



HAL
open science

Rôles des transporteurs ABC dans la variabilité pharmacocinétique des anticoagulants oraux directs : approche in vitro

Elodie Jacqueroux

► **To cite this version:**

Elodie Jacqueroux. Rôles des transporteurs ABC dans la variabilité pharmacocinétique des anticoagulants oraux directs : approche in vitro. Médicaments. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSES057 . tel-02497620

HAL Id: tel-02497620

<https://theses.hal.science/tel-02497620>

Submitted on 3 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE de DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ DE LYON

NNT : 2019LYSES057

Faculté de Médecine de l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne

École Doctorale n° 488
(École Doctorale Sciences-Ingénierie-Santé de Lyon)

Spécialité : Pharmacologie fondamentale

Rôles des transporteurs ABC dans la variabilité pharmacocinétique des anticoagulants oraux directs : approche *in vitro*

Thèse présentée et soutenue publiquement le 9 décembre 2019 pour l'obtention
du grade de Docteur de l'Université de Lyon par :

Elodie JACQUEROUX

Devant le jury composé de :

Pr. Michel Tod	Université Lyon I	Rapporteur
Pr. Céline Verstuyft	Université Paris-Sud 11	Rapporteuse
Pr. Patrick Mismetti	Université Jean Monnet	Examinateur
Dr. Hind Hamzeh-Cognasse	Université Jean Monnet	Examinatrice
Pr. Xavier Delavenne	Université Jean Monnet	Directeur de thèse

THÈSE de DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ DE LYON

NNT : 2019LYSES057

Faculté de Médecine de l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne

École Doctorale n° 488
(École Doctorale Sciences-Ingénierie-Santé de Lyon)

Spécialité : Pharmacologie fondamentale

Rôles des transporteurs ABC dans la variabilité pharmacocinétique des anticoagulants oraux directs : approche *in vitro*

Thèse présentée et soutenue publiquement le 9 décembre 2019 pour l'obtention
du grade de Docteur de l'Université de Lyon par :

Elodie JACQUEROUX

Devant le jury composé de :

Pr. Michel Tod	Université Lyon I	Rapporteur
Pr. Céline Verstuyft	Université Paris-Sud 11	Rapporteuse
Pr. Patrick Mismetti	Université Jean Monnet	Examinateur
Dr. Hind Hamzeh-Cognasse	Université Jean Monnet	Examinatrice
Pr. Xavier Delavenne	Université Jean Monnet	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

A mon directeur de thèse, le Pr. Xavier Delavenne,

Je te remercie de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du laboratoire PIB. Merci pour toute la confiance et l'autonomie que tu m'as accordées durant ces trois années. Grâce à toi, j'ai pu découvrir le vaste monde de la recherche et de la spectrométrie de masse. Tu trouveras dans ce travail le témoignage de mon profond respect.

A mes rapporteurs,

Le Pr. Céline Verstuyft

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit et de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse. Veuillez recevoir toute ma reconnaissance.

Le Pr. Michel Tod

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de rapporter ce travail. C'est un honneur de vous compter parmi ce jury de thèse. Veuillez recevoir ma sincère reconnaissance.

A mes examinateurs,

Le Pr. Patrick Mismetti

Je vous remercie infiniment d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Votre participation à ce jury est pour moi un honneur et un plaisir. Veuillez recevoir ma profonde gratitude.

Le Dr. Hind Hamzeh-Cognasse

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'évaluer ce travail de recherche et de participer à ce jury de thèse. Veuillez recevoir toute ma gratitude.

Merci à toute l'équipe du laboratoire PIB, Sophie, Valérie et Olivier, pour votre soutien, votre expertise et vos conseils tout au long de ma thèse. Merci à mes amis ex-doctorants, Clémentine et Clément, pour nos nombreuses discussions, votre bonne humeur et votre soutien. Merci également à tous les étudiants qui ont égayé ce bureau.

Merci à tous mes amis et à mes proches pour tout leur soutien, dans les bons comme dans les mauvais moments.

Enfin, un immense merci à mon conjoint, Gabriel, sans qui cette thèse n'aurait pas existé. Merci pour ta gentillesse, ton soutien et ton amour inconditionnel, surtout en cette fin de thèse. Je t'aime infiniment.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLES	13
LISTE DES ABRÉVIATIONS	14
CONTEXTE	15

PARTIE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE **19**

Chapitre 1 : Les anticoagulants oraux directs	20
1. Généralités	20
2. Le Dabigatran	20
3. Les anti-Xa	22
3.1. Apixaban	22
3.2. Edoxaban	23
3.3. Rivaroxaban	25
4. Sources de variabilité pharmacocinétique des anticoagulants oraux directs	26
4.1. Les interactions médicamenteuses	27
4.2. Les polymorphismes génétiques	32
4.3. L'insuffisance hépatique	34
4.4. L'insuffisance rénale	35
Chapitre 2 : Le rôle des transporteurs dans la pharmacologie des médicaments	37
1. Généralités sur le passage des médicaments à travers les membranes cellulaires	37
2. La superfamille des transporteurs SLC	40
2.1. La famille des OATP	40
2.1.1. Localisations et fonctions des transporteurs OATP	40
2.1.2. Rôles des OATP dans la variabilité pharmacocinétique des médicaments	41
2.2. La famille des OAT/OCT	42
2.2.1. Localisations et fonctions	42
2.2.2. Implications des OAT dans la pharmacocinétique des médicaments	43
2.2.3. Implications des OCT dans la pharmacocinétique des médicaments	44
2.3. La famille des PEPT	45
2.3.1. Localisations et fonctions des PEPT	45

2.3.2. Implications des PEPT dans la pharmacocinétique des médicaments	45
2.4. La famille des transporteurs MATE	46
2.4.1. Localisations et fonctions des transporteurs MATE	46
2.4.2. Rôles des MATE dans la pharmacocinétique des médicaments	47
3. La superfamille des transporteurs ABC	47
3.1. La P-glycoprotéine	48
3.1.1. Structure, localisation et fonction	48
3.1.2. Implications de P-gp en pharmacologie	49
3.2. La Breast Cancer Resistance Protein	53
3.2.1. Structure, localisation et fonction	53
3.2.2. Implications de BCRP en pharmacologie	54
3.3. Les transporteurs MRP	56
3.3.1. Structures, localisations et fonctions	56
3.3.2. Implications des MRP en pharmacologie	57

Chapitre 3 : Les modèles d'étude des transporteurs membranaires des médicaments ...60

1. Les modèles <i>in vitro</i> d'étude des transporteurs	60
1.1. Les critères d'un bon modèle pharmacologique de barrière <i>in vitro</i>	60
1.1.1. L'étanchéité de la barrière	61
1.1.2. L'expression des jonctions intercellulaires	62
1.1.3. L'expression de transporteurs membranaires fonctionnels	64
1.2. Les différents systèmes cellulaires	64
1.2.1. La culture de cellules primaires	65
1.2.2. Les vésicules membranaires	65
1.2.3. Les lignées cellulaires	67
1.2.3.1. Caco-2	67
1.2.3.2. LLC-PK1	69
1.2.3.3. MDCK	70
1.2.3.4. HEK293	72
1.3. Les méthodes d'évaluation du transport des médicaments	73
1.3.1. Évaluation de l'accumulation intracellulaire	73
1.3.2. Les perméabilités bidirectionnelles et l'efflux ratio	74
1.3.3. Détermination des paramètres pharmacocinétiques	75
1.4. La corrélation <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>	77

2. Les modèles <i>in vivo</i> animaux	79
3. Les modèles humains	81
4. Avantages et inconvénients des différents modèles	83

Chapitre 4 : Les méthodes de quantification des transporteurs ABC86

1. Le Western blot	86
1.1. Principe de la technique et applications aux modèles cellulaires	86
1.2. Avantages et limites de la technique	89
2. La technique immuno-enzymatique	90
2.1. Principe général de l'ELISA	90
2.2. Avantages et limites de la technique ELISA	91
3. La RT-PCR	92
4. La spectrométrie de masse	94
4.1. Principe de la spectrométrie de masse	94
4.2. Application à la quantification des transporteurs membranaires	96
4.2.1. Préparation des échantillons	97
4.2.2. La quantification relative	98
4.2.3. La quantification absolue	99

PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS 105

Chapitre 1 : Étude d'interaction médicamenteuse liée aux transporteurs ABC entre le riociguat et les anticoagulants oraux directs106

1. Contexte et objectifs de l'étude	106
2. Méthodes	107
3. Résultats	107
3.1. Évaluation de la prise en charge du riociguat par P-gp et BCRP	107
3.2. Inhibition de l'efflux de l'apixaban et du rivaroxaban par le riociguat	108

Chapitre 2 : Impact de la quantité de transporteurs ABC sur la prédiction des modèles cellulaires *in vitro* dans la pharmacocinétique du rivaroxaban122

1. Contexte et objectifs de l'étude	122
2. Méthodes	123
3. Résultats	123

3.1. Expression des protéines de jonction et des marqueurs phénotypiques	123
3.2. Évaluation de l'expression et quantification des transporteurs ABC	125
3.3. Évaluation de la fonctionnalité des transporteurs P-gp et BCRP dans l'efflux du rivaroxaban	129
Chapitre 3 : Mise en place d'un modèle cellulaire pour étudier le transport des médicaments au niveau hépatique	179
1. Contexte et objectifs de l'étude	179
2. Méthodes	180
2.1. Culture cellulaire	180
2.2. Expression et quantification des transporteurs ABC par spectrométrie de masse ...	180
2.3. Fonctionnalité des transporteurs ABC	181
2.3.1. Étude fonctionnelle par immunofluorescence	181
2.3.2. Études d'accumulation intracellulaire	182
3. Résultats	182
3.1. Expression et quantification des transporteurs ABC	182
3.2. Fonctionnalité des transporteurs ABC	184
4. Discussion	186
DISCUSSION GÉNÉRALE	189
RÉFÉRENCES	193
LISTE DES TRAVAUX	219

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Évolution de la consommation des AOD et des AVK entre janvier 2012 et septembre 2018 (d'après www.ameli.fr , Medic'AM)	16
Figure 2. Structures chimiques du dabigatran et de sa prodrogue	21
Figure 3. Représentation schématique de la pharmacocinétique du dabigatran (adapté d'après Galgani et al., 2018)	21
Figure 4. Structure chimique de l'apixaban	22
Figure 5. Représentation schématique de la pharmacocinétique de l'apixaban (adapté d'après Galgani et al., 2018)	23
Figure 6. Structure chimique de l'edoxaban	24
Figure 7. Représentation schématique de la pharmacocinétique de l'edoxaban (adapté d'après Galgani et al., 2018)	24
Figure 8. Structure chimique du rivaroxaban	25
Figure 9. Représentation schématique de la pharmacocinétique du rivaroxaban (adapté d'après Galgani et al., 2018)	26
Figure 10. Modification des concentrations plasmatiques d'apixaban en présence de kétoconazole (A) et de diltiazem (B) (d'après Frost et al., 2015)	27
Figure 11. Concentrations plasmatiques de dabigatran après administration de rifampicine (d'après Härtter et al., 2012)	28
Figure 12. Concentrations plasmatiques d'edoxaban seul ou après administration de kétoconazole (A), érythromycine (B) et ciclosporine (C) (d'après Parasrampur et al., 2016)	29
Figure 13. Concentrations plasmatiques d'apixaban seul ou en présence de rifampicine après administration par voie orale (d'après Vakkalagadda et al., 2016)	30
Figure 14. Concentrations plasmatiques du rivaroxaban en absence (●) ou présence (▲) d'inhibiteurs (d'après Mueck et al., 2013)	31
Figure 15. Principaux polymorphismes impliqués dans la pharmacocinétique des AOD (d'après Kanuri et Kreutz, 2019)	34
Figure 16. Évolution du nombre de publications au cours des quarante dernières années (Données issues de PubMed le 16 juin 2019)	37
Figure 17. Schéma des différents types de transport à travers la membrane cellulaire	38
Figure 18. Localisation des transporteurs membranaires au niveau des différentes barrières de l'organisme (d'après Giacomini et al., 2010)	39
Figure 19. Localisation des protéines OATP dans les cellules épithéliales (d'après Roth et al., 2012)	40
Figure 20. Localisation des protéines OAT dans les cellules hépatiques et rénales (d'après Roth et al., 2012)	42
Figure 21. Expression et localisation des protéines OCT dans l'intestin grêle par immunofluorescence (d'après Müller et al., 2005)	43
Figure 22. Expression de l'ARN de PEPT1 et PEPT2 dans l'intestin et le rein (d'après Liu et al., 1995)	45

