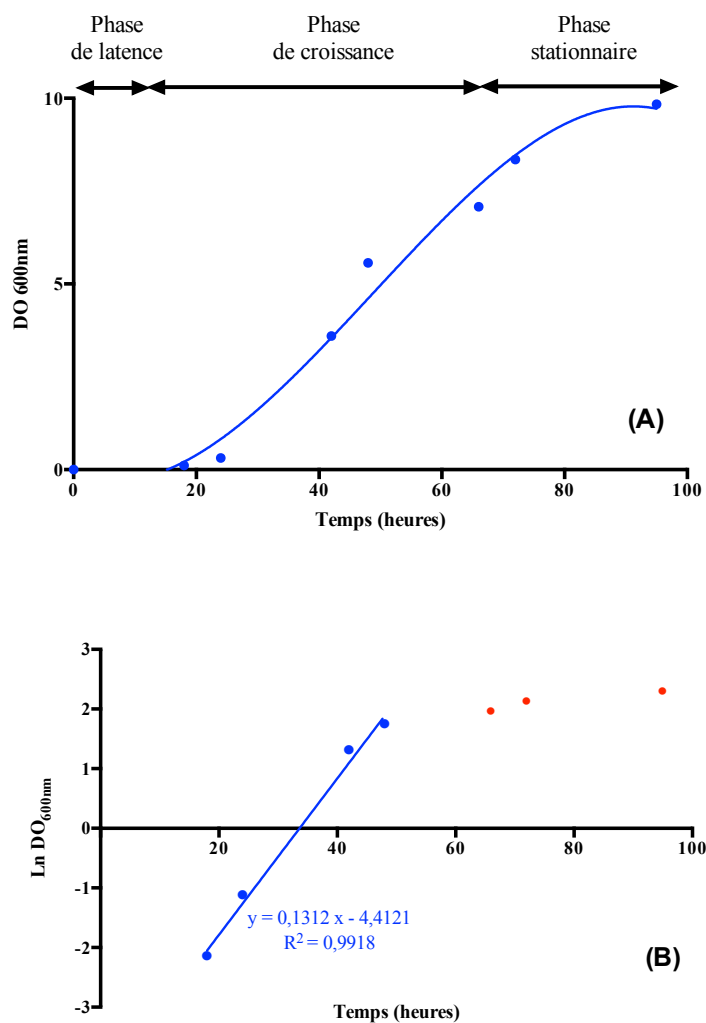


Figure 27. Courbe de croissance cellulaire de la souche GS115-MDR1 dans le milieu MGY (A). Courbe de croissance cellulaire de la souche GS115-MDR1 dans le milieu MGY en échelle logarithmique (B)

4.4.1.1. Induction de la P-gp en présence de méthanol

Les échantillons prélevés à différents intervalles après le début de l'induction au méthanol sont analysés par gel SDS-Page et western blot, après une préparation des membranes simplifiée décrite dans la partie méthodes. Aucune bande correspondante à la P-gp n'est visible avant l'étape d'induction (Figure 28). Après seulement quatre heures d'induction, une légère bande autour de 130 kDa correspondante à la P-gp est visible sur la membrane dans

les deux cultures (erlenmeyer avec baffles et erlenmeyer classique); indiquant la production de la protéine d'intérêt. Des bandes sont également visibles après 24, 48 et 72h d'induction. Des agrégats de P-gp sont obtenus après 24h d'induction.

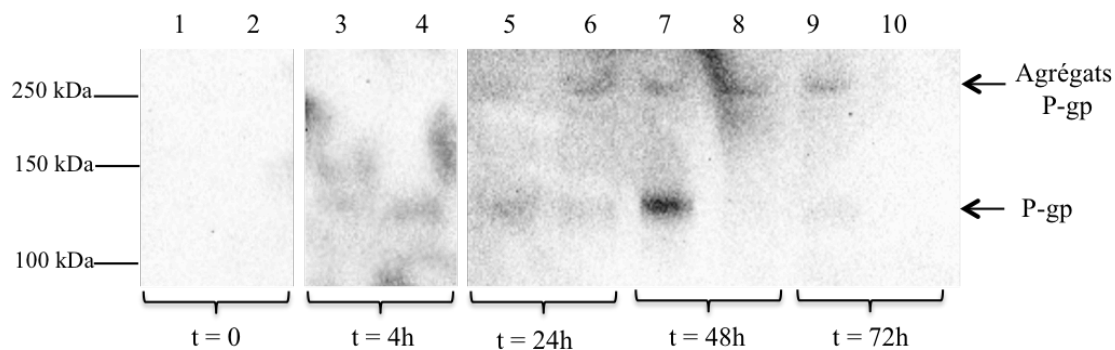


Figure 28. Western blot des échantillons pendant l'étape d'induction. Quantité de protéines par ligne : 10 μ g. Lignes 1, 3, 5, 7 et 9 : Culture dans l'erlenmeyer avec baffles. Lignes 2, 4, 6, 8 et 10 : Culture dans l'erlenmeyer classique. Lignes 1 à 4 : 1^{ère} membrane. Lignes 5 à 10 : 2^e membrane. Temps d'exposition du western blot : 120 secondes.

4.4.1.2. Influence de l'aération sur l'expression de la P-gp

La Figure 29 représente les erlenmeyers, avec baffles et classique, après 72h d'induction au méthanol. Visuellement, on voit que la flasque avec baffles produit plus de mousses que la flasque classique indiquant une meilleure aération.

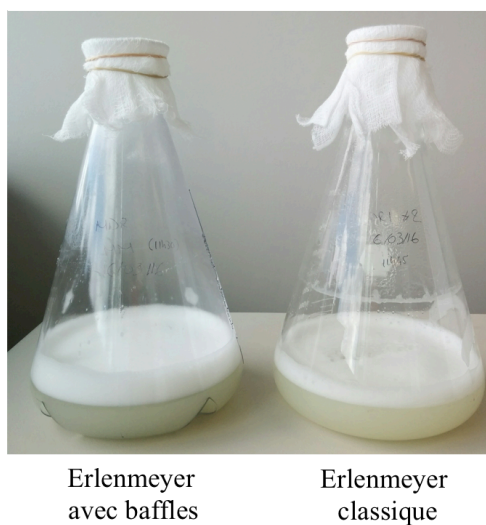


Figure 29. Photo des erlenmeyers après 72h d'induction au méthanol.

Lors de l'induction au méthanol, la croissance cellulaire ne semble pas être affectée par l'aération. Ainsi, les courbes de croissances obtenues (Figure 30A) sont similaires. À 72 heures, les cellules sont toujours dans la phase exponentielle, le plateau n'est pas encore atteint. Les profils de croissance en échelle logarithmique permettent de calculer les temps de génération qui sont d'environ 50h et 43h pour la culture dans l'erenmeyer avec baffles et dans l'erenmeyer classique respectivement (Figure 30B).

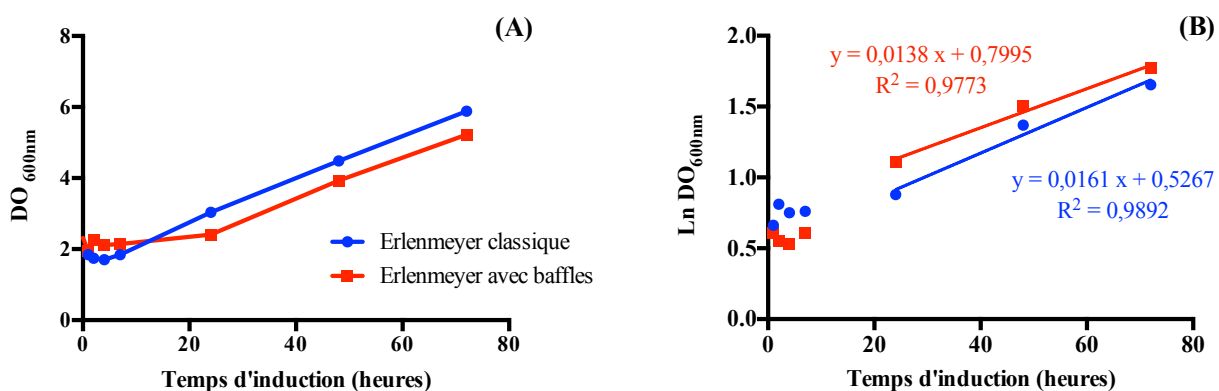


Figure 30. Comparaison des profils de croissance de la souche GS115-MDR1 dans l'erenmeyer classique et avec baffles lors de l'étape d'induction. Évolution de la DO_{600nm} en fonction du temps (A). Évolution des profils de DO en échelle logarithmique (B).