Figure 23. Expression de MATE1 et MATE2-K dans les tissus humains par northern blot (d'après Otsuka et al., 2005)	46
Figure 24. Structure tridimensionnelle de la P-glycoprotéine (d'après Syed et al., 2017)	48
Figure 25. Expression et localisation apicale de la P-gp sur des cellules Caco-2 (d'après Belliard et al., 2004)	49
Figure 26. Effet d'une coadministration de rifampicine sur la concentration plasmatique de digoxine administrée par voie orale (a) ou injectable (b) (d'après Greiner et al., 1999)	51
Figure 27. Structure tridimensionnelle d'un homodimère de la protéine BCRP (d'après Manolaridis et al., 2018)	53
Figure 28. Localisation de la protéine BCRP dans le placenta (A), le foie (B), l'intestin grêle (C) et le côlon (D) (d'après Maliepaard et al., 2001)	53
Figure 29. Augmentation de l'ASC du topotécan après une prise orale en présence d'élaclidar chez huit patients (d'après Kruijtzter et al., 2002)	55
Figure 30. Structure des protéines MRP (d'après Deeley et al., 2006)	56
Figure 31. Localisation de MRP1 dans des cellules de cryptes intestinales (d'après Peng et al., 1999)	57
Figure 32. Représentation schématique d'une étude de la perméabilité paracellulaire d'une molécule hydrophile sur un modèle cellulaire de barrière	62
Figure 33. Représentation schématique de la culture cellulaire sur insert (d'après Le Guellec et Benz, 2011)	64
Figure 34. Schéma du principe d'une étude de transport avec vésicules membranaires (d'après Glavinas et al., 2008)	66
Figure 35. Microscopie électronique à transmission des cellules Caco-2	68
Figure 36. Quantification de transporteurs SLC et ABC dans les cellules Caco-2 (d'après Ölander et al., 2016)	68
Figure 37. Microscopie électronique à transmission sur les cellules LLC-PK1 (d'après Nielsen et al., 1998)	69
Figure 38. Expression de l'occludine et de ZO-1 par immunofluorescence sur les cellules LLC-PK1 (d'après Clarke et al., 2000)	70
Figure 39. Localisation par immunofluorescence de ZO-1, de l'occludine et des claudines 1, 2 et 4 sur les cellules MDCK I et MDCK II cultivées sur insert (d'après Furuse et al., 2001)	71
Figure 40. Expression et localisation apicale de P-gp sur les cellules MDCK-MDR1 par microscopie confocale après quatre jours de culture sur insert (d'après Hämmerle et al., 2000).....	72
Figure 41. Expression de la P-gp dans les MDCK II natives et transfectées avec le gène MDR1 (A) et avec les gènes des MRPs (B) (d'après Kuteykin-TePLYakov et al., 2010)	72
Figure 42. Représentation schématique du principe d'une étude d'accumulation intracellulaire.....	74
Figure 43. Représentation schématique du principe d'une étude de transport bidirectionnel ..	75
Figure 44. Corrélation entre l'absorption chez l'homme après administration orale et les perméabilités apparentes obtenues sur le modèle Caco-2 (d'après Artursson et Karlsson, 1991).....	77
Figure 45. Corrélation des perméabilités apparentes entre Caco-2 et MDCK (d'après Irvine et al., 1999)	78

Figure 46. Corrélation entre le niveau d'expression de P-gp et les Km apparents <i>in vitro</i> (d'après Shirasaka et al., 2008)	79
Figure 47. Concentrations plasmatiques de talinolol avant et après administration de rifampicine (d'après Whestphal et al., 2000)	81
Figure 48. Effet de la ciclosporine A sur les concentrations plasmatiques du paclitaxel (d'après Terwogt et al., 1998)	82
Figure 49. Pharmacocinétique du topotécan en absence ou présence d'élaclidar chez un patient (d'après Kruijtzter et al., 2002)	83
Figure 50. Variabilité d'identification d'une interaction médicamenteuse selon l'espèce (d'après Le Guellec et Benz, 2011)	84
Figure 51. Représentation schématique des différentes étapes d'un western blot (d'après Jeong et al., 2018)	87
Figure 52. Exemple de détection de BCRP et des MRPs par western blot sur des cellules épithéliales cornéennes (d'après Vellonen et al., 2010)	88
Figure 53. Détection de P-gp et MRP1 par western blot sur les cellules Caco-2 et MDCKs (d'après Luo et al., 2002)	89
Figure 54. Schéma du principe de l'ELISA sur cellules entières	90
Figure 55. Expression des transporteurs Pgp, BCRP, MRP1 et MRP2 par ELISA sur cellules entières dans les modèles RPMI2650 (A) et Caco-2 (B) (d'après Mercier et al., 2018)	91
Figure 56. Principe général d'un cycle de PCR	92
Figure 57. Expression de l'ARNm des transporteurs ABC (A) et SLC (B) dans les cellules Caco-2 et dans les cellules de l'intestin grêle par RT-qPCR (d'après Maubon et al., 2007)	93
Figure 58. Représentation schématique du principe général d'un spectromètre de masse	94
Figure 59. Représentations schématiques des analyseurs en spectrométrie de masse	95
Figure 60. Représentation schématique des principaux modes d'acquisition des données pour la quantification (d'après Hu et al., 2016)	96
Figure 61. Quantification relative des transporteurs ABC dans les cellules Caco-2 et le modèle MucilAir™ (d'après Mercier et al., 2019)	98
Figure 62. Quantification et localisation subcellulaire des transporteurs ABC et SLC dans les cellules Caco-2 (d'après Ölander et al., 2016)	100
Figure 63. Quantification des transporteurs ABC (A) et SLC (B) dans des microsomes hépatiques, rénaux et intestinaux humains par une approche DIA (d'après Nakamura et al., 2016)	101
Figure 64. Quantification des cytochromes P450 et des transporteurs à partir de tissus hépatiques (d'après Weiss et al., 2018)	101
Figure 65. Comparaison de la quantité de transporteurs et récepteurs entre les cellules hCMEC/D3 et des microvaisseaux cérébraux humains (d'après Ohtsuki et al., 2013)	103
Figure 66. Quantification des transporteurs ABC et SLC dans le jéjunum et l'iléum humains (d'après Gröer et al., 2013)	103
Figure 67. Quantification de six transporteurs ABC dans le cortex rénal de cinq espèces (d'après Basit et al., 2019)	104
Figure 68. Km apparent du riociguat sur le modèle MDCK-MDR1 (A) et MDCK-BCRP (B).....	108

Figure 69. Détermination des IC50 du riociguat sur le modèle MDCK-MDR1 (A et B) et MDCK-BCRP (C et D) pour le rivaroxaban (A et C) et l'apixaban (B et D)	109
Figure 70. Pourcentage d'inhibition de l'efflux du rivaroxaban et de l'apixaban par le riociguat sur les modèles MDCK-MDR1 et MDCK-BCRP	110
Figure 71. Expression de ZO-1 par microscopie à épifluorescence sur les cellules MDCK II (A), MDCK-MDR1 (B), MDCK-BCRP (C), Caco-2 _{ATCC} (D) et Caco-2 _{ECACC} (E)	124
Figure 72. Quantification relative des protéines de jonction dans les modèles Caco-2 _{ATCC} (CA), Caco-2 _{ECACC} (CE), MDCK II (M), MDCK-BCRP (MB) et MDCK-MDR1 (MP) par spectrométrie de masse	124
Figure 73. Quantification relative de deux marqueurs phénotypiques dans les modèles Caco-2 _{ATCC} (CA), Caco-2 _{ECACC} (CE), MDCK II (M), MDCK-BCRP (MB) et MDCK-MDR1 (MP) par spectrométrie de masse	125
Figure 74. Quantification relative des transporteurs ABC dans les modèles Caco-2 _{ATCC} (CA), Caco-2 _{ECACC} (CE), MDCK II (M), MDCK-BCRP (MB) et MDCK-MDR1 (MP) par spectrométrie de masse	126
Figure 75. Expression de P-gp par microscopie à épifluorescence sur les cellules MDCK II (A), MDCK-MDR1 (B), MDCK-BCRP (C), Caco-2 _{ATCC} (D) et Caco-2 _{ECACC} (E)	127
Figure 76. Expression de BCRP par microscopie à épifluorescence sur les cellules MDCK II (A), MDCK-MDR1 (B), MDCK-BCRP (C), Caco-2 _{ATCC} (D) et Caco-2 _{ECACC} (E)	128
Figure 77. Expression de P-gp (A) et BCRP (B) par western blot	128
Figure 78. Ratios d'efflux du rivaroxaban (10 µM) dans les cellules Caco-2 _{ATCC} (A), Caco-2 _{ECACC} (B), MDCK-MDR1 (C) et MDCK-BCRP (D), en absence et en présence de concentrations croissantes de vérapamil (0,1, 1, 10, 100, 500 et 1000 µM)	130
Figure 79. Ratios d'efflux du rivaroxaban (10 µM) dans les cellules Caco-2 _{ATCC} (A), Caco-2 _{ECACC} (B), MDCK-MDR1 (C) et MDCK-BCRP (D), en absence et en présence de concentrations croissantes de ko143 (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 25 µM)	131
Figure 80. Quantification relative des transporteurs ABC dans les modèles HepaRG, Caco-2 _{ATCC} et Caco-2 _{ECACC}	183
Figure 81. Quantification absolue de P-gp et BCRP dans la fraction membranaire des cellules HepaRG	184
Figure 82. Imagerie fonctionnelle du transporteur MRP2 à l'aide de la sonde CDFDA avec ou sans inhibiteur (ciclosporine) en microscopie à épifluorescence	185
Figure 83. Taux d'accumulation intracellulaire de rhodamine 123 (A), docétaxel (B) et rivaroxaban (C) en présence de différents inhibiteurs sur les cellules HepaRG	186

LISTE DES TABLES

Table 1. Variabilités pharmacocinétiques des AOD liées aux interactions médicamenteuses ..	32
Table 2. Liste non exhaustive de substrats, inhibiteurs et inducteurs de la P-gp (FDA, 2012)..	50
Table 3. Liste et fréquence des variants de P-gp dans trois populations ethniques (d'après Ieiri, 2012)	52
Table 4. Liste non exhaustive de substrats et inhibiteurs de BCRP (FDA, 2012)	54
Table 5. Localisation et distribution des MRP1 à 5 (d'après Schinkel et Jonker, 2003 ; Borst et al.,2007)	56
Table 6. Liste non exhaustive de substrats et inhibiteurs des MRP (d'après Schinkel et Jonker, 2003 et Giacomini et al., 2010)	58
Table 7. Niveau d'expression de 10 transporteurs membranaires dans les cellules Caco-2 en fonction de leur temps de culture sur insert (d'après Uchida et al., 2014)	102
Table 8. Quantification absolue des transporteurs P-gp et BCRP dans les fractions membranaires des cellules Caco-2 _{ATCC} , Caco-2 _{ECACC} , MDCK II, MDCK-BCRP et MDCK-MDR1	129

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC : ATP-Binding Cassette
ADME : Absorption Distribution Métabolisme Elimination
AMM : Autorisation de mise sur le marché
AOD : Anticoagulant oral direct
AVC : Accident vasculaire cérébral
AVK : Antagoniste de la vitamine K
BCRP : Breast Cancer Resistance Protein
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
CDFDA : 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate
CYP : Cytochrome P450
EC50 : Concentration efficace médiane
EP : Embolie pulmonaire
FDA : Food and Drug Administration
HTP-TEC : Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique
IC50: Concentration inhibitrice médiane (half maximal Inhibitory Concentration)
IAM : Interaction médicamenteuse
LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LLC-PK1 : Lewis-Lung Cancer Porcine Kidney
LLOQ : Limite inférieure de quantification (Lower Limit Of Quantification)
MATE : Multidrug And Toxin Extrusion proteins
MDCK : Madin-Darby Canine Kidney
MDR : Multidrug Resistance Protein
MRM : Multiple Reaction Monitoring
MRP : Multidrug Resistance-associated Protein
OAT : Organic Anion Transporter
OATP : Organic Anion-Transporting Polypeptides
OCT : Organic Cation Transporter
PEPT : Peptides Transporter
P-gp : P-glycoprotéine
PRM : Parallel Reaction Monitoring
SLC : Solute Carrier
TEER : TransEpithelial Electrical Resistance
TVP : Thrombose veineuse profonde
ZO-1 : Zonula Occludens

CONTEXTE

Les anticoagulants oraux sont utilisés depuis de nombreuses années et ont montré leur bénéfice dans le traitement préventif et curatif de la maladie thromboembolique. Pendant les soixante dernières années, les seuls anticoagulants oraux étaient les antagonistes de la vitamine K (AVK), qui exercent leur action anticoagulante de façon indirecte et non spécifique, par inhibition de la synthèse hépatique des facteurs de coagulation vitamine K dépendants (facteurs II, VII, IX, X, Protéines C et S) (Mekaj et al., 2015). Ils sont considérés comme le traitement de référence de toutes les pathologies associées à un risque de complications thromboemboliques relevant d'une activation préférentielle de la coagulation, comme la maladie thromboembolique veineuse, les cardiopathies emboligènes (par exemple, prothèses valvulaires cardiaques mécaniques) ou la fibrillation auriculaire (RCP Coumadine ; RCP Sintrom ; RCP Previscan). D'après l'étude EMIR en 2007, malgré leur efficacité les AVK représentent la première cause iatrogène d'hospitalisation en France du fait du risque hémorragique (ANSM, Rapport "Actualisation du rapport sur les anticoagulants en France : Etat des lieux en 2014 et recommandations de surveillance"). L'utilisation des AVK présente de nombreuses limites comme une marge thérapeutique étroite et d'importantes sources de variabilité intra- et interindividuelle, telles que le poids, l'âge, les interactions médicamenteuses et alimentaires, l'environnement ou encore la génétique (Mekaj et al., 2015).

Afin de limiter ces inconvénients, de nouvelles molécules présentant une variabilité plus faible, un meilleur rapport bénéfice/risque et une utilisation simplifiée ont été développées. Depuis une dizaine d'années, une nouvelle génération d'anticoagulants par voie orale a vu son utilisation augmenter rapidement en pratique clinique : les anticoagulants oraux directs (AOD). La première molécule de cette classe, le ximélagatran, fut retirée du marché en 2006 pour cause de toxicité hépatique grave. C'est donc en 2008 que sera commercialisé le premier AOD, le dabigatran étéxilate, suivi de près par le rivaroxaban, puis l'apixaban en 2011 et enfin l'edoxaban en 2015. A l'inverse des AVK, ces nouvelles molécules inhibent spécifiquement et directement certains facteurs de la coagulation comme la thrombine et le facteur X activé. Les AOD possèdent des indications plus restreintes que les AVK. Contrairement aux AVK, ils sont contre-indiqués en cas de fibrillation auriculaire valvulaire (rétrécissement mitral significatif et prothèse valvulaire mécanique) et ne sont pas indiqués chez l'enfant. Depuis leur commercialisation, ils sont de plus en plus prescrits en remplacement des AVK (Loo et al.,

2017) et tendent aujourd'hui à supplanter les AVK en France (Figure 1), car ils semblent posséder moins de variabilités intra- et interindividuelles pharmacocinétiques et pharmacodynamiques que les AVK (Eikelboom et Weitz, 2010). De plus, ils sont plus faciles à utiliser au quotidien car ils ne nécessitent pas de suivi biologique ni d'adaptation individuelle des doses.

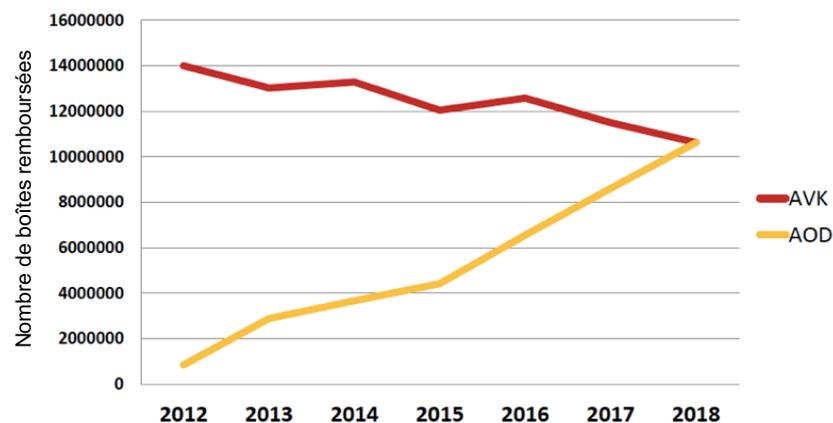


Figure 1. Évolution de la consommation des AOD et des AVK entre janvier 2012 et septembre 2018 (d'après www.ameli.fr, Medic'AM)

Malgré une pharmacocinétique et une pharmacodynamie prévisibles, une grande variabilité interindividuelle dans les réponses plasmatiques et pharmacologiques des AOD a été signalée (Paré et al., 2013 ; Dimatteo et al., 2016 ; Testa et al., 2019). Plusieurs facteurs tels que l'âge, le sexe, l'ethnie, le tabagisme et l'alimentation, ainsi que l'existence de polymorphismes génétiques et d'interactions médicamenteuses peuvent contribuer à cette variabilité interindividuelle (Tracy et al., 2016). En effet, leur association à certains médicaments tels que le kétoconazole ou des inhibiteurs de protéase du VIH par exemple a pu provoquer des modifications de leur pharmacocinétique, conduisant parfois à l'apparition d'évènements indésirables pour les patients (Lakatos et al., 2014 ; Frost et al., 2015). Les variations d'activité des enzymes du métabolisme ne suffisent pas à expliquer l'ensemble des variations pharmacocinétiques observées avec les AOD. Les systèmes de transport présents dans la plupart des membranes cellulaires peuvent également jouer un rôle dans ces phénomènes de variabilité. En effet, chez l'homme certains de ces transporteurs jouent un rôle important dans la pharmacocinétique des médicaments car ils sont impliqués dans les différentes étapes d'Absorption, Distribution, Métabolisme et Élimination (ADME) (Shitara et al., 2006 ; Shugarts et Benet, 2009). Contrairement aux AVK, les AOD sont des substrats des protéines d'efflux telles que la P-glycoprotéine (Gschwind et al., 2013). L'implication des transporteurs membranaires dans la pharmacocinétique des AOD est donc un élément nouveau

comparé aux AVK, et peut être une source importante de variabilité intra- et interindividuelle qu'il est nécessaire de prendre en compte. L'inhibition ou l'induction de ces transporteurs d'efflux peuvent conduire à une surexposition ou une sous-exposition plasmatique aux AOD, responsables respectivement d'un surdosage augmentant le risque hémorragique, ou d'une perte d'efficacité favorisant la survenue d'un événement thrombotique. L'importance clinique de ces phénomènes a favorisé le développement et le recours à des modèles d'étude adaptés. Actuellement, de nombreux modèles *in vivo* et *in vitro* permettent d'étudier l'impact de la prise en charge des AOD par les transporteurs membranaires sur leur pharmacocinétique.

L'objectif principal de ce travail de thèse consistait à évaluer *in vitro* le rôle de deux transporteurs d'efflux, P-gp et BCRP, dans la variabilité pharmacocinétique des anticoagulants oraux directs, particulièrement le rivaroxaban.

Ce manuscrit s'articule autour de deux grandes parties. La première partie est consacrée à l'étude bibliographique du sujet. Un premier chapitre présente les caractéristiques des anticoagulants oraux directs et les sources de variabilité pouvant impacter leur pharmacocinétique. Ensuite, un second chapitre présente les différentes familles de transporteurs membranaires et leurs implications dans la pharmacocinétique des médicaments. Les divers modèles *in vivo* et *in vitro* permettant d'étudier la prise en charge des médicaments par les transporteurs sont exposés dans un troisième chapitre. Finalement, le dernier chapitre aborde les techniques disponibles pour quantifier l'expression des transporteurs sur les modèles d'études exposés précédemment. La seconde partie du manuscrit est consacrée aux trois études expérimentales. La première étude est orientée sur l'étude d'interactions médicamenteuses liées aux transporteurs d'efflux entre le riociguat et deux anticoagulants oraux directs. La deuxième étude est axée sur l'évaluation de certains paramètres pouvant influencer *in vitro* le résultat des études de transport du rivaroxaban. Enfin, la dernière étude est basée sur la mise en place d'un modèle *in vitro* hépatique pour étudier le rôle des transporteurs ABC dans l'élimination biliaire du rivaroxaban.

Les travaux personnels réalisés lors de cette thèse ont été publiés ou sont en cours de publication :

- **Jacqueroux E.**, Mercier C., Margelidon-Cozzolino V., Hodin S., Bertoletti L., Delavenne X. *In vitro* assessment of P-gp and BCRP transporters-mediated drug-drug interactions of riociguat with direct oral anticoagulants. *Fundam Clin Pharmacol.* **2019** [Epub ahead of print]

- **Jacqueroux E.**, Hodin S., Saib S., Bin V., He Z., Delézay O., Delavenne X. Value of quantifying ABC transporters by mass spectrometry and impact on *in vitro*-to-*in vivo* prediction of transporter-mediated drug-drug interactions of rivaroxaban. *Eur J Pharm Biopharm.* (soumis)

Les travaux auxquels j'ai participé au cours de cette thèse ont également été publiés :

- Hodin S., Basset T., **Jacqueroux E.**, Delézay O., Clotagatide A., Perek N., Mismetti P., Delavenne X. *In vitro* Comparison of the Role of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein on Direct Oral Anticoagulants Disposition. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* **2018,43:183-91.**

- Margelidon-Cozzolino V., Hodin S., **Jacqueroux E.**, Delézay O., Bertoletti L., Delavenne X. *In vitro* Assessment of Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions of Direct Oral Anticoagulants: Type 5-Phosphodiesterase Inhibitors Are Inhibitors of Rivaroxaban and Apixaban Efflux by P-Glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther.* **2018,365:519-25.**

- Mercier C., **Jacqueroux E.**, He Z., Hodin S., Constant S., Perek N., Boudard D., Delavenne X. Pharmacological characterization of the 3D MucilAir™ nasal model. *Eur J Pharm Biopharm.* **2019,139:186-96.**

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les anticoagulants oraux directs

1. Généralités

Les anticoagulants oraux directs (AOD) sont des molécules commercialisées depuis une dizaine d'années, dont l'utilisation ne cesse d'augmenter, particulièrement en remplacement des anti-vitamines (AVK) (Loo et al., 2017). En effet, les AOD possèdent moins de variabilités intra et inter-individuelles que les AVK, permettant l'utilisation de doses fixes sans nécessité de suivi biologique, ainsi qu'un délai d'action plus rapide en raison de leur mécanisme d'action (Eikelboom et Weitz, 2010).

Contrairement aux AVK, les AOD ont la particularité d'inhiber de façon spécifique et directe deux facteurs activés de la cascade de coagulation : la thrombine ou facteur IIa et le facteur Stuart activé ou facteur Xa. Les principaux représentants de cette classe thérapeutique sont le dabigatran, l'apixaban, le rivaroxaban et l'edoxaban.

2. L'anti-thrombine : Dabigatran

Le dabigatran est un inhibiteur direct puissant, compétitif et réversible de la thrombine ou facteur IIa, une sérine protéase responsable de la conversion du fibrinogène en fibrine lors de la coagulation. Il inhibe la thrombine libre, la thrombine liée à la fibrine et l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine. Il est actuellement le seul représentant de cette famille disponible par voie orale.

Le dabigatran a la particularité d'être commercialisé sous forme de prodrogue, le dabigatran étéxilate, qui est rapidement converti en dabigatran par hydrolyse catalysée par des carboxylestérases (Figure 2).

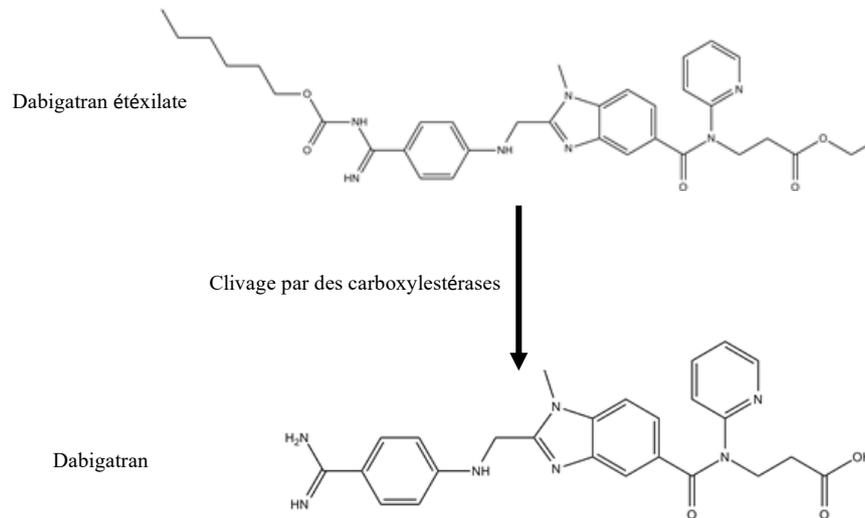


Figure 2. Structures chimiques du dabigatran et de sa prodrogue

Du point de vue pharmacocinétique, le dabigatran possède une biodisponibilité orale très faible d'environ 6,5%. Sa liaison aux protéines plasmatiques est faible (environ 35%) et ne dépend pas de la concentration. L'hydrolyse de la prodrogue en dabigatran, la forme active majoritairement retrouvée dans le plasma, constitue la principale réaction métabolique. Le dabigatran n'est pas métabolisé par les CYP, mais est sujet à une conjugaison formant des acylglucuronides pharmacologiquement actifs. Ces métabolites représentent environ 20% de l'exposition plasmatique totale au dabigatran. L'élimination se fait principalement par voie urinaire sous forme inchangée (Blech et al., 2008) (Figure 3). Le dabigatran étéxilate est aussi un substrat de la protéine d'efflux P-gp, ce qui n'est pas le cas du dabigatran (Ishiguro et al., 2013 ; Hodin et al., 2018). Récemment, il a également été montré *in vitro* que les transporteurs MATE1 et MATE2K seraient impliqués dans la sécrétion rénale du dabigatran (Shen et al., 2019).