En revanche, l'aération a un effet sur l'expression de la protéine. La Figure 31 présente la normalisation des résultats présentés dans la section 4.4.1.1. par la technologie « Stain Free ». L'expression de la P-gp après 24h d'induction est plus importante dans l'erenmeyer avec baffles que dans l'erenmeyer classique. Les données suivent une courbe de tendance polynomiale d'ordre 3. La proportion de la P-gp par rapport aux protéines totales est plus importante à 48h qu'à 72h. Il semblerait qu'après 48h, il y a moins de protéine recombinante exprimée et de ce fait, il n'est pas nécessaire d'induire pendant trois jours, une induction pendant deux jours semble être suffisant. En induisant plus longtemps, divers contaminants, qui devront être éliminés par la suite, sont ajoutés et peuvent compliquer les étapes de purification.

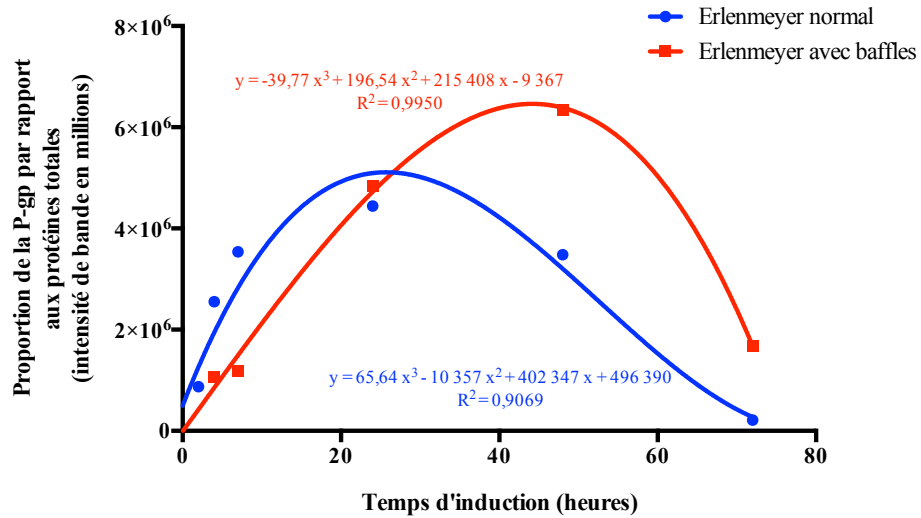


Figure 31. Influence de l'aération sur l'expression de la P-gp.

4.4.2. Lyse cellulaire

La réussite de la lyse cellulaire s'évalue de manière qualitative au microscope (Figure 32). Sur la Figure 32A, on distingue le bourgeonnement des levures qui permet la division des cellules. Sur l'échantillon obtenu après la lyse cellulaire, des débris cellulaires sont observés mais aussi des cellules intactes. On peut estimer qu'environ 80% des cellules ont été lysées avec cette méthode. Afin d'augmenter le rendement, il faudrait décongeler l'homogénat de cellules pour le recongeler en popcorns dans de l'azote liquide puis le broyer une autre fois au freezer mill.

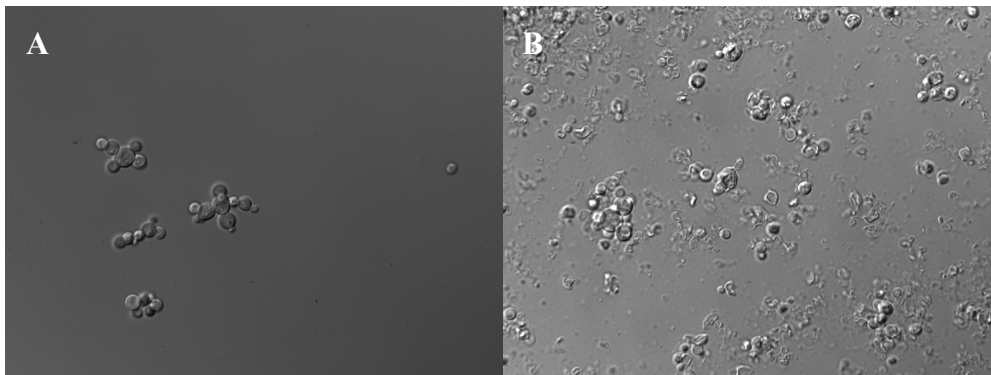


Figure 32. Photo des cellules au microscope (100X). A : Cellules avant la lyse cellulaire. B : Cellules après la lyse cellulaire.

4.4.3. Extraction de la P-gp

La Figure 33 représente l'étape d'ultracentrifugation sur coussin de sucrose. Les membranes ont été récoltées au niveau des interphases 43% - 53% et 31% - 43%.

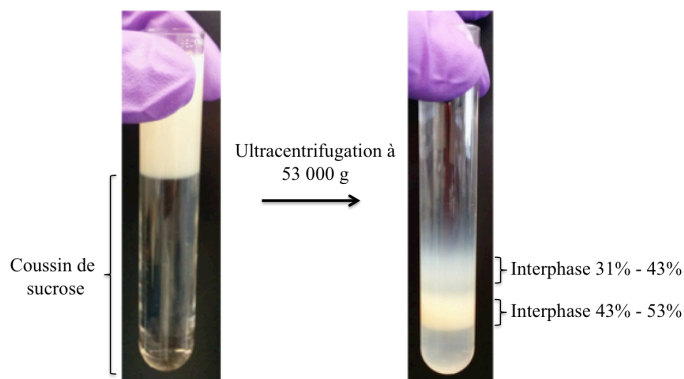


Figure 33. Étape d'ultracentrifugation sur coussin de sucrose

Le stain free gel et le western blot de l'extraction de la P-gp sont présentés sur la Figure 34. Une bande majeure située aux alentours de 130 kDa correspondante à la P-gp, est observée dans tous les échantillons à l'exception des cellules lysées. Pour cet échantillon, l'absence de bande peut s'expliquer par une trop faible exposition de la membrane. Les bandes aux alentours de 20, 30 et 60 kDa sont des produits de protéolyses de la P-gp. La bande présente vers 280 kDa montre que la P-gp s'est agrégée dans l'échantillon. Le graphique représentant l'analyse densitométrique des bandes de la P-gp par rapport aux protéines totales (Figure 35) prouve que les différentes étapes d'extraction des membranes permettent d'éliminer des contaminants notamment après la centrifugation sur coussin de sucrose. Des agrégats de P-gp se retrouvent dans tous les échantillons. Plusieurs hypothèses peuvent être émises sur la présence de doublets sur le western blot. Il peut s'agir d'un produit de dégradation de la P-gp ou bien d'une dénaturation incomplète par le SDS [107]. La protéine produite par *P. pastoris* n'étant pas glycosylée, cela n'est pas dû à une différence de glycosylation. Avec 600mL de culture, environ 8 mg de protéines totales dans les membranes sont obtenus. Le gel SDS-Page confirme que la P-gp ne se trouve pas en majorité dans les membranes. D'autres étapes de purification sont donc nécessaires.

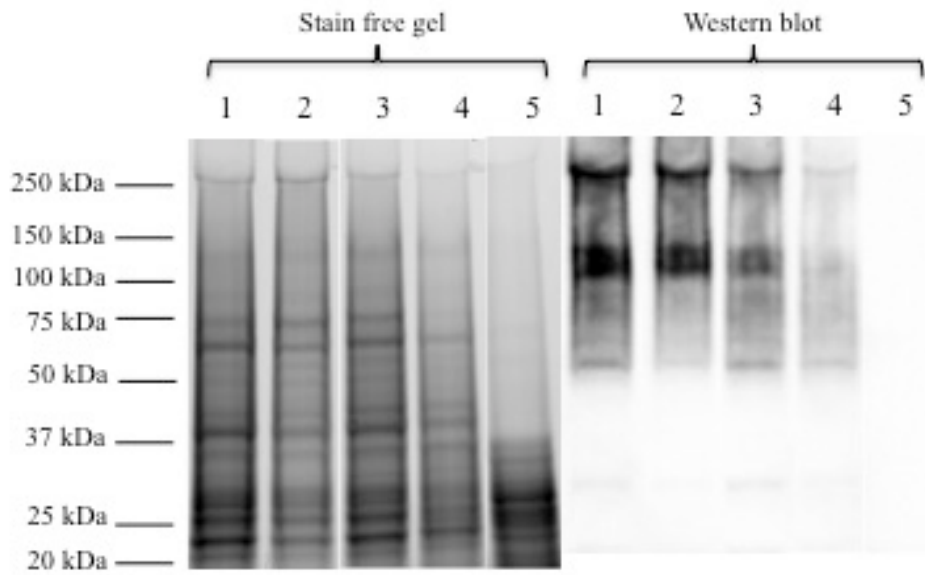


Figure 34. Stain free gel et western blot des échantillons de la préparation de membranes de *P. pastoris*. Quantité de protéines par ligne : 50µg. Ligne 1 : Membranes; Ligne 2 : Interphase; Ligne 3 : 2^e culot resuspendu dans le tampon B; Ligne 4 : 1^{er} culot resuspendu dans le tampon B; Ligne 5 : Cellules lysées. Temps d'exposition du western blot : 5 secondes.