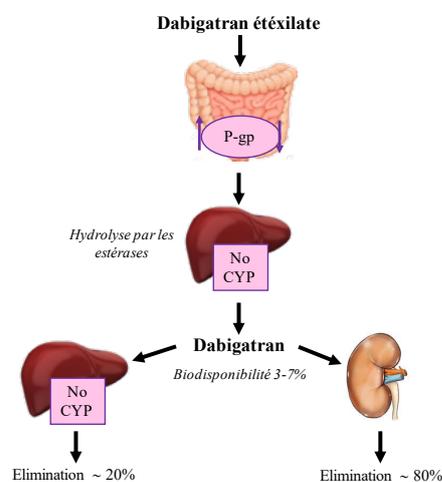


Figure 3. Représentation schématique de la pharmacocinétique du dabigatran (adapté d'après Galgani et al., 2018)

Le dabigatran possède trois grandes indications : la prévention primaire des événements thromboemboliques veineux après une chirurgie pour prothèse totale de hanche ou de genou, la prévention de l'accident vasculaire cérébral (AVC) et de l'embolie systémique chez les patients atteints de fibrillation atriale non valvulaire avec facteurs de risque, le traitement des thromboses veineuses profondes (TVP) et des embolies pulmonaires (EP) et la prévention des récurrences de TVP et d'EP (RCP Pradaxa).

3. Les anti-Xa

La classe des inhibiteurs oraux directs du facteur Xa comporte plusieurs membres en développement, mais seules trois molécules, l'apixaban, l'edoxaban et le rivaroxaban, seront abordées dans ce chapitre du fait de l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) européenne.

3.1. Apixaban

L'apixaban (Figure 4) est un inhibiteur puissant, réversible, direct et hautement sélectif du site actif du facteur Xa. Il inhibe le facteur Xa libre et lié au caillot, ainsi que l'activité de la prothrombinase.

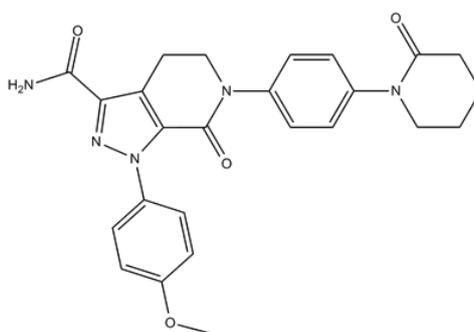


Figure 4. Structure chimique de l'apixaban

Au niveau pharmacocinétique, l'absorption intestinale de l'apixaban est rapide, avec une biodisponibilité orale d'environ 50%. Cette biodisponibilité diminue pour des doses dépassant 25mg. Dans la circulation sanguine, l'apixaban est fortement lié aux protéines plasmatiques (environ 87%) (RCP Eliquis). L'élimination de l'apixaban implique de multiples voies. L'excrétion rénale de l'apixaban sous forme inchangée concerne environ 27% de la clairance totale (Figure 5). Concernant son métabolisme, les principaux sites de

biotransformation sont une O-déméthylation et une hydroxylation du groupement 3-oxopipéridinyle (Raghavan et al., 2008). Le principal CYP impliqué dans son métabolisme est le CYP3A4/5, bien que les CYP1A2, 2C8, 2C9, 2C19 et 2J2 y contribuent aussi de façon mineure (Wang et al., 2010). Il n'a pas été observé de métabolites actifs circulants dans le plasma. L'apixaban est également connu pour être un substrat des protéines d'efflux, particulièrement la P-gp mais aussi BCRP (Zhang et al., 2013 ; Hodin et al., 2018). Cette prise en charge peut être à l'origine de variations lors des étapes d'absorption et d'élimination de l'apixaban.

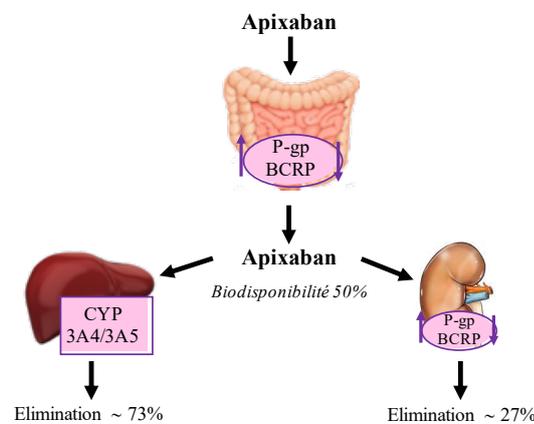


Figure 5. Représentation schématique de la pharmacocinétique de l'apixaban (adapté d'après Galgani et al., 2018)

L'apixaban est indiqué dans la prévention des événements thromboemboliques veineux après une chirurgie pour prothèse totale de hanche ou de genou, la prévention de l'AVC et de l'embolie systémique chez les patients atteints de fibrillation atriale non valvulaire avec facteurs de risque, le traitement de la TVP et de l'EP et la prévention des récurrences de TVP et d'EP (RCP Eliquis).

3.2. Edoxaban

L'edoxaban (Figure 6) est un inhibiteur direct et réversible hautement sélectif du facteur Xa. Il inhibe le facteur Xa libre et interrompt l'activité de la prothrombinase, diminuant ainsi la formation de thrombine et le risque de formation de thrombus.

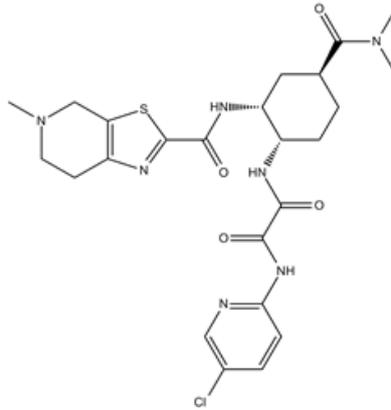


Figure 6. Structure chimique de l'edoxaban

Au niveau pharmacocinétique, l'edoxaban possède une biodisponibilité d'environ 62% par voie orale et est rapidement absorbé. La forme inchangée est la forme prédominante dans le plasma et sa liaison aux protéines plasmatiques est d'environ 55% *in vitro* (RCP Lixiana). L'edoxaban possède trois métabolites actifs. Le métabolisme joue un rôle modeste dans l'élimination de l'edoxaban (inférieur à 25%), l'hydrolyse par la carboxylestérase 1 étant la voie principale de métabolisation. Les réactions de conjugaison ou d'oxydation par les CYP3A4/5 participent de façon mineure à son métabolisme (moins de 10%) (Bathala et al., 2012 ; RCP Lixiana). L'edoxaban est principalement éliminé sous forme inchangée par voie rénale, la clairance rénale représentant environ 50% de la clairance totale. L'excrétion biliaire et le métabolisme contribuent à l'élimination du reste de la dose (Bathala et al., 2012) (Figure 7). L'edoxaban est également pris en charge de manière équivalente par les transporteurs d'efflux P-gp et BCRP et son métabolite actif est un substrat du transporteur d'influx OATP1B1 (Mikkaichi et al., 2014 ; Hodin et al., 2018).

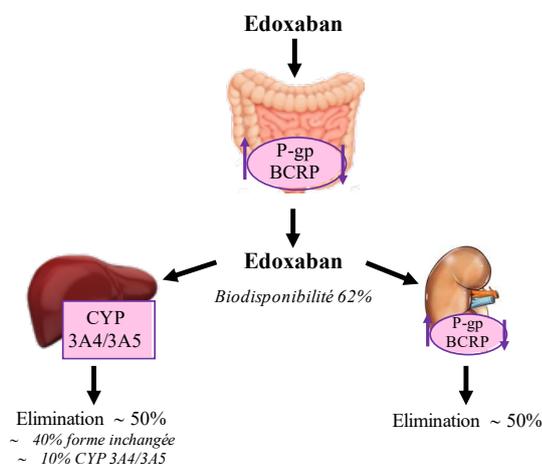


Figure 7. Représentation schématique de la pharmacocinétique de l'edoxaban (adapté d'après Galgani et al., 2018)

L'edoxaban est indiqué dans le traitement et la prévention des récurrences de la TVP et de l'EP, ainsi que dans la prévention de l'AVC et de l'embolie systémique chez les patients atteints de fibrillation atriale non valvulaire avec facteurs de risque (RCP Lixiana).

3.3. Rivaroxaban

Le rivaroxaban, dont la structure chimique est représentée par la Figure 8, est un inhibiteur direct hautement sélectif du facteur Xa qui interrompt les voies intrinsèque et extrinsèque de la cascade de coagulation, inhibant ainsi la formation de thrombine et le développement du thrombus. Des études cinétiques *in vitro* ont montré que l'inhibition du facteur Xa par le rivaroxaban était compétitive, avec une affinité environ dix mille fois supérieure pour la thrombine par rapport aux autres sérine protéases (Perzborn et al., 2005).

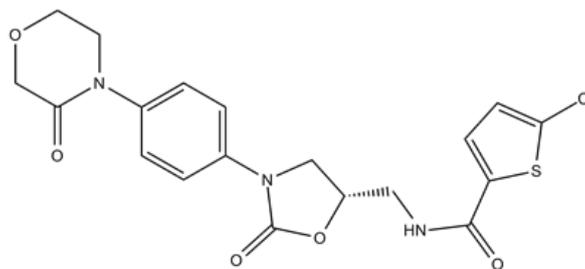


Figure 8. Structure chimique du rivaroxaban

Du point de vue de sa pharmacocinétique, le rivaroxaban est presque totalement et rapidement absorbé au niveau intestinal, avec une biodisponibilité orale élevée entre 80% et 100%. Cependant, cette absorption est dépendante de son site de libération dans le tractus gastro-intestinal. Au niveau plasmatique, le rivaroxaban est fortement lié aux protéines, particulièrement l'albumine sérique (environ 92% à 95%) (RCP Xarelto). Sur la dose totale administrée, un tiers est éliminé sous forme inchangée par voie urinaire, principalement par sécrétion rénale active. Les deux tiers restants subissent une dégradation par voie métabolique (Weinz et al., 2009). Le rivaroxaban est majoritairement métabolisé par le CYP3A4, mais aussi par le CYP2J2 et par d'autres réactions indépendantes des CYP, comme l'oxydation de la fraction morpholinone et l'hydrolyse des liaisons amides (Lang et al., 2009). Cette métabolisation conduit à la formation de nombreux métabolites, mais aucun métabolite majeur ou actif n'est présent dans le plasma. Des études *in vitro* ont également montré que les transporteurs d'efflux P-gp et BCRP sont impliqués à part égale dans le transport du

rivaroxaban et jouent donc un rôle dans son absorption et son élimination (Gnoth et al., 2011 ; Hodin et al., 2018) (Figure 9).

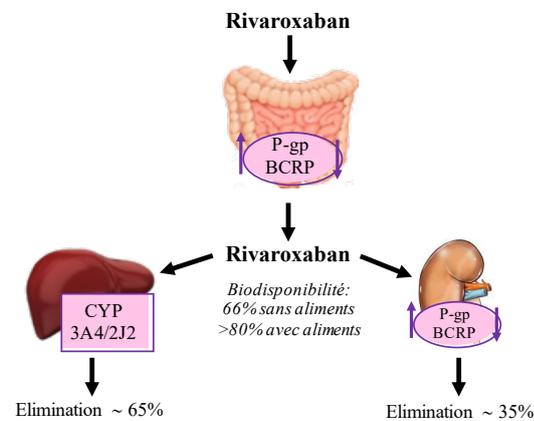


Figure 9. Représentation schématique de la pharmacocinétique du rivaroxaban (adapté d'après Galgani et al., 2018)

A ce jour, le rivaroxaban possède de nombreuses indications telles que la prévention primaire des événements thromboemboliques veineux après une chirurgie pour prothèse totale de hanche ou de genou, le traitement de la TVP et de l'EP et la prévention des récurrences de TVP et d'EP, la prévention des AVC et des embolies systémiques chez les patients atteints de fibrillation atriale non valvulaire avec facteurs de risque. Il est également indiqué en association avec l'acide acétylsalicylique dans la prévention des événements athérothrombotiques chez les patients présentant une maladie coronarienne ou une maladie artérielle périphérique symptomatique à haut risque d'évènements ischémiques, et en association avec l'acide acétylsalicylique \pm clopidogrel ou ticlopidine dans la prévention des événements athérothrombotiques suite à un syndrome coronarien aigu avec élévation des biomarqueurs cardiaques (RCP Xarelto).

4. Sources de variabilité pharmacocinétique des anticoagulants oraux directs

En fonction de leur profil pharmacocinétique, une ou plusieurs sources de variabilité intra- ou interindividuelle peuvent affecter les étapes d'absorption et d'élimination des différents AOD. Les principales sources de variabilité sont les interactions médicamenteuses, les polymorphismes génétiques et les altérations des fonctions hépatiques et rénales.

4.1. Les interactions médicamenteuses

Les principales variabilités liées au métabolisme sont causées par des interactions au niveau des CYP hépatiques. Le dabigatran n'étant pas métabolisé par les CYP, il a donc un faible potentiel d'interactions médicamenteuses liées à son métabolisme. En effet, aucune interaction n'a été démontrée *in vitro* ou *in vivo* (Blech et al., 2008 ; Stangier et Clemens, 2009). C'est aussi le cas de l'edoxaban, les CYP jouant un rôle mineur dans son métabolisme. Une étude *in vivo* a d'ailleurs montré l'absence d'interaction significative en présence d'inhibiteurs du CYP3A4 (Parasrampur et al., 2016). Cependant, il semble exister une interaction avec la rifampicine, un inducteur du CYP3A4, qui diminue l'exposition à l'edoxaban et augmente celle de ses métabolites actif (Mendell et al., 2015).

Au contraire, l'apixaban et le rivaroxaban sont des substrats du CYP3A4 hépatique et sont donc plus sensibles à une modification de l'activité des CYP. L'apixaban est métabolisé par plusieurs CYP, plus particulièrement le CYP3A4. Une diminution de la production des métabolites de l'apixaban a été démontrée *in vitro* en présence de plusieurs inhibiteurs des CYP (Wang et al., 2010). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* chez des volontaires sains en présence de deux inhibiteurs du CYP3A4, le kétoconazole et le diltiazem, conduisant à une augmentation de 1,4 à 2 fois de l'exposition plasmatique à l'apixaban (Frost et al., 2015) (Figure 10).

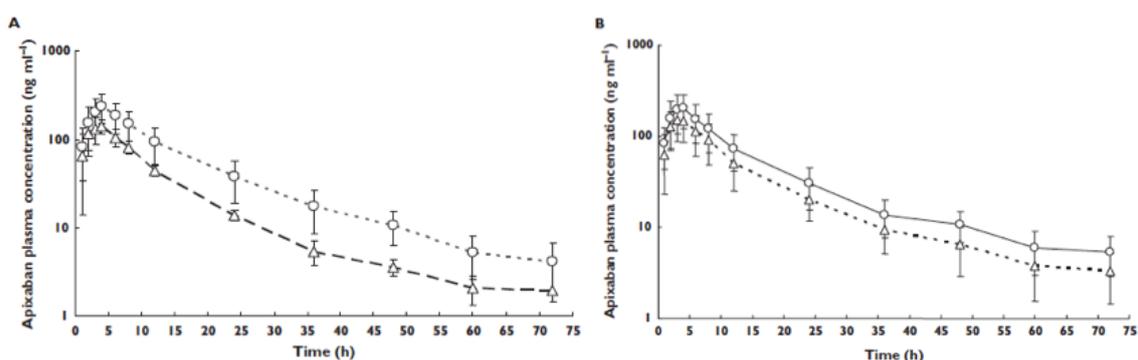


Figure 10. Modification des concentrations plasmatiques d'apixaban en présence de kétoconazole (A) et de diltiazem (B) (d'après Frost et al., 2015).
(Δ) apixaban, (\circ) apixaban + inhibiteur

Quant au rivaroxaban, sa concentration plasmatique est significativement augmentée en présence d'inhibiteurs puissants du CYP3A4 (kétoconazole ou ritonavir) et dans une moindre mesure avec des inhibiteurs modérés comme la clarithromycine (Mueck et al., 2013). De plus, plusieurs études de cas ont rapporté une diminution de l'effet anticoagulant du

rivaroxaban lors d'associations avec des inducteurs du CYP3A4 comme la rifampicine (Altena et al., 2014) ou certains épileptiques tels la carbamazépine et la phénytoïne (Galgani et al., 2018).

Les inhibiteurs et inducteurs des CYP450 sont également de puissants inhibiteurs et inducteurs des transporteurs ABC, plus particulièrement de la P-gp et de BCRP. Il est donc difficile *in vivo* de conclure à une interaction liée uniquement à une modulation de l'activité des CYP, car une régulation de l'activité des transporteurs d'efflux peut également modifier l'exposition aux AOD. Tous les membres appartenant à la famille des AOD sont des substrats de P-gp et/ou BCRP.

Pour le dabigatran, les interactions avec les transporteurs ABC n'ont lieu qu'au niveau intestinal car seul le dabigatran étéxilate est un substrat de la P-gp (Ishiguro et al., 2013). Il n'y aura donc pas de modification de son élimination rénale. La P-gp est à l'origine de la très faible biodisponibilité orale du dabigatran car elle limite fortement son absorption intestinale. Par conséquent, l'inhibition de l'activité de la P-gp peut provoquer une surexposition et donc un surdosage en dabigatran, élevant ainsi le risque de saignement. Härtter et al. ont démontré que la coadministration de vérapamil avec le dabigatran augmentait jusqu'à 2,5 fois la biodisponibilité du dabigatran (Härtter et al., 2013). C'est également le cas avec la clarithromycine, qui conduit à une augmentation de 49% de l'ASC et 60% de la C_{max} (Delavenne et al., 2013). A l'inverse, l'administration concomitante de rifampicine pendant une semaine entraîne une diminution d'environ 65% de la biodisponibilité du dabigatran (Härtter et al., 2012) (Figure 11). Dans les sept jours suivant l'arrêt de l'administration de la rifampicine, la biodisponibilité du dabigatran est presque revenue aux valeurs initiales.

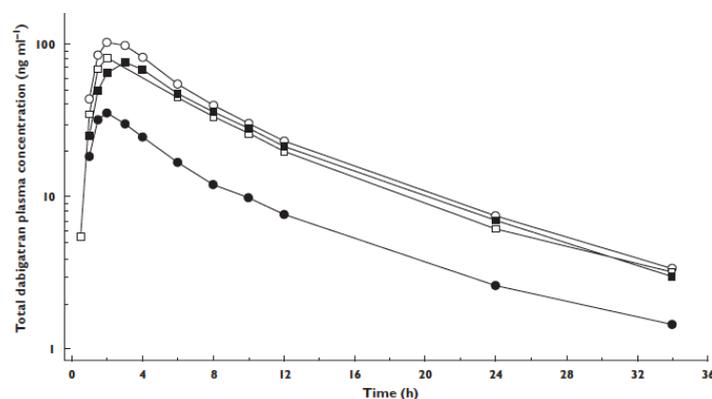


Figure 11. Concentrations plasmatiques de dabigatran après administration de rifampicine (d'après Härtter et al., 2012).

(○) dabigatran, (●) dabigatran + rifampicine, (■) 7j après arrêt de la rifampicine, (□) 14j après arrêt de la rifampicine.

L'edoxaban est aussi sujet aux interactions liées aux transporteurs. La coadministration de vérapamil, de quinidine ou de dronédarone augmente de plus de 50% l'exposition totale à l'edoxaban (Mendell et al., 2013). Des résultats similaires ont été retrouvés chez des volontaires sains après administration d'inhibiteurs puissants de P-gp et des CYP (Parasrampur et al., 2016). L'administration concomitante de kétoconazole, d'érythromycine ou de ciclosporine a augmenté l'ASC de l'edoxaban de 87%, 85% et 73% respectivement, et la C_{max} de 89%, 68% et 74% respectivement (Figure 12).

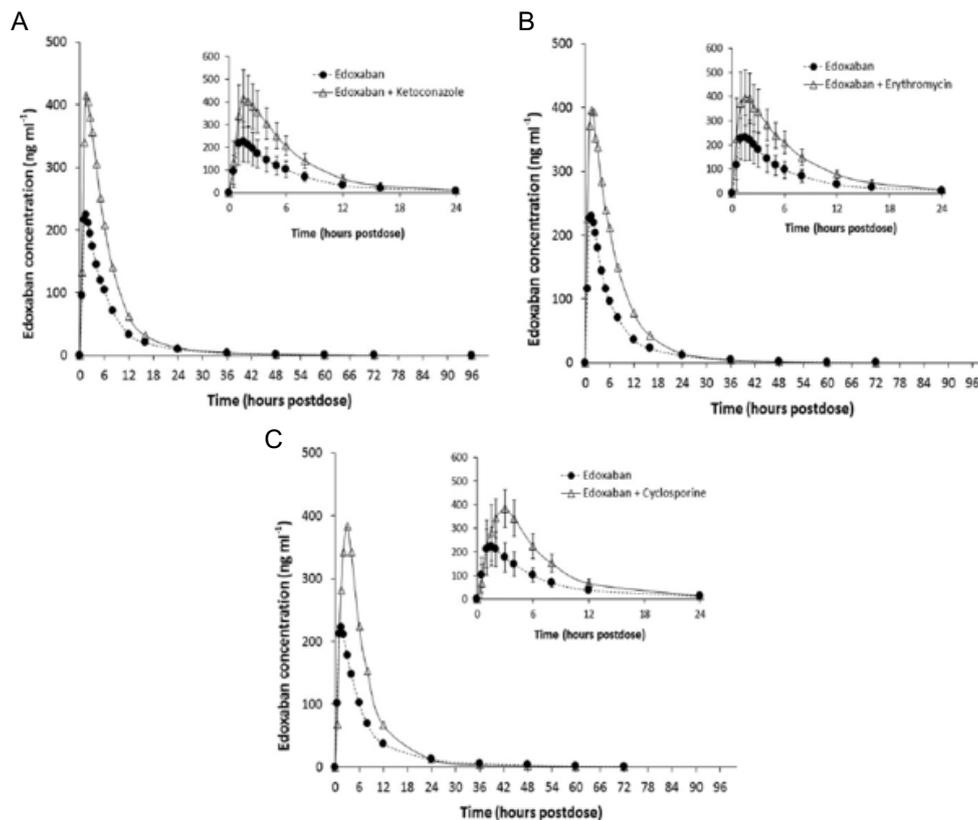


Figure 12. Concentrations plasmatiques d'edoxaban seul ou après administration de kétoconazole (A), érythromycine (B) et ciclosporine (C) (d'après Parasrampur et al., 2016).

L'exposition au principal métabolite actif de l'edoxaban était constante lorsque l'edoxaban était administré seul ou avec du kétoconazole et de l'érythromycine, suggérant que l'effet observé est principalement dû à l'inhibition de P-gp et/ou BCRP. Toutefois, l'exposition totale au métabolite a été multipliée par 6,9 avec la ciclosporine, ce qui suggère une interaction supplémentaire au niveau des CYP. Ces interactions pouvant être cliniquement significatives, une adaptation posologique de l'edoxaban en présence d'inhibiteurs puissants de P-gp et BCRP, comme par exemple le kétoconazole ou la dronédarone, a été recommandée (RCP Lixiana). A l'inverse, la coadministration de rifampicine conduit à une diminution d'environ 35% de

l'exposition à l'edoxaban, notamment par induction de la P-gp limitant alors principalement son absorption intestinale (Mendell et al., 2015).

Comme pour les autres AOD, l'inhibition de l'efflux de l'apixaban par la P-gp a pour conséquence une légère diminution de sa clairance et une augmentation de son absorption intestinale, conduisant à une valeur d'AUC multipliée par 2 ou par 1,4 en présence de kétoconazole ou de diltiazem, respectivement (Frost et al., 2015). Pour cette raison, il est déconseillé d'administrer l'apixaban en association avec des inhibiteurs puissants de la P-gp (antifongiques azolés ou inhibiteurs de la protéase du VIH) (RCP Eliquis). La rifampicine modifie aussi la prise en charge de l'apixaban par P-gp et BCRP. Elle diminue de 54% l'AUC et de 24% la biodisponibilité de l'apixaban après une administration orale. Cette diminution de l'exposition à l'apixaban est due à une diminution de son absorption intestinale mais également à une augmentation de son élimination rénale (Vakkalagadda et al., 2016) (Figure 13).