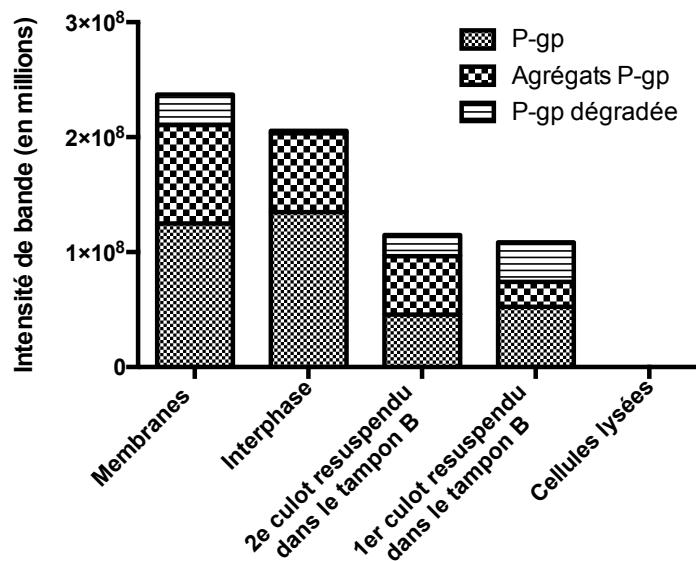


Figure 35. Analyse densitométrique des bandes de la P-gp imagée avec le ChemiDoc MP.

4.4.4. Purification de la P-gp sur colonne de Nickel (par gravité)

A partir d'une culture de 600 mL, environ 640 µg de P-gp purifiée sont obtenues. La Figure 36 montre que la purification sur colonne permet d'éliminer de nombreux contaminants dans le front de solvant et dans les lavages. La P-gp est éluee majoritairement dans la deuxième élution à 300mM d'imidazole. Une petite quantité de P-gp est éluee dans le flowthrough et dans les différents lavages. L'analyse de l'éluat au NaOH (donnée non montrée) montre qu'une partie de la P-gp est restée liée à la résine. En normalisant avec la quantité de protéines totales avec la technologie « Stain Free », nous pouvons estimer que la proportion de la P-gp dans l'échantillon final est 33 fois plus grande que dans les membranes. Cependant, plusieurs bandes sont visibles sur le gel « stain free » dans l'échantillon final indiquant une purification partielle. La méthode de purification pourrait donc être améliorée. Des étapes supplémentaires permettant de purifier davantage la P-gp ont été réalisées mais n'ont pas donné de résultats satisfaisants. L'éluat récolté et dilué trois fois a d'abord été passé sur colonne sephadex G50 mais il n'y avait pas d'amélioration significative donc cette méthode a été abandonnée. L'échantillon a également été passé sur colonne DEAE Sepharose mais cette méthode a engendré trop de pertes significatives de la P-gp et a donc aussi été éliminée. Il a donc été décidé de continuer à travailler avec la P-gp qui reste partiellement purifiée.

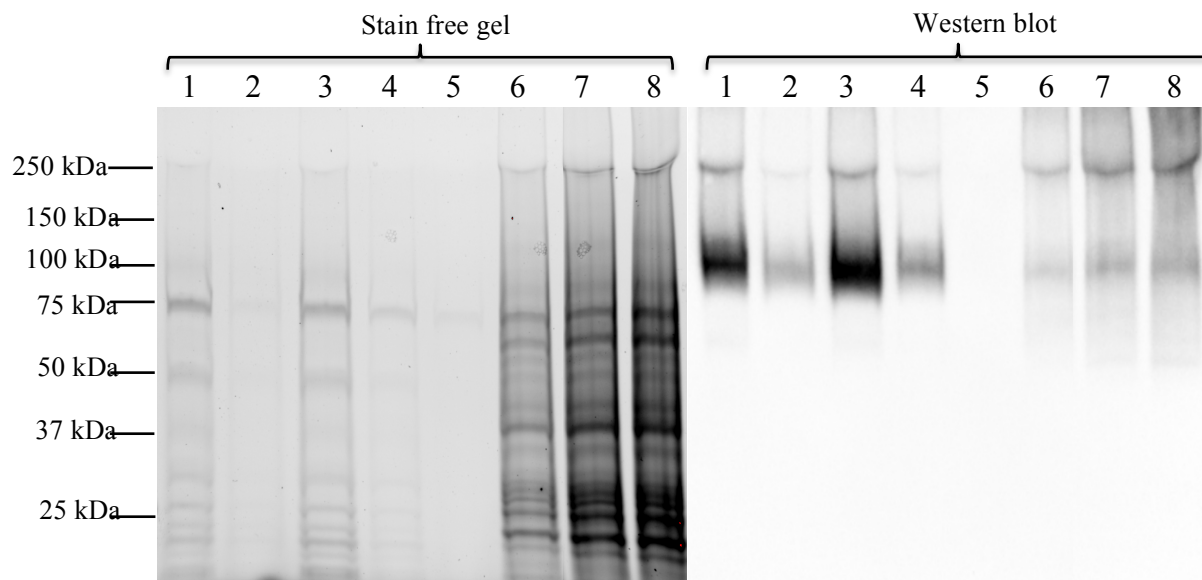


Figure 36. Stain Free Gel et western blot des échantillons de la purification sur colonne de Nickel de la P-gp. 30 μ L d'échantillons ajoutés dans chaque puits. Ligne 1 : P-gp finale. Ligne 2 : 3^e élution à 400mM d'imidazole. Ligne 3 : 2^e élution à 300mM d'imidazole. Ligne 4 : 1^e élution à 300mM d'imidazole. Ligne 5 : Lavage à 20mM. Ligne 6 : 1^{er} lavage de 1mL. Ligne 7 : Front de solvant. Ligne 8 : Membranes solubilisées. Temps d'exposition du western blot : 3 secondes.

4.5. Conclusion

Les résultats montrent que l'aération n'influence que l'induction de la protéine et pas la croissance cellulaire. Pour les futures cultures cellulaires, des erlenmeyers classiques pourraient donc être utilisés pour la période de croissance et des flasques avec baffles pour l'induction. Les analyses montrent également qu'une induction de 48 heures est suffisante pour la souche de levures utilisée.

L'expression de la P-gp dans la culture est faible. Ainsi, la détection de la protéine par Stain free gel ne suffit pas et requiert une méthode plus sensible comme le western blot. D'une part, cela s'explique par le fait que *P. pastoris* n'est pas un système de surexpression à l'inverse d'*E. coli* mais cette levure se distingue par sa capacité à être cultivée à des densités

cellulaires importantes [80]. De plus, la bande obtenue sur le gel est diffuse à cause de la glycosylation de la protéine, ce qui la rend moins visible à l'œil nu.

La faible expression de la P-gp dans la souche de *P. pastoris* reçue a rendu les étapes de purification difficile à optimiser. Plusieurs autres facteurs que le temps d'induction et l'aération devraient être étudiés afin d'augmenter l'expression de la P-gp dans la souche GS115-MDR1. Ainsi, le pH et la température sont des facteurs critiques pour la synthèse et le repliement des protéines. Lors d'une culture prolongée, il y a un risque d'acidification du milieu de culture. En conséquence, les protéases acides, présentes dans *P. pastoris*, deviendraient actives [80]. La diminution de la température de 30°C à 22°C ou 15°C a aussi montré des améliorations dans la production de protéines. Cela s'explique par une réduction de la lyse cellulaire et de l'activité protéolytique pendant l'induction; le rendement est donc amélioré [108, 109]. À faible température, le processus de traduction est aussi ralenti, permettant à la protéine de se replier plus adéquatement.

CHAPITRE 5 : Reconstitution de la P-gp dans des protéoliposomes

5.1. Introduction

Des tests préliminaires ont été effectués pour évaluer les différentes techniques de reconstitution décrites dans le premier chapitre afin de déterminer la facilité et l'efficacité de chaque méthode. Comme il a été montré que l'activité ATPasique de la P-gp était influencée par les lipides qui l'entouraient [90, 91], deux préparations de lipides ont été testées dans chaque méthode de reconstitution afin de comparer et de déterminer la composition de lipides qui permet d'obtenir la plus forte activité. Dans la première préparation, les lipides sont composés de 80% d'egg phosphatidylcholine (PC) et 20% de cholestérol alors que dans la deuxième préparation, les lipides sont des extraits d'*E. coli*.

5.2. Matériels

Le Tableau 16 récapitule tous les produits utilisés dans ce chapitre ainsi que leurs numéros de référence et leurs fournisseurs.

Produit / Appareil	Numéro de produit / Modèle	Fournisseur
Cholestérol lipides	700000	Avanti Polar Lipids
DM	D5172	Sigma Aldrich
DTT	D0632	Sigma Aldrich
E. coli lipides	100600C	Avanti Polar Lipids
EGTA	E8145	Sigma Aldrich
KCl	P9541	Sigma Aldrich
MgCl ₂	M8266	Sigma Aldrich
OG	O8001	Sigma Aldrich
PC lipides	840051	Avanti Polar Lipids
Tris-HCl	T5941	Sigma Aldrich
Pur-A-Lyzer Maxi Dialyse kit	PURX12015	Sigma Aldrich
Spectrophotomètre	Microplate reader SAFIRE	Tecan
Appareil à sonication	Sonic Dismembrator Model 500	Fisher Scientific
Extrudeur	LiposoFast	Avestin

Tableau 16. Liste des produits et appareils utilisés dans le chapitre 5

5.3. Méthodes

5.3.1. Tampons

Les compositions des différents tampons mentionnés dans ce chapitre sont indiquées dans le Tableau 17.

Tampon	Composition
Tampon de transport	50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 mM EGTA, 8 mM DTT
Tampon de reconstitution	50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 mM EGTA, 8 mM DTT et 1 % (w/w) de détergent (DM ou OG)
Tampon d'équilibration	100 mM KCL, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 0,02% NaN ₃ , pH 7,4

Tableau 17. Composition des tampons utilisés dans le chapitre 5

5.3.2. Reconstitution en protéoliposomes par sonication

Les solutions stocks de lipides PC et cholestérol, à une concentration de 10 mg/mL, sont mélangés pour avoir un ratio PC:cholestérol de 80:20. Le chloroforme est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif. Le film lipidique est resuspendu dans le tampon de transport. La P-gp purifiée est ensuite ajoutée la mixture pour avoir un ratio lipides:protéines de 50:1. Le mélange est homogénéisé par sonication pendant cinq secondes à l'aide d'une sonde à une amplitude de 60% puis refroidi sur glace pendant une minute. La sonication suivie d'un refroidissement sont effectués pour un total de six cycles. La méthode est identique avec les lipides d'*E. coli*.

5.3.3. Formation de micelles « lipide-protéine-détergent »

Les solutions stocks de lipides PC et cholestérol, à une concentration de 10 mg/mL, sont mélangés pour avoir un ratio PC:cholestérol de 80 :20. Le chloroforme est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif. Le film lipidique est resuspendu dans le tampon de reconstitution. Deux détergents ont été utilisés à ce niveau : le détergent DM et le détergent octyl β -D-glucopyranoside (OG) car celui-ci possède une CMC plus élevée et devrait donc

être plus facile à enlever [47]. La mixture est incubée pendant 30 min à température ambiante afin d'obtenir une solubilisation complète. Une solution claire indique que la solubilisation des lipides est complète. La P-gp purifiée et solubilisée obtenue avec *P. pastoris* est ensuite ajoutée à la solution et la mixture est incubée à 4°C pendant 30 min pour permettre la formation de micelles « lipide-protéine-détergent ». La méthode est identique avec les lipides d'*E. coli*.

5.3.4. Reconstitution en protéoliposomes par filtration sur gel

5.3.4.1. Première méthode

Les solutions stocks de lipides PC et cholestérol, à une concentration de 10 mg/mL, sont mélangés pour avoir un ratio PC:cholestérol de 80:20. Le chloroforme est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif. Le film lipidique est resuspendu dans le tampon de transport. Le mélange est ensuite extrudé à travers un filtre en polycarbonate de diamètre de pores de 400 nm puis 200 nm pour forcer les liposomes à traverser les pores du filtre 21 fois. Cette étape permet d'uniformiser la taille des micelles dans la solution. Les micelles « lipide-protéine-détergent » (préparées avec le détergent DM) sont mélangées sur glace avec la préparation de liposomes pendant 30 min.

La suspension est ensuite passée sur colonne sephadex G50 préalablement équilibrée dans le tampon d'équilibration. La colonne est lavée avec le même tampon. Les fractions turbides sont récoltées et centrifugées à 4000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot contenant les protéoliposomes est resuspendu dans le tampon de transport. Les protéoliposomes formés sont conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

Le pourcentage de protéines reconstituées dans l'échantillon final est calculé comme selon l'Équation 14 :

Équation 14. Calcul du pourcentage de protéines reconstituées dans les protéoliposomes

$$\text{Pourcentage de protéines dans les protéoliposomes} = \frac{1}{1 + \frac{I_{\text{surageant}} V_{\text{surageant}}}{I_{\text{protéoliposomes}} V_{\text{protéoliposomes}}}}$$

$$\text{Pourcentage de protéines dans le surnageant} = \frac{1}{1 + \frac{I_{\text{protéoliposomes}} V_{\text{protéoliposomes}}}{I_{\text{surnageant}} V_{\text{surnageant}}}}$$

Avec $I_{\text{protéoliposomes}}$: Intensité de la bande correspondant à la P-gp en millions des protéoliposomes

$I_{\text{surnageant}}$: Intensité de la bande correspondant à la P-gp en millions du surnageant

$V_{\text{protéoliposomes}}$: Volume total des protéoliposomes

$V_{\text{surnageant}}$: Volume total du surnageant

5.3.4.2. Deuxième méthode

Les micelles « lipide-protéine-détergent » (préparées avec le détergent OG) sont appliquées sur colonne sephadex G50 (1 x 15 cm pour un échantillon de 1mL) préalablement équilibrée dans le tampon de transport. La colonne est lavée avec le même tampon et une dizaine de fractions de 1 mL sont collectées immédiatement. La présence de protéoliposomes dans les fractions est déterminée visuellement (solution turbide). Les fractions contenant les protéoliposomes sont mélangées ensemble et conservées à 4°C.

5.3.5. Reconstitution en protéoliposomes par dialyse

Les micelles « lipide-protéine-détergent » (préparés avec le détergent OG) sont dialysées contre 20 volumes de tampon de transport à l'aide du kit de dialyse « Pur-A-Lyzer » Maxi. La solution est remplacée toutes les 8-12h pour un total de 4 changements. À la suite du premier changement de buffer, la solution doit devenir turbide, indiquant la formation de protéoliposomes.

5.3.6. Mesure de l'activité ATPasique des protéoliposomes

Le test colorimétrique est réalisé selon la méthode décrite dans la partie 3.3.8. à la différence que le tampon de réaction utilisé est différent. Du DTT est ajouté car il a été montré précédemment que l'omission de ce composé engendrait une inactivation complète de l'activité ATPasique de la P-gp [104, 110]. Le facteur d'activation est calculé en divisant la valeur de l'activité obtenue en présence du substrat par la valeur de l'activité obtenue sans composé. En raison des fortes variabilités observées avec le test d'activité ATPasique, celui-ci

a été répliqué 5 fois. La valeur la plus basse et la valeur la plus élevée n'ont pas été pris en compte dans la moyenne de l'activité.

Le test-t de Student bilatéral est utilisé pour comparer les activités ATPasiques obtenues. Une valeur de p inférieure à 0,05 indique une différence significative.

5.4. Résultats

Afin de comparer les différentes techniques entre elles, la P-gp venant d'une même purification a été utilisée.

5.4.1. Reconstitution en protéoliposomes par la méthode de sonication

La reconstitution par la méthode de sonication engendre une dégradation de la P-gp. En effet, une bande aux alentours de 60 kDa est apparue sur le western blot. Que ce soit en présence de lipides PC/Chol ou de lipides d'*E. coli*, les résultats sont similaires. Cette dégradation est certainement due à la création de chaleur à la suite de la sonication. Les données ne nous permettent pas de confirmer la bonne reconstitution du transporteur membranaire dans les liposomes.

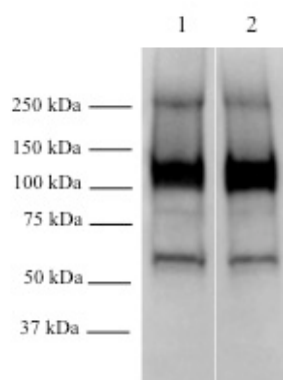


Figure 37. Western blot de la P-gp reconstituée en protéoliposomes par la méthode de sonication. 30 μ L d'échantillon par puits. Ligne 1 : Lipides PC/Chol. Ligne 2 : Lipides *E. coli*. Temps d'exposition : 7 secondes.