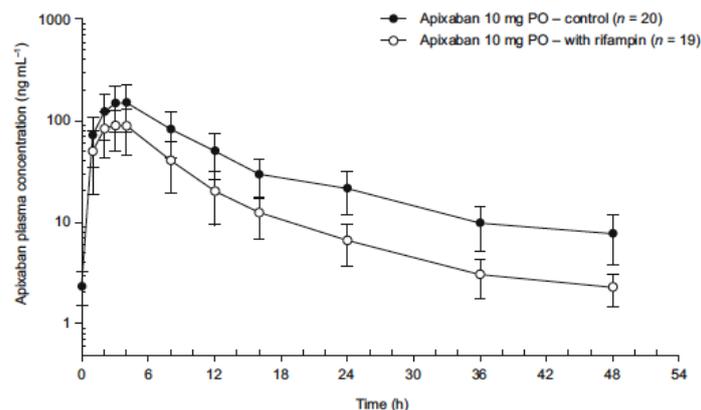


Figure 13. Concentrations plasmatiques d'apixaban seul ou en présence de rifampicine après administration par voie orale (d'après Vakkalagadda et al., 2016)

Enfin, l'administration concomitante de rivaroxaban et d'un inhibiteur puissant de P-gp et BCRP (kétoconazole ou ritonavir) provoque une élévation significative de plus de deux fois de l'exposition au rivaroxaban. L'association de kétoconazole ou de ritonavir diminue la sécrétion rénale du rivaroxaban de 44% et 80% respectivement (Mueck et al., 2013) (Figure 14).

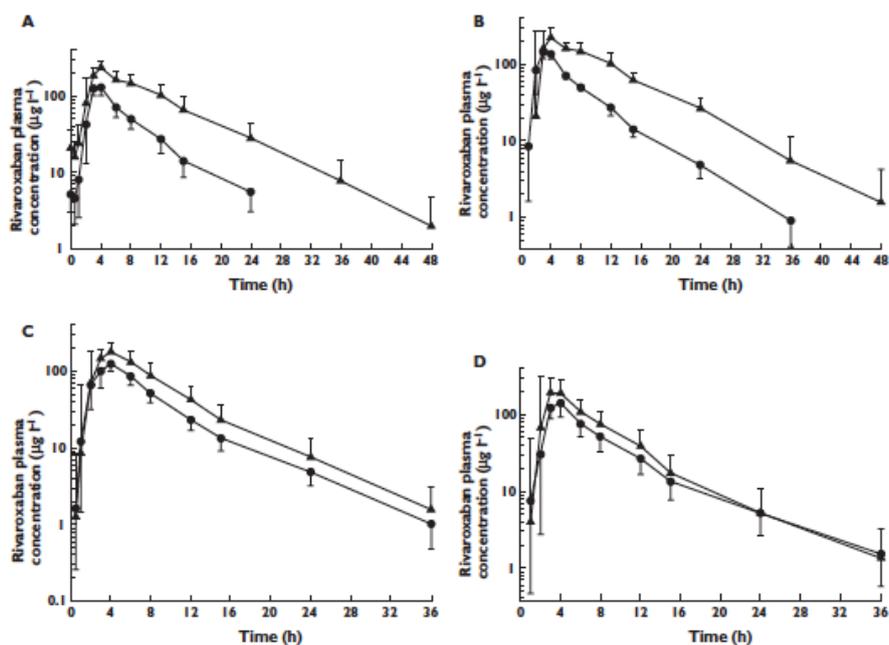


Figure 14. Concentrations plasmatiques du rivaroxaban en absence (●) ou présence (▲) d'inhibiteurs (d'après Mueck et al., 2013)
 (A) kétoconazole, (B) ritonavir, (C) clarithromycine, (D) érythromycine.

Une augmentation similaire de l'exposition au rivaroxaban chez des rats a également été décrite en présence de vérapamil, un inhibiteur de la P-gp (Kim et al., 2019). Récemment, Brings et al. ont montré chez des volontaires sains que la combinaison d'un inhibiteur puissant de la P-gp et d'un inhibiteur modéré du CYP3A peut affecter la pharmacocinétique du rivaroxaban plus fortement que chaque médicament pris séparément (Brings et al., 2019). En effet, l'administration concomitante de ciclosporine a augmenté l'ASC du rivaroxaban de 47% et a doublé sa C_{max} , tandis que l'administration de ciclosporine associée au fluconazole a augmenté l'ASC du rivaroxaban de 86% et sa C_{max} de 115%. Comme pour les précédents AOD, la rifampicine et les autres inducteurs de la P-gp et de BCRP ont pour effet de diminuer l'exposition plasmatique au rivaroxaban, pouvant mener à une diminution de l'effet anticoagulant (Mueck et al., 2014 ; Galgani et al., 2018). La Table 1 résume les variations des ASC observées lors d'interactions médicamenteuses pour les quatre AOD, en fonction de la puissance des inhibiteurs/inducteurs.

Table 1. Variabilités pharmacocinétiques des AOD liées aux interactions médicamenteuses

Médicaments	Modifications de l'ASC des concentrations plasmatiques des AOD			
	Dabigatran	Apixaban	Edoxaban	Rivaroxaban
Inhibiteurs puissants de CYP3A4/ P-gp/BCRP <i>Kétoconazole, ritonavir, vérapamil, ciclosporine (CsA), quinidine, amiodiarone</i>	↑ ~ 60-143%	↑ ~ 100%	↑ ~ 87%	↑ ~ 155-180% ↑ 47% (CsA)
Inhibiteurs modérés de P-gp/BCRP <i>Érythromycine, fluconazole, clarithromycine, diltiazem</i>	↑ ~ 49%	↑ ~ 40%	↑ ~ 85%	↑ ~ 34-42% ↑ 54%
Inducteurs de CYP3A4/P-gp/BCRP <i>Rifampicine, phénytoïne, carbamazépine</i>	↓ ~ 65%	↓ ~ 54%	↓ ~ 35%	↓ ~ 50%

4.2. Les polymorphismes génétiques

L'influence des polymorphismes génétiques concerne à la fois le métabolisme des AOD mais également leur prise en charge par les transporteurs membranaires.

Plusieurs polymorphismes génétiques interviennent dans la pharmacocinétique du dabigatran. Deux polymorphismes du gène CES1, codant pour la carboxylestérase 1 responsable de la formation du dabigatran au niveau hépatique et plasmatique, ont été respectivement associés aux pics plasmatiques (rs8192935) et aux concentrations résiduelles (rs2244613). Le polymorphisme rs2244613 est associé à une diminution de la concentration résiduelle de dabigatran et à une diminution du risque de saignement, sans augmentation du risque prothrombotique (Paré et al., 2013). Dans une autre étude menée chez des patients recevant une prophylaxie au dabigatran après une chirurgie orthopédique, les concentrations résiduelles étaient plus basses pour le génotype AA du polymorphisme rs2244613 (17,1 ng/ml en moyenne) comparé au génotype CC (34,6 ng/ml en moyenne) bien que ces concentrations ne soient pas significativement différentes (Sychev et al., 2018). Un deuxième polymorphisme de CES1 (rs8192935) a été associé à la variabilité des concentrations maximales et minimales de dabigatran, sans impact clinique sur le risque de saignement (Paré et al., 2013). Chez des patients atteints de fibrillation auriculaire, le génotype CC a été associé à des concentrations plasmatiques de dabigatran plus élevées (86,3 ng/ml) comparativement aux porteurs de l'allèle

T (62,1 ng/ml) qui est associé à des concentrations résiduelles plus basses (Dimatteo et al., 2016). Du côté de la P-gp, le polymorphisme 3435C>T (rs1045642) a été associé de façon significative à une concentration maximale de dabigatran et à une incidence accrue d'épisodes hémorragiques. Les patients porteurs du génotype TT ont présenté des concentrations maximales de dabigatran plus élevées ($C_{\max} = 291,8$ ng/ml) ainsi qu'un risque de saignement plus élevé (risque relatif : 1,72) que les patients présentant le génotype CC ($C_{\max} = 124,1$ ng/ml) (Sychev et al., 2018). Gouin-Thibault et al. ont également étudié chez des volontaires sains trois polymorphismes de P-gp : 2677G>A/T (rs2032582), 3435C>T (rs1045642) et 1236C>T (rs1128503). Les sujets hétérozygotes et homozygotes mutés présentaient une augmentation de l'ASC de 25% et 28% respectivement, comparé aux sujets homozygotes non mutés, bien que l'impact clinique de ces polymorphismes sur la pharmacocinétique du dabigatran semble très limité (Gouin-Thibault et al., 2017).

Les principaux polymorphismes étudiés dans le cas du rivaroxaban sont ceux du gène ABCB1 codant pour la P-gp. Peu d'études ont évalué le rôle des polymorphismes de P-gp dans la variabilité pharmacocinétique du rivaroxaban. Chez des volontaires sains, les polymorphismes 2677G>A/T (rs2032582), 3435C>T (rs1045642) et 1236C>T (rs1128503) ont été associés à une augmentation de l'ASC de 24% et 15% respectivement chez les sujets hétérozygotes et les sujets homozygotes mutés (Gouin-Thibault et al., 2017). Cependant, l'haplotype combiné (1236-2677-3435) n'a pas d'impact cliniquement significatif sur la pharmacocinétique du rivaroxaban. De plus, l'effet d'un inhibiteur tel que la clarithromycine est indépendant des génotypes. Des données similaires ont été retrouvées dans une étude *in vitro* évaluant l'accumulation du rivaroxaban dans des cellules HEK293 transfectées avec différents polymorphismes (1236C>T, 2677G>A/T, 3435C>T et 1199G>A) (Sennesael et al., 2018). Aucune différence d'accumulation intracellulaire du rivaroxaban n'a été observée entre les protéines variantes et la protéine native.

Pour l'apixaban, une étude menée chez des patients japonais atteints de fibrillation auriculaire a étudié l'impact de polymorphismes de P-gp (1236C>T, 2677G>A/T et 3435C>T), de BCRP (421C>A ; rs2231142) et du CYP3A5 (6986A>G ; rs776746, *3) sur sa pharmacocinétique (Ueshima et al., 2017). Aucun effet significatif des polymorphismes de P-gp sur la pharmacocinétique de l'apixaban n'a été observé. Au contraire, le polymorphisme de BCRP était associé à une exposition plasmatique de l'apixaban 1,55 fois plus élevée chez les homozygotes mutés AA. De même, le polymorphisme du CYP3A5 était associé à une exposition environ 1,6 fois plus importante chez les sujets hétérozygotes et homozygotes mutés CYP3A5*3/3 (Ueshima et al., 2017). Dans leur étude, Kryukov et al. n'ont montré aucune

association significative entre les polymorphismes de P-gp (rs1045642 et rs4148738) et du CYP3A5 et la variabilité pharmacocinétique de l'apixaban chez des patients souffrant de fibrillation auriculaire et d'AVC (Kryukov et al., 2018).

Peu d'études se sont intéressées au rôle des polymorphismes génétiques dans la pharmacocinétique de l'edoxaban. Dans une étude menée récemment par Vandell et al. chez des volontaires sains, le polymorphisme de P-gp 3435C>T et le polymorphisme de OATP1B1 521T>C (rs4149056) n'ont eu aucun effet significatif sur la pharmacocinétique de l'edoxaban (Vandell et al., 2018). Une légère augmentation de l'ASC du métabolite M4 de l'edoxaban a été notée chez les porteurs de l'allèle C du polymorphisme de OATP1B1 comparativement aux homozygotes TT. Cependant, cette augmentation a un faible risque d'être cliniquement significative car les concentrations du métabolite M4 représentent moins de 10% de l'exposition totale à l'edoxaban.

La Figure 15 résume les principaux polymorphismes génétiques potentiellement impliqués dans la variabilité pharmacocinétique des AOD.

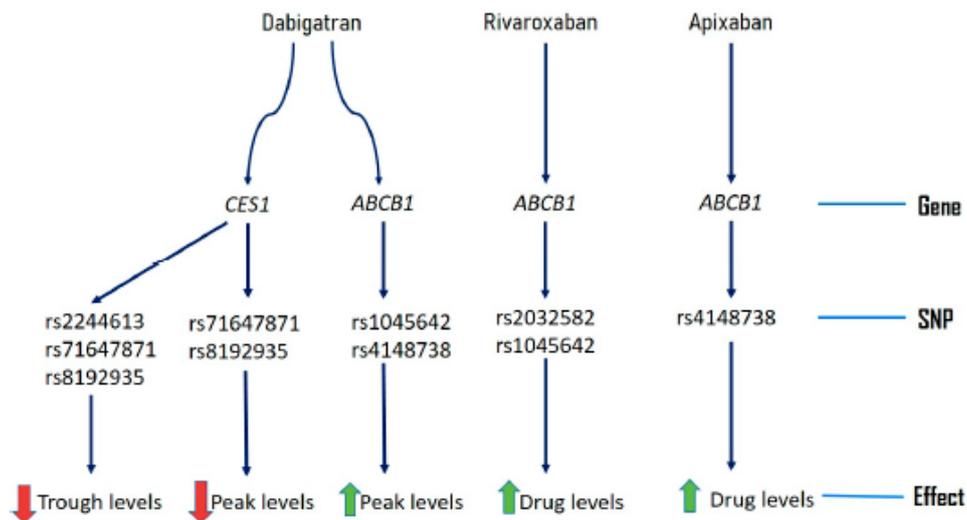


Figure 15. Principaux polymorphismes impliqués dans la pharmacocinétique des AOD (d'après Kanuri et Kreutz, 2019).