5.4.2. Reconstitution en protéoliposomes par la méthode de dialyse

L'échantillon obtenu après la méthode de dialyse présente des agrégats selon l'analyse au DLS (Dynamic Light Scattering). Aucune dégradation de la P-gp n'est visible sur le western blot (Figure 38). La bande correspondant à la P-gp est plus nette et n'apparaît plus comme une « patate ». Les résultats obtenus avec les lipides PC/Chol et les lipides d'*E. coli* sont similaires.

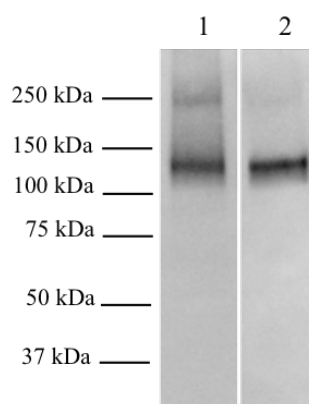


Figure 38. Western blot de la P-gp reconstituée en protéoliposomes par la méthode de dialyse. 30 μ L d'échantillon par puits. Ligne 1 : Lipides PC/Chol. Ligne 2 : Lipides *E. coli*. Temps d'exposition : 7 secondes.

5.4.3. Reconstitution en protéoliposomes par la méthode de filtration

Par la méthode de filtration, la cinquième fraction éluée (environ 1 mL) qui était une solution turbide a été récoltée et centrifugée. Le culot obtenu qui contient les protéoliposomes a été resuspendu dans 500 μ L de tampon de transport puis analysé par western blot selon la même méthode décrite précédemment. Le surnageant récupéré a aussi été analysé. Le western blot montre qu'une partie de la P-gp s'est bien reconstituée dans des protéoliposomes PC/Chol mais le surnageant de la dernière centrifugation contient également de la P-gp (Figure 39). La P-gp purifiée ne s'est donc pas totalement reconstituée dans des protéoliposomes par la méthode de filtration. L'analyse du western blot par la méthode « stain free » nous permet d'avoir une estimation de la quantité de P-gp reconstituée. Seulement 12% de la P-gp totale appliquée dans la colonne se retrouve incorporée dans les liposomes (Tableau 18).

Un doublet est visible sur le western blot de l'échantillon des protéoliposomes indiquant une possible dégradation de la protéine. Le mélange obtenu étant trop polydisperse, il n'a pas été possible de faire des analyses par DLS. Les protéoliposomes formés avec les lipides d'*E. coli* n'ont pas été analysés par manque de matériel.

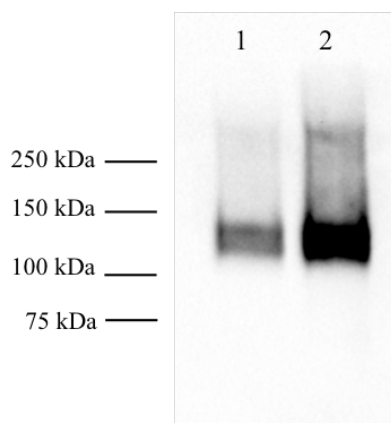


Figure 39. Analyse par western blot des protéoliposomes formés par filtration sur gel avec les lipides PC/cholestérol. Ligne 1: 30µL de protéoliposomes; Ligne 2: 30µL de surnageant

Échantillon	Intensité de la bande de la P-gp (en millions)	Volume dans le puits du gel (en µL)	Volume total de l'échantillon (en µL)	Pourcentage de protéines dans l'échantillon (%)
Protéoliposomes	8,50	30	500	12,90
Surnageant	28,70	30	1000	87,10

Tableau 18. Pourcentage de P-gp reconstituée dans des protéoliposomes

5.4.4. Activité ATPasique des protéoliposomes

De nombreux tests ont été effectués mais aucune stimulation de l'activité ATPasique n'a pu être observée pour les échantillons obtenus après dialyse, sonication et filtration sur gel (première et deuxième méthode) que ce soit en présence de lipides d'extraits d'*E. coli* ou de mélange de lipides PC/Chol.

En revanche, une stimulation de l'activité a pu être observée avec les protéoliposomes formés par filtration sur gel (Figure 40) à partir de la P-gp, purifiée d'une autre culture cellulaire, reconstituée en utilisant la première méthode décrite avec les lipides PC/Chol. Les

résultats montrent que plus la concentration en vérapamil augmente, plus le facteur de stimulation augmente. Une autre préparation de protéoliposomes par la même méthode avec la même P-gp a aussi montré une stimulation de l'activité. Malheureusement, par manque de matériel, les autres techniques de reconstitution n'ont pu être évaluées avec cette préparation de P-gp.

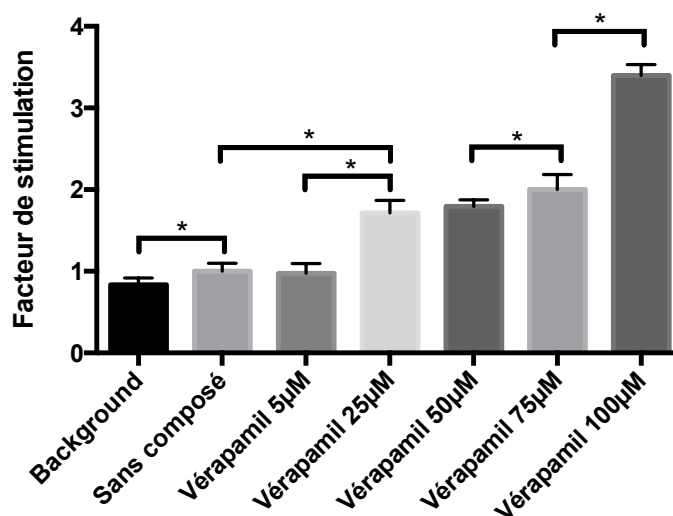


Figure 40. Stimulation de l'activité de la P-gp par le Vérapamil à différentes concentrations.
 * $p < 0,05$: différence significative dans la stimulation de l'activité.

Une explication possible de cette observation est donnée par la dégradation de la P-gp dans la culture cellulaire la plus récente. Comme mentionné précédemment, le doublet présent dans le western blot, observée dès l'extraction des membranes, est probablement associé à une dégradation de la P-gp. Ce doublet n'a pas été visualisé sur le western blot de la P-gp associée à la Figure 40. Des dégradations similaires ont été au préalable observées [111]. Sachant que le protocole de purification suivi était le même, la cause de la dégradation peut être liée à la qualité des inhibiteurs de protéases utilisés. Des études complémentaires sont à effectuer pour confirmer ce résultat.

5.5. Conclusion

Dans cette partie, différentes techniques de reconstitution de la P-gp dans des protéoliposomes ont été étudiées et l'activité ATPasique a été évaluée après chaque méthode.

De nombreux tests d'activité ont été réalisés, aboutissant pour la majorité, à des résultats insatisfaisants du fait de la dégradation de la P-gp. La P-gp humaine produite est très instable et sa dégradation a un impact direct sur son fonctionnement. Cette dégradation est d'autant plus difficile à visualiser que la différence de taille entre le produit dégradé et la P-gp intacte est faible. Sur les westerns blots apparaissent le plus souvent des « patates » au lieu de doublets.

En outre, le test colorimétrique utilisé possède ses limites : l'acidité des réactifs utilisés provoquent l'hydrolyse spontanée de l'ATP, libérant du phosphate. De plus, la solution stock d'ATP est toujours contaminée par des molécules de phosphate inorganique, engendrant un background élevé lors du test. Cela rend le test peu sensible. Des tests commerciaux utilisant une détection par fluorescence sont actuellement disponibles mais sont coûteux.

Cependant, il est possible de comparer les méthodes de reconstitution entre elles. Même si la sonication est la méthode la plus simple et la plus rapide à réaliser, celle-ci provoque une nette dégradation de la P-gp. La chaleur engendrée par la sonication est difficile à contrôler. Ce phénomène a déjà été au préalable constaté [56]. Une sonication plus douce à l'aide d'un bain à sonication à 4°C a été réalisée mais aucune activité n'a pu être observée. Cette méthode de reconstitution est donc limitée. Avec les méthodes de reconstitution par dialyse et par filtration sur gel, les mélanges finaux obtenus étaient trop polydispersés pour évaluer la taille des protéoliposomes. Une étape d'extrusion supplémentaire permettra d'homogénéiser les mélanges mais cette étape n'a pas été réalisée. La méthode par filtration sur gel est prometteuse car elle est plus rapide que la dialyse et les résultats préliminaires du test d'activité ATPasique sont encourageants.