4.3. L'insuffisance hépatique

Concernant l'influence d'une modification de la fonction hépatique, seule l'exposition au rivaroxaban est augmentée de manière significative lors d'une insuffisance hépatique modérée (classe B du score Child-Pugh), avec une multiplication par 2,3 en moyenne de l'ASC (RCP Xarelto). Pour les insuffisances hépatiques légères à modérées, et en l'absence de coagulopathie, l'apixaban, l'edoxaban et le rivaroxaban peuvent être administrés avec

précaution. Le dabigatran possède un faible métabolisme hépatique. Il est principalement métabolisé par glucuroconjugaison, aboutissant à la formation de métabolites actifs. Une insuffisance hépatique modérée ne modifie donc pas significativement les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du dabigatran (Stangier et al., 2008). Chez des patients atteints d'insuffisance hépatique chronique et chez des patients présentant également une fibrillation auriculaire non valvulaire, les taux de saignement observés avec les AOD sont similaires à ceux observés avec d'autres anticoagulants tels que les AVK (8,4% pour les AOD contre 8,8% pour les AVK) ou les héparines de bas poids moléculaire (Steuber et al., 2019 ; Goriacho et Veltri, 2018). Actuellement, aucune donnée n'est disponible concernant la pharmacocinétique des AOD chez les patients atteints d'insuffisance hépatique sévère.

4.4. L'insuffisance rénale

L'impact d'une modification de la fonction rénale va dépendre de l'AOD considéré. Le dabigatran étant principalement éliminé sous forme inchangée dans les urines (~ 80%), il sera plus sensible à une insuffisance rénale. Après l'administration d'une dose unique de 150 mg par voie orale, l'ASC du dabigatran a augmenté d'un facteur 1,5, 3,2 et 6,3 chez des patients présentant respectivement une insuffisance légère ($Cl_{\text{créatinine}}$ entre 50 et 80 ml/min), modérée ($Cl_{\text{créatinine}}$ entre 30 et 50 ml/min) et sévère ($Cl_{\text{créatinine}} < 30$ ml/min) par rapport aux sujets ayant une fonction rénale normale. La demi-vie d'élimination a également été multipliée par deux (passant de 14h à 28h) en cas d'insuffisance rénale sévère (Stangier et al., 2010).

L'élimination rénale sous forme inchangée de l'apixaban, de l'edoxaban et du rivaroxaban étant plus faible, l'impact d'une insuffisance rénale est beaucoup moins marqué mais une accumulation reste possible. Aucune corrélation entre la valeur de la $Cl_{\text{créatinine}}$ et les concentrations plasmatiques d'edoxaban n'a été observée chez des patients atteints de fibrillation auriculaire non valvulaire (Testa et al, 2019). Concernant l'apixaban, les patients présentant une insuffisance rénale sévère ($Cl_{\text{créatinine}} = 15$ ml/min) ont montré une augmentation modérée de l'ASC (44%) de l'apixaban après l'administration orale d'une dose unique de 10 mg, mais aucune répercussion clinique n'a été observée (Chang et al., 2016). Enfin, la clairance rénale du rivaroxaban diminue avec la sévérité de l'insuffisance rénale, conduisant à une élévation de l'exposition plasmatique et donc des effets pharmacodynamiques du rivaroxaban. Après l'administration orale d'une dose unique de 10 mg, l'ASC était respectivement 1,44 à 1,64 fois plus élevée en cas d'insuffisance rénale légère à sévère que chez les sujets sains (Kubitza et al., 2010).

En conclusion, ce premier chapitre décrit les principales caractéristiques pharmacocinétiques d'une classe d'anticoagulants assez récente, les AOD. Bien que ces composés possèdent des structures chimiques et des profils pharmacocinétiques différents, ils partagent les principales sources de variabilité pharmacocinétique comme l'insuffisance rénale et les interactions médicamenteuses. Comparé aux AVK, les AOD présentent une nouvelle source de variabilité importante à prendre en compte : la prise en charge par les transporteurs membranaires tels que P-gp et BCRP. Afin de limiter les effets indésirables dus à une modification de cette prise en charge, il est essentiel de pouvoir étudier le transport des médicaments lors de leur développement. Le chapitre suivant abordera les différents systèmes disponibles pour étudier la prise en charge des médicaments par un transporteur membranaire et évaluer sa potentielle implication *in vivo*.

Chapitre 2 : Le rôle des transporteurs dans la pharmacologie des médicaments

La découverte de protéines se comportant comme des transporteurs membranaires de médicaments est un des éléments de compréhension des mécanismes de la réponse pharmacologique à un médicament. Certains de ces transporteurs ont un rôle important en pharmacologie de par leur capacité à transporter des médicaments et peuvent expliquer certaines variabilités pharmacocinétiques intra- et interindividuelles. La découverte des protéines de transport d'efflux est relativement récente puisque le premier représentant a été découvert en 1976 (Juliano et Ling, 1976). Depuis ces trente dernières années, l'étude du rôle de ces transporteurs d'efflux dans la prise en charge des médicaments et dans la résistance aux traitements a connu un réel essor, comme l'illustre l'augmentation du nombre de publications qui a été multiplié par dix entre 1990 et 2019 (Figure 16).

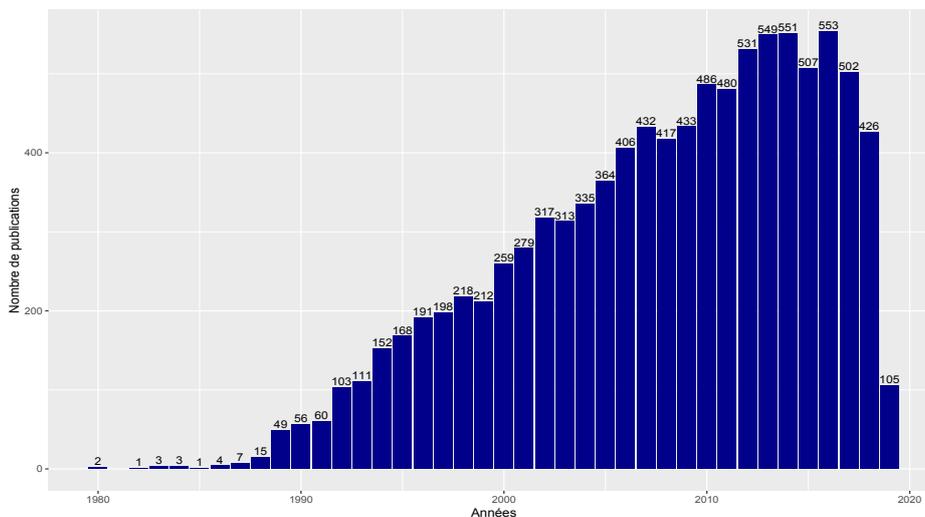


Figure 16. Évolution du nombre de publications au cours des quarante dernières années (Données issues de PubMed le 16 juin 2019)
Les mots-clés utilisés étaient « ABC transporters » et « drug ».

1. Généralités sur le passage des médicaments à travers les membranes cellulaires

Le passage des médicaments à travers la membrane cellulaire peut s'effectuer par des processus de transport passif ne nécessitant pas de dépense d'énergie, comme la diffusion

passive et la diffusion facilitée, ou par un transport actif utilisant l'énergie de l'hydrolyse d'un nucléotide triphosphate comme l'ATP (Figure 17).

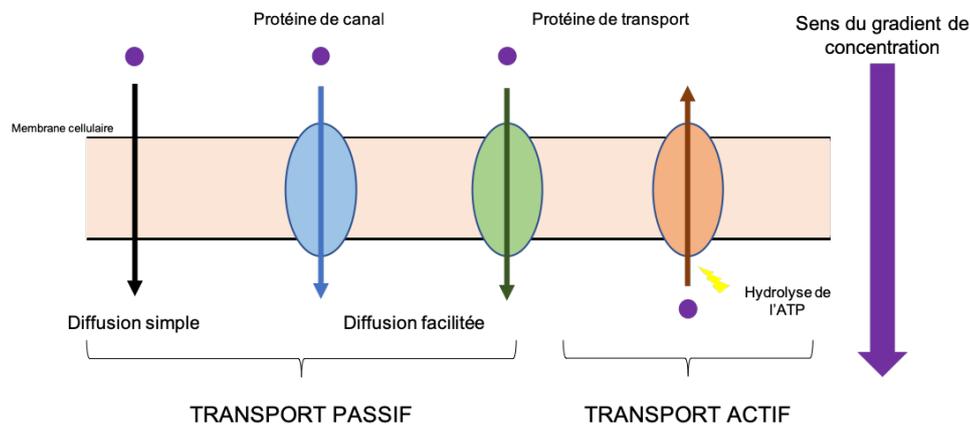


Figure 17. Schéma des différents types de transport à travers la membrane cellulaire

La diffusion passive d'une molécule à travers une membrane cellulaire s'effectue dans le sens du gradient de concentration, en suivant la première loi de Fick (Brodin et al., 2010). La vitesse de diffusion d'une molécule va donc dépendre de plusieurs paramètres : sa liposolubilité, sa taille, son degré d'ionisation, le gradient de concentration et la surface d'absorption. Ce type de transport passif a l'avantage d'être non saturable, non spécifique et donc non régulé, mais ce mécanisme est lent comparé à la diffusion facilitée. En effet, ce deuxième processus utilise également le gradient de concentration comme moteur du transport mais fait appel à des protéines de transport transmembranaires (canaux ioniques ou transporteurs) pour aider la molécule à traverser la membrane cellulaire. La diffusion facilitée est un phénomène saturable, spécifique et régulé.

Associé à ces mécanismes de transport passif, on observe également pour certaines molécules un transport actif. On distingue deux types de transport actif : le transport actif primaire qui utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour transporter les molécules contre leur gradient de concentration, et le transport actif secondaire qui implique l'utilisation d'un gradient électrochimique pour fonctionner en mode symport ou antiport.

La diffusion facilitée et le transport actif font appel à des protéines transmembranaires, appelées alors transporteurs. Ces protéines ont été découvertes relativement récemment et sont classées schématiquement en deux grandes classes : les transporteurs d'influx, aidant à la diffusion des molécules à travers les cellules, et les transporteurs d'efflux, qui par opposition

ont pour rôle de limiter la pénétration des molécules dans les cellules (Saurin et al., 1999). Ces derniers ont été découverts grâce aux études des cellules cancéreuses car ils sont en partie à l'origine de leur résistance aux traitements anticancéreux (Cole et Deeley, 2002). L'intérêt porté à ces protéines et à leur fonctionnement n'a cessé de croître car elles concernent une vaste gamme de composés comme les ions, les nutriments, les toxines mais également les xénobiotiques (Klein et al., 1999). De plus, ces transporteurs sont principalement exprimés au niveau des organes et tissus impliqués dans les processus d'absorption, distribution, métabolisme et d'élimination (ADME) des médicaments, comme l'intestin, le foie, le rein, la barrière hémato-encéphalique ou encore le placenta (Giacomini et al., 2010) (Figure 18).