La stimulation de l'activité ATPasique observée reste faible. Plusieurs facteurs sont à prendre en considération. La quantité exacte de transporteur reconstitué dans les protéoliposomes a un impact direct sur l'activité mais aussi l'orientation de la P-gp. En effet, l'activité ATPasique évaluée ne concerne que les transporteurs orientés en influx et pas en efflux. La taille des vésicules n'est peut-être pas adéquate ni la composition en lipides, ni le ratio lipides : protéines. Dans la littérature, de nombreux lipides à différents ratios ont été testés mais il n'existe pas de standardisation dans la méthode de reconstitution. Finalement, la présence de traces de détergent serait néfaste à l'activité ATPasique [112]. La méthode est

donc à optimiser. Une plus grande quantité de protéines devrait être étudiée avec une ATP fraîchement préparée.

CHAPITRE 6 : Discussion générale

Un des objectifs de ce projet était de déterminer le meilleur système d'expression pour la production de la P-gp humaine. Le Tableau 19 résume les résultats obtenus avec les cellules MDCK-MDR1 et les levures *P. pastoris*. Les levures présentent l'avantage d'être facile à cultiver et d'être plus robustes que les cellules de mammifères. Les manipulations avec les levures sont plus simples limitant les risques de contamination. Les deux systèmes d'expression ont une croissance rapide, mais la souche de levures a l'avantage d'être fonctionnelle juste après la décongélation alors que les cellules MDCK-MDR1 nécessitent un ou deux passages. De plus, d'un point de vue économique, éthique et environnemental, les cellules de mammifère sont moins avantageuses en raison de la plus grande utilisation de consommables en plastique non réutilisables et des milieux de culture comportant 10 % de sérum de veau fœtal, un additif essentiel. Concernant la sécurité biologique, ces deux systèmes sont de risque 1, c'est-à-dire qu'ils sont peu susceptibles d'infecter une personne saine ou un animal sain. Pour les deux systèmes, la lyse se fait par rupture mécanique, mais les levures ont l'inconvénient d'avoir une paroi cellulaire très résistante. Même si la technique de lyse utilisée est plus intense, elle n'est que partielle. Le choix des détergents pour la solubilisation s'est basé sur la littérature scientifique. Les détergents CHAPS et DM sont couramment utilisés pour les protéines membranaires [43, 113]. Finalement, la purification de la P-gp humaine est facilitée avec *P. pastoris* grâce à la présence de l'étiquette 10 histidine sur la protéine.

	MDCK-MDR1	<i>Pichia pastoris</i>
Description	Cellules adhérentes	Cellules en suspension
Mode de culture	37°C; 5% CO ₂ ; 95% d'humidité	Agitation ; 30°C
Matériel de départ	30 x 150 cm de boîtes de pétri	7 g de cellules (pour 600mL de culture)
Proportion de P-gp dans les cellules	<LOQ	<1%
Taille de la P-gp sur gel	160 kDa	130 kDa
Lyse cellulaire	Par sonication	Par broyeur cryogénique
Détergent	CHAPS	DM
Quantité de membranes extraites	940 µg	8,4 mg
Rendement final	450 µg	640 µg
Pureté de la P-gp finale	-	+
Temps de préparation	1 mois	2 semaines
Cout de production	+	-

Tableau 19. Comparaison des deux systèmes d'expression (MDCK-MDR1 et *P. pastoris*) pour la production de la P-gp

Une différence de taille d'environ 30 kDa est observée sur le western blot de la P-gp finale exprimée dans les cellules MDCK-MDR1 et la P-gp exprimée dans la souche GS115-MDR1. Cela s'explique par l'absence de glycosylation normale dans le système d'expression de *P. pastoris*. *P. pastoris* est connu pour effectuer des N-glycosylation mais moins que les lignées cellulaires mammaliennes [95, 97]. Dans le cas de la P-gp humaine produite par la souche GS115-MDR1, des études ont montré qu'il n'y avait aucune N-glycosylation [114]. Selon la littérature, la glycosylation n'aurait pas d'influence sur le fonctionnement de la P-gp [115-117].

Que ce soit avec le système d'expression MDCK-MDR1 ou les levures *P. pastoris*, le rendement de la production de la P-gp est faible. Or, la quantité finale de protéine membranaire est un facteur limitant pour les tests d'activité ATPasique et la reconstitution en protéoliposomes. À cela s'ajoute la faible stabilité de la protéine membranaire. L'absence de glycosylation peut expliquer l'instabilité du transporteur exprimé dans *P. pastoris* [118].

De nombreux obstacles ont été rencontrés tout au long de la purification de la P-gp humaine tant avec les levures de mammifères qu'avec les levures. Les problèmes rencontrés avec *P. pastoris* sont davantage liés à la stabilité de la protéine membranaire elle-même qu'au système d'expression. C'est pourquoi, *P. pastoris* a été sélectionné pour produire les futurs transporteurs membranaires qui seront utilisés dans le projet.

Les différentes méthodes de culture, de lyse cellulaire, d'extraction et de purification ont été implémentées au sein du laboratoire avec succès. Les futures productions de protéines membranaires seront facilitées par l'expertise développée. La nouvelle technologie de BioRad a été testée au cours du projet et a permis d'obtenir des résultats plus précis. En effet, la normalisation des gels n'avait jusqu'alors pas été effectuée et la résolution des gels et westerns blots est améliorée. En outre, ce protocole a été adopté du fait de sa simplicité et de sa rapidité.

Les différentes techniques de reconstitution ont été testées et la méthode par filtration a été retenue. Le dernier objectif consistant à évaluer l'activité ATPasique de la P-gp reconstituée dans des protéoliposomes a été abordé mais n'a pas été accompli avec succès. Les résultats n'ont donc pas pu être comparés avec les études *in vitro* de perméabilité membranaire réalisés avec les cellules MDCK-MDR1 et Caco-2.

Il existe plusieurs perspectives à ce projet de recherche. D'une part, le même projet pourrait être réalisé avec la P-gp de rongeur à cause de la faible stabilité de la P-gp humaine. La P-gp de rongeur a la caractéristique d'être relativement stable, très active et est similaire à la P-gp humaine. 93% de la séquence du hamster chinois est similaire à celle de l'humain [37]. Le travail d'optimisation sur la méthode de reconstitution serait ainsi facilité. Le système d'expression de *P. pastoris* pourrait être utilisé. La méthodologie consisterait à développer un vecteur d'expression contenant le gène codant pour *mdr3* avec une étiquette 10 histidine et transférer par la suite le plasmide dans une souche de *P. pastoris*, comme GS115. Toutes les

méthodes développées dans ce mémoire pourront être utilisées et optimisées avec les cellules obtenues. Notre laboratoire de recherche s'intéresse également aux autres transporteurs membranaires de la famille ABC comme BCRP. Des études sur la production de cette protéine membranaire à partir de *P. pastoris* sont en cours. BCRP est une protéine de plus petite taille (72 kDa) [119] et devrait être plus stable par comparaison à la P-gp. Des meilleurs résultats d'activité ATPasique sont donc attendus.

Une approche plus originale consiste à réaliser le test de perméabilité membranaire non pas avec des protéoliposomes mais des exosomes. Les exosomes sont des vésicules d'origine endocytaire, de différentes compositions, de taille comprise entre 40 et 100nm [120], qui sont sécrétées par la plupart des cellules eucaryotes en culture [121]. Les exosomes sont formés à partir d'endosomes multivésiculaires (MVE) qui sont le résultat de bourgeonnement à l'intérieur de la cellule. Le fusionnement des MVE avec la membrane plasmique aboutit à des exosomes qui sont relargués à l'extérieur de la cellule. La présence de la P-gp dans des exosomes a été démontrée [122]. L'expression du transporteur membranaire dans les exosomes est similaire à celle dans la cellule d'origine. Ainsi, les exosomes des cellules résistantes expriment un niveau élevé de P-gp. Ces vésicules contenant des transporteurs membranaires correctement insérés, sont similaires aux protéoliposomes et pourraient donc être utilisées pour l'évaluation de la perméabilité membranaire. Les cellules MDCK-MDR1 surexpriment la P-gp donc elles devraient produire des exosomes contenant la P-gp. La méthode classique de purification consiste à effectuer plusieurs centrifugations et ultracentrifugations. Jusqu'à présent, aucune étude n'a été faite sur les exosomes provenant de cette lignée cellulaire, des tests sont donc à réaliser pour confirmer la présence de la protéine d'intérêt dans les vésicules.

Bibliographie

1. Balimane, P.V. and S. Chong, *Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique*. Drug Discov Today, 2005. **10**(5): p. 335-43.
2. Cabrera-Pérez, M., et al., *Importance and applications of cell-and tissue-based in vitro models for drug permeability screening in early stages of drug development*, in *Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue based In Vitro Culture Models*, B. Sarmiento, Editor. 2015, Woodhead Publishing. p. 3-29.
3. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
4. Sugano, K., et al., *Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(8): p. 597-614.
5. Di, L. and E. Kerns, *Permeability*, in *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*, Elsevier, Editor. 2008, Academic Press. p. 86-99.
6. International Transporter, C., et al., *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 215-36.
7. Dean, M. and R. Allikmets, *Complete characterization of the human ABC gene family*. J Bioenerg Biomembr, 2001. **33**(6): p. 475-9.
8. Russel, F., *Transporters: Importance in Drug Absorption, Distribution, and Removal*, in *Enzyme and Transporter-Based Drug-Drug Interactions: Progress and Future Challenges*, S. Pang, D. Rodrigues, and R. Peter, Editors. 2009, Springer. p. 27-49.
9. Fredriksson, R., et al., *The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families*. FEBS Lett, 2008. **582**(27): p. 3811-6.
10. Lin, L., et al., *SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities*. Nat Rev Drug Discov, 2015. **14**(8): p. 543-60.
11. Balon, K., B.U. Riebesehl, and B.W. Muller, *Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption*. Pharm Res, 1999. **16**(6): p. 882-8.
12. Winterhalter, M., *Black lipid membranes*. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 2000. **5**: p. 250-255.
13. Inui, K.I., et al., *Black lipid membranes as a model for intestinal absorption of drugs*. J Pharm Pharmacol, 1977. **29**(1): p. 22-6.
14. Peetla, C., A. Stine, and V. Labhasetwar, *Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery*. Mol Pharm, 2009. **6**(5): p. 1264-76.
15. Di, L. and E. Kerns, *Permeability Methods*, in *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*, Elsevier, Editor. 2008, Academic Press.
16. Pidgeon, C., et al., *IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability*. J Med Chem, 1995. **38**(4): p. 590-4.
17. Nielsen, P.E. and A. Avdeef, *PAMPA--a drug absorption in vitro model 8. Apparent filter porosity and the unstirred water layer*. Eur J Pharm Sci, 2004. **22**(1): p. 33-41.
18. Sugano, K., *Artificial membrane technologies to assess transfer and permeation of drugs in drug discovery*, in *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, D. Triggle and J. Taylor, Editors. 2007, Elsevier. p. 453-487.

19. Avdeef, A., et al., *PAMPA--critical factors for better predictions of absorption*. J Pharm Sci, 2007. **96**(11): p. 2893-909.
20. Galinis-Luciani, D., L. Nguyen, and M. Yazdanian, *Is PAMPA a useful tool for discovery?* J Pharm Sci, 2007. **96**(11): p. 2886-92.
21. Li, N., et al., *Development of an improved three-dimensional in vitro intestinal mucosa model for drug absorption evaluation*. Tissue Eng Part C Methods, 2013. **19**(9): p. 708-19.
22. Benet, L.Z. and C.L. Cummins, *The drug efflux-metabolism alliance: biochemical aspects*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **50 Suppl 1**: p. S3-11.
23. Dassa, E. and P. Bouige, *The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms*. Res Microbiol, 2001. **152**(3-4): p. 211-29.
24. Higgins, C.F., *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 67-113.
25. Mitra, R., E.M. Coyle, and R. Callaghan, *Just How and Where Does P-glycoprotein Bind All Those Drugs?* 2016: p. 153-194.
26. Biedler, J.L. and H. Riehm, *Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies*. Cancer Res, 1970. **30**(4): p. 1174-84.
27. Bendayan, R., G. Lee, and M. Bendayan, *Functional expression and localization of P-glycoprotein at the blood brain barrier*. Microsc Res Tech, 2002. **57**(5): p. 365-80.
28. Sharom, F.J., *The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs?* J Membr Biol, 1997. **160**(3): p. 161-75.
29. Sharom, F.J., *The P-glycoprotein multidrug transporter*. Essays Biochem, 2011. **50**(1): p. 161-78.
30. Domicевичa, L. and P.C. Biggin, *Homology modelling of human P-glycoprotein*. Biochem Soc Trans, 2015. **43**(5): p. 952-8.
31. Jones, P.M. and A.M. George, *Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **179**(2): p. 187-202.
32. Staud, F., et al., *Expression and function of p-glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics*. Methods Mol Biol, 2010. **596**: p. 199-222.
33. Lown, K.S., et al., *Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine*. Clin Pharmacol Ther, 1997. **62**(3): p. 248-60.
34. Sharom, F.J., *Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1)*. Biochem Cell Biol, 2006. **84**(6): p. 979-92.
35. Ferreira, R.J., D.J. dos Santos, and M.J. Ferreira, *P-glycoprotein and membrane roles in multidrug resistance*. Future Med Chem, 2015. **7**(7): p. 929-46.
36. Higgins, C.F. and M.M. Gottesman, *Is the multidrug transporter a flippase?* Trends Biochem Sci, 1992. **17**(1): p. 18-21.
37. Sharom, F.J., *Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 41.
38. Higgins, C.F. and K.J. Linton, *The ATP switch model for ABC transporters*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(10): p. 918-26.
39. Sjarheyeva, A., R. Liu, and F.J. Sharom, *Characterization of an asymmetric occluded state of P-glycoprotein with two bound nucleotides: implications for catalysis*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7575-86.

40. Padan, E., C. Hunte, and H. Reilander, *Production and purification of recombinant membrane proteins*, in *Membrane protein purification and crystallization*, C. Hunte, G. Von Jagow, and H. Schagger, Editors. 2003, Academic Press: Amsterdam.
41. Healthcare, G., *Purifying Challenging Proteins*, G.H.B.-S. AB, Editor. 2007, General Electric Company.
42. Phillips, R., et al., *Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function*. *Nature*, 2009. **459**(7245): p. 379-85.
43. He, Y., K. Wang, and N. Yan, *The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins*. *Protein Cell*, 2014. **5**(9): p. 658-72.
44. Strausberg, R.L. and S.L. Strausberg, *Overview of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae**. *Curr Protoc Protein Sci*, 2001. **Chapter 5**: p. Unit5 6.
45. Bornert, O., et al., *Overexpression of membrane proteins using *Pichia pastoris**. *Curr Protoc Protein Sci*, 2012. **Chapter 29**: p. Unit 29 2.
46. Shi, X. and D.L. Jarvis, *Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system*. *Curr Drug Targets*, 2007. **8**(10): p. 1116-25.
47. Lin, S.H. and G. Guidotti, *Purification of membrane proteins*. *Methods Enzymol*, 2009. **463**: p. 619-29.
48. Smith, S.M., *Strategies for the purification of membrane proteins*. *Methods Mol Biol*, 2011. **681**: p. 485-96.
49. Seddon, A.M., P. Curnow, and P.J. Booth, *Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1666**(1-2): p. 105-17.
50. Schimerlik, M.I., *Overview of membrane protein solubilization*. *Curr Protoc Neurosci*, 2001. **Chapter 5**: p. Unit 5 9.
51. Von Jagow, G., T. Link, and H. Schagger, *Purification Strategies for Membrane Proteins*, in *Membrane Protein Purification and Crystallization: A practical guide*, C. Hunte, G. Von Jagow, and H. Schagger, Editors. 2003, Elsevier. p. 1-18.
52. Crowe, J., et al., *6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification*. *Methods Mol Biol*, 1994. **31**: p. 371-87.
53. Simeonov, P., et al., *Membrane protein reconstitution into liposomes guided by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*. *Biophys Chem*, 2013. **184**: p. 37-43.
54. Sharom, F.J. and P.D. Eckford, *Reconstitution of membrane transporters*. *Methods Mol Biol*, 2003. **227**: p. 129-54.
55. Hirata, H., *Reconstitution of membrane proteins into vesicular membranes*, in *Techniques for the analysis of membrane proteins*, C.I. Ragan and R.J. Cherry, Editors. 1986, Chapman and Hall New York. p. 77-96.
56. Rigaud, J.L. and D. Levy, *Reconstitution of membrane proteins into liposomes*. *Methods Enzymol*, 2003. **372**: p. 65-86.
57. van Breemen, R.B. and Y. Li, *Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2005. **1**(2): p. 175-85.
58. Volpe, D.A., *Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines*. *Future Med Chem*, 2011. **3**(16): p. 2063-77.
59. FDA, *Food and drug Administration, Guidance for Industry : Drug Interaction Studies* 2012.
60. Li, D. and K.E. H., *Transporter Methods*, in *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*. 2008, Elsevier.

61. Teksin, Z.S., P.R. Seo, and J.E. Polli, *Comparison of drug permeabilities and BCS classification: three lipid-component PAMPA system method versus Caco-2 monolayers*. AAPS J, 2010. **12**(2): p. 238-41.
62. Srinivasan, B., et al., *TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems*. J Lab Autom, 2015. **20**(2): p. 107-26.
63. Luo, S., et al., *Effect of HEPES buffer on the uptake and transport of P-glycoprotein substrates and large neutral amino acids*. Mol Pharm, 2010. **7**(2): p. 412-20.
64. Hubatsch, I., E.G. Ragnarsson, and P. Artursson, *Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers*. Nat Protoc, 2007. **2**(9): p. 2111-9.
65. Tavelin, S., et al., *Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport*. Methods Mol Biol, 2002. **188**: p. 233-72.
66. Di, L., et al., *Development of a new permeability assay using low-efflux MDCKII cells*. J Pharm Sci, 2011. **100**(11): p. 4974-85.
67. Kerns, E.H., et al., *Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery*. J Pharm Sci, 2004. **93**(6): p. 1440-53.
68. Gres, M.C., et al., *Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line*. Pharm Res, 1998. **15**(5): p. 726-33.
69. Yazdani, M., et al., *Correlating partitioning and caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds*. Pharm Res, 1998. **15**(9): p. 1490-4.
70. Zhu, C., et al., *A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential*. Eur J Med Chem, 2002. **37**(5): p. 399-407.
71. Jin, X., et al., *Comparison of MDCK-MDR1 and Caco-2 cell based permeability assays for anti-malarial drug screening and drug investigations*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2014. **70**(2): p. 188-94.
72. Yee, S., *In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth*. Pharm Res, 1997. **14**(6): p. 763-6.
73. Carrara, S., et al., *Evaluation of in vitro brain penetration: optimized PAMPA and MDCKII-MDR1 assay comparison*. Int J Pharm, 2007. **345**(1-2): p. 125-33.
74. Balimane, P.V., S. Chong, and R.A. Morrison, *Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2000. **44**(1): p. 301-12.
75. Doige, C.A. and F.J. Sharom, *Strategies for the purification of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells*. Protein Expr Purif, 1991. **2**(4): p. 256-65.
76. Doige, C.A., X. Yu, and F.J. Sharom, *ATPase activity of partially purified P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1109**(2): p. 149-60.
77. Hopkins, T.R., *Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins*. Bioprocess Technol, 1991. **12**: p. 57-83.
78. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
79. Krohn, R.I., *The colorimetric detection and quantitation of total protein*. Curr Protoc Cell Biol, 2011. **Appendix 3**: p. 3H.

80. Kielkopf, C.L., W. Bauer, and I.L. Urbatsch, *Expressing Cloned Genes for Protein Production, Purification, and Analysis*, in *Molecular cloning : a laboratory manual*, M.R. Green, J. Sambrook, and J. Sambrook, Editors. 2012, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.
81. Garfin, D., *Gel Electrophoresis of Proteins*, in *Essential Cell Biology, Volume 1: Cell Structure, A Practical Approach*, J.D.a.M. Lord, Editor. 2003, Oxford University Press: Oxford UK. p. 197-268.
82. Kuteykin-Teplyakov, K., et al., *Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport*. *Br J Pharmacol*, 2010. **160**(6): p. 1453-63.
83. Watanabe, N., *ATPase assay Protocol for ABC transporter membrane product*, GenoMembrane, Editor., GenoMembrane.
84. al-Shawi, M.K. and A.E. Senior, *Characterization of the adenosine triphosphatase activity of Chinese hamster P-glycoprotein*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(6): p. 4197-206.
85. Tang, F., K. Horie, and R.T. Borchardt, *Are MDCK cells transfected with the human MDR1 gene a good model of the human intestinal mucosa?* *Pharm Res*, 2002. **19**(6): p. 765-72.
86. Greenberger, L.M., et al., *Electrophoretic analysis of P-glycoproteins produced by mouse J774.2 and Chinese hamster ovary multidrug-resistant cells*. *J Natl Cancer Inst*, 1988. **80**(7): p. 506-10.
87. Arnold, T. and D. Linke, *Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins*. *Biotechniques*, 2007. **43**(4): p. 427-30, 432, 434 passim.
88. Hjelmeland, L.M., *Solubilization of native membrane proteins*. *Methods Enzymol*, 1990. **182**: p. 253-64.
89. Shapiro, A.B. and V. Ling, *ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from Chinese hamster ovary cells*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(5): p. 3745-54.
90. Urbatsch, I.L. and A.E. Senior, *Effects of lipids on ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein*. *Arch Biochem Biophys*, 1995. **316**(1): p. 135-40.
91. Doige, C.A., X. Yu, and F.J. Sharom, *The effects of lipids and detergents on ATPase-active P-glycoprotein*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1146**(1): p. 65-72.
92. Kimura, Y., et al., *Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol*. *Biochem J*, 2007. **401**(2): p. 597-605.
93. Rothnie, A., et al., *The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence*. *Eur Biophys J*, 2001. **30**(6): p. 430-42.
94. Lerner-Marmarosh, N., et al., *Large scale purification of detergent-soluble P-glycoprotein from Pichia pastoris cells and characterization of nucleotide binding properties of wild-type, Walker A, and Walker B mutant proteins*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(49): p. 34711-8.
95. Kang, H.A., et al., *Glycosylation of human alpha 1-antitrypsin in Saccharomyces cerevisiae and methylotrophic yeasts*. *Yeast*, 1998. **14**(4): p. 371-81.
96. Grinna, L.S. and J.F. Tschopp, *Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, Pichia pastoris*. *Yeast*, 1989. **5**(2): p. 107-15.
97. Montesino, R., et al., *Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 1998. **14**(2): p. 197-207.

98. Byrne, B., *Pichia pastoris as an expression host for membrane protein structural biology*. Curr Opin Struct Biol, 2015. **32**: p. 9-17.
99. Unrean, P., *Pathway analysis of Pichia pastoris to elucidate methanol metabolism and its regulation for production of recombinant proteins*. Biotechnol Prog, 2014. **30**(1): p. 28-37.
100. Yurimoto, H., M. Oku, and Y. Sakai, *Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis*. Int J Microbiol, 2011. **2011**: p. 101298.
101. Couderc R. , B.J., *Oxidation of Methanol by the Yeast, Pichia pastoris. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase*. Agricultural and Biological Chemistry, 1980. **44**(10): p. 2279-2289.
102. De Schutter, K., et al., *Genome sequence of the recombinant protein production host Pichia pastoris*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(6): p. 561-6.
103. Goncalves, A.M., et al., *Pichia pastoris: a recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins*. J Microbiol Biotechnol, 2013. **23**(5): p. 587-601.
104. Urbatsch, I.L., et al., *Cysteines 431 and 1074 are responsible for inhibitory disulfide cross-linking between the two nucleotide-binding sites in human P-glycoprotein*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 26980-7.
105. technologies, I.b.L., *Pichia Expression Kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris*. 2014, Life technologies.
106. Gurtler, A., et al., *Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis*. Anal Biochem, 2013. **433**(2): p. 105-11.
107. Rath, A., et al., *Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1760-5.
108. Dragosits, M., et al., *The effect of temperature on the proteome of recombinant Pichia pastoris*. J Proteome Res, 2009. **8**(3): p. 1380-92.
109. Shi, X., et al., *Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2003. **28**(2): p. 321-30.
110. Urbatsch, I.L., et al., *Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites*. Biochemistry, 1998. **37**(13): p. 4592-602.
111. Sieczkowski, E., et al., *Double impact on p-glycoprotein by statins enhances doxorubicin cytotoxicity in human neuroblastoma cells*. Int J Cancer, 2010. **126**(9): p. 2025-35.
112. Dong, M., F. Penin, and L.G. Baggetto, *Efficient purification and reconstitution of P-glycoprotein for functional and structural studies*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28875-83.
113. Chattopadhyay, A., K.G. Harikumar, and S. Kalipatnapu, *Solubilization of high affinity G-protein-coupled serotonin1A receptors from bovine hippocampus using pre-micellar CHAPS at low concentration*. Mol Membr Biol, 2002. **19**(3): p. 211-20.
114. Urbatsch, I.L., et al., *Purification and characterization of N-glycosylation mutant mouse and human P-glycoproteins expressed in Pichia pastoris cells*. Arch Biochem Biophys, 2001. **388**(1): p. 171-7.
115. Gottesman, M.M. and I. Pastan, *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter*. Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 385-427.
116. Dong, M., et al., *Secondary structure of P-glycoprotein investigated by circular dichroism and amino acid sequence analysis*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1371**(2): p. 317-34.

117. Kuchler, K. and J. Thorner, *Functional expression of human mdrl in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(6): p. 2302-6.
118. Schinkel, A.H., et al., *N-glycosylation and deletion mutants of the human MDRI P-glycoprotein*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7474-81.
119. Staud, F. and P. Pavek, *Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(4): p. 720-5.
120. Ha, D., N. Yang, and V. Nadihe, *Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges*. Acta Pharm Sin B, 2016. **6**(4): p. 287-96.
121. Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 569-79.
122. Lv, M.M., et al., *Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein*. Tumour Biol, 2014. **35**(11): p. 10773-9.