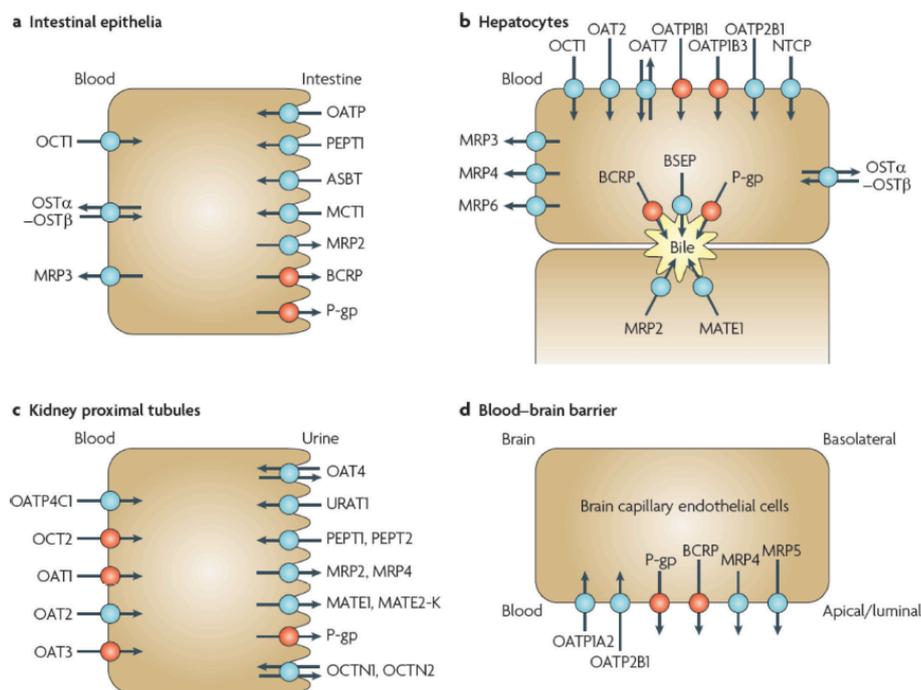


Figure 18. Localisation des transporteurs membranaires au niveau des différentes barrières de l'organisme (d'après Giacomini et al., 2010).

Les transporteurs colorés en rouge représentent ceux à étudier en priorité lors du développement d'un médicament.

De nombreux médicaments sont pris en charge par des transporteurs d'influx et/ou d'efflux au niveau de leur sites d'absorption et d'élimination. Ces transporteurs jouent donc un rôle important dans la pharmacocinétique des médicaments et leur modulation peut être une source de variabilité importante. Schématiquement, les transporteurs d'influx sont représentés par la superfamille des transporteurs « Solute Carrier » (SLC) et les transporteurs d'efflux par la superfamille des transporteurs « ATP-Binding Cassette » (ABC) (Giacomini et al., 2010).

2. La superfamille des transporteurs SLC

La superfamille des transporteurs SLC comprend 395 protéines transmembranaires classifiées en 52 familles en fonction du nombre d'hélices α transmembranaires (entre 10 et 14) et de la similitude de séquence (Lin et al., 2015). Ces protéines contrôlent l'absorption et le flux de divers solutés, y compris les médicaments, en permettant leur transport par diffusion facilitée ou par transport actif secondaire. Ces échangeurs peuvent fonctionner en mode uniport, symport ou antiport (Hediger et al., 2013). Les principales familles de transporteurs d'influx sont les « Organic Anion-Transporting Polypeptides » (OATP), les « Organic Anion Transporters » (OAT), les « Organic Cation Transporters » (OCT) et les « Peptides Transporters » (PEPT). Bien que les protéines SLC soient majoritairement des transporteurs d'influx, il existe une famille de transporteurs d'efflux, les « Multidrug And Toxin Extrusion proteins » (MATE).

2.1. La famille des OATP

2.1.1. Localisations et fonctions des transporteurs OATP

La famille des transporteurs OATP comprend 11 membres regroupés en six sous-familles (OATP1 à 6), codés par les gènes *SLC21/SLCO* (Hagenbuch et Meier, 2004). Parmi ces membres, quatre seulement sont importants pour le transport des médicaments. Tout d'abord, le transporteur OATP1A2, codé par le gène *SLCO1A2*, est exprimé à la membrane des cellules de l'épithélium intestinal et rénal et des cellules endothéliales vasculaires cérébrales (Figure 19).

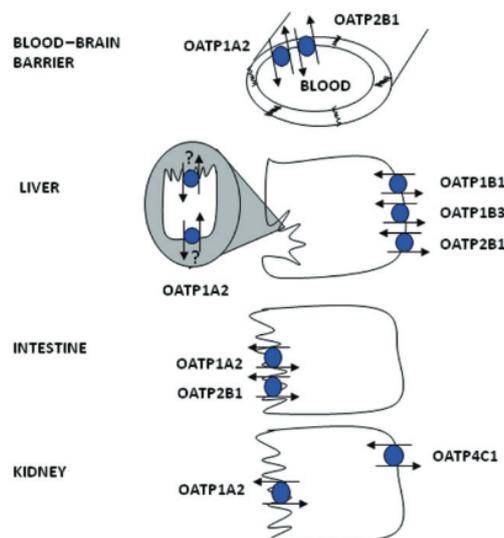


Figure 19. Localisation des protéines OATP dans les cellules épithéliales (d'après Roth et al., 2012)

Ensuite, les transporteurs OATP1B1 et OATP1B3, codés respectivement par les gènes *SLCO1B1* et *SLCO1B3*, sont fortement voire exclusivement exprimés sur les cellules hépatiques. Enfin, le transporteur OATP2B1, codé par le gène *SLCO2B1*, possède une expression ubiquitaire (König et al., 2013). Les transporteurs OATP partagent une gamme de substrats commune mais qui n'est pas identique pour tous. Ils prennent en charge des composés organiques amphiphiles incluant des substances endogènes comme les acides biliaires, les hormones thyroïdiennes et les métabolites conjugués d'hormones (Schwabedissen et al., 2011).

2.1.2. Rôles des OATP dans la variabilité pharmacocinétique des médicaments

Les protéines OATP transportent une grande variété de médicaments, comme les statines, les antibiotiques, les anticancéreux, les antihistaminiques et les diurétiques (Fahrmayr et al., 2010), expliquant leur important rôle dans la pharmacocinétique des médicaments. Plusieurs sources de variabilité pharmacocinétique ont été décrites pour les transporteurs OATP (Kalliokoski et Niemi, 2009).

Des interactions médicamenteuses ont été mises en évidence *in vitro* et *in vivo*, particulièrement pour la classe des statines. Par exemple, l'inhibition d'OATP1B1 et OATP1B3 par la ciclosporine A a conduit à une augmentation de l'exposition plasmatique de la pravastatine (Hedman et al., 2004) et de la rosuvastatine (Simonson et al., 2004) *in vivo* chez des patients transplantés et *in vitro* sur des ovocytes de *Xenopus* transfectés. De même, une augmentation de plus de 600% de l'aire sous la courbe (ASC) de l'atorvastatine a été observée chez des volontaires sains en cas de coadministration avec un autre inhibiteur, la rifampicine (Lau et al., 2007). C'est aussi le cas pour le bosentan, dont l'influx *in vitro* sur des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) exprimant OATP1B1 et OATP1B3 diminue en cas d'association avec la rifampicine, la ciclosporine A ou le sildénafil (Treiber et al., 2007), supposant un risque d'interaction *in vivo*.

Outre ces interactions médicamenteuses, il existe plusieurs polymorphismes génétiques fonctionnels pour OATP1B1 (Zair et al., 2008). Plus particulièrement, la mutation c.521T>C s'accompagne d'une activité réduite du transporteur *in vitro*. Nishizato et al. ont démontré que le génotype 521CC homozygote conduit à des concentrations plasmatiques de pravastatine plus élevées que chez les hétérozygotes 521T>C, conduisant à un risque largement supérieur de survenue d'effets indésirables de type myopathie (Nishizato et al., 2003).

2.2. La famille des OAT / OCT

2.2.1. Localisations et fonctions

La famille des OAT/OCT comprend 23 protéines transmembranaires codées par les gènes *SLC22* et est composée de transporteurs d'anions organiques (OAT), de cations organiques (OCT) et de zwitterion (OCTN). Parmi les transporteurs OAT, les principaux membres facilitant le transport des médicaments sont OAT1, OAT2, OAT3 et OAT4, codés respectivement par les gènes *SLC22A6*, *SLC22A7*, *SLC22A8* et *SLC22A11* (König et al., 2013). Ces protéines sont exprimées dans toutes les barrières de l'organisme, notamment au niveau du foie, de l'intestin et du rein (Nigam et al., 2015) (Figure 20).

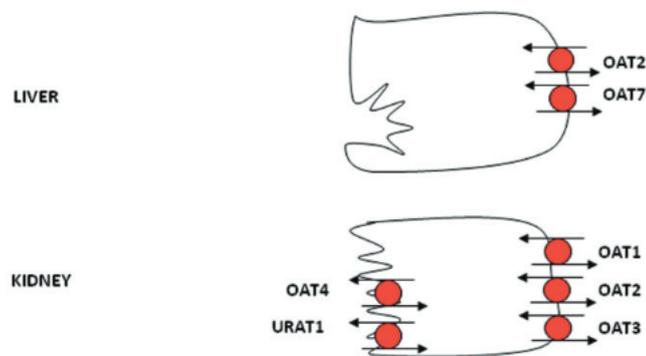


Figure 20. Localisation des protéines OAT dans les cellules hépatiques et rénales (d'après Roth et al., 2012)

Les transporteurs OCT particulièrement impliqués dans la prise en charge des médicaments sont OCT1, OCT2 et OCT3, codés par les gènes *SLC22A1*, *SLC22A2* et *SLC22A3*, respectivement (König et al., 2013). Comme les OAT, ils sont exprimés dans la plupart des tissus, particulièrement au niveau du rein, du foie et de l'intestin (Nishimura et Naito, 2005 ; Nies et al., 2009) (Figure 21).

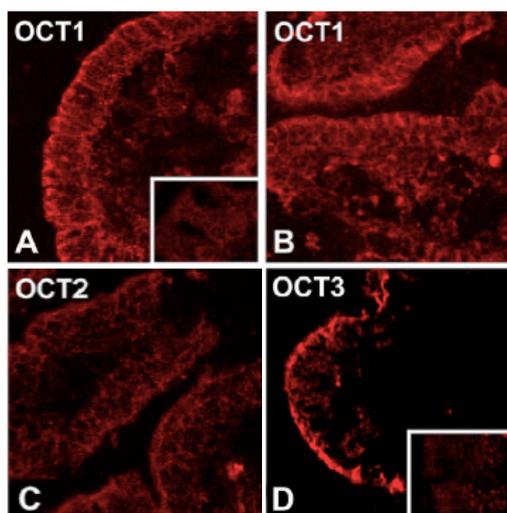


Figure 21. Expression et localisation des protéines OCT dans l'intestin grêle par immunofluorescence (d'après Müller et al., 2005)

Les différents membres de cette famille facilitent le transport de composés endogènes tels que des neurotransmetteurs, des hormones, des seconds messagers (par exemple le cGMP), les prostaglandines, des sels biliaires et des dérivés hormonaux (Koepsell et al., 2007 ; Nigam et al., 2015)

2.2.2. Implications des OAT dans la pharmacocinétique des médicaments

Les protéines OAT interagissent avec de nombreux médicaments, tels que les antihypertenseurs, les statines, les antibiotiques, les antiviraux, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, des anticancéreux et les antagonistes des récepteurs histaminiques de type 2 (Emami Riedmaier et al., 2012). Du fait de ce large spectre de substrats, il semble logique d'observer des interactions médicamenteuses. Actuellement, seuls OAT1 et OAT3 semblent impliqués dans des phénomènes d'interaction, ces deux protéines partageant une grande partie de leurs substrats. La coadministration de probénécide, un inhibiteur des OAT, provoque une diminution de la clairance rénale et une augmentation des concentrations plasmatiques et de la demi-vie d'élimination du furosémide et du méthotrexate *in vivo* (König et al., 2013). Le gemfibrozil, un autre inhibiteur, augmente les concentrations plasmatiques de sitagliptine (Arun et al., 2012) et inhibe *in vitro* la prise en charge de la pravastatine par OAT3 (Nakagomi-Hagihara et al., 2007).

De nombreuses mutations génétiques existent pour les protéines de la famille des OAT. Parmi les mutations d'OAT1, le variant 1361G>A conduit à une perte totale du transport du

méthotrexate mais n'affecte pas le transport de l'adéfovir (Fujita et al., 2005), contrairement au variant 149G>A qui est associé à une augmentation du transport de l'adéfovir, du cidofovir et du ténofovir (Bleasby et al., 2005). Plus de 12 mutations ont été décrits pour OAT3. Le variant 913A>T est associé à une diminution du transport du substrat endogène estrone-3-sulfate et à une augmentation du transport de la cimétidine. De même, les variants 445C>A, 779T>G et 715C>T sont associés à une altération du transport de la cimétidine (Erdman et al., 2006).

2.2.3. Implications des OCT dans la pharmacocinétique des médicaments

Parmi les molécules pharmacologiques interagissant avec les transporteurs OCT, environ vingt ont été caractérisées comme substrats, incluant les anticancéreux dérivés du platine, la cimétidine, la metformine, la quinidine, des antiviraux et des antirétroviraux (Nies et al., 2011). La protéine OCT2 est particulièrement impliquée dans le transport du cisplatine du sang vers les cellules du tubule rénal proximal, probablement à l'origine de la néphrotoxicité du cisplatine (Yonezawa et Inui, 2011). Chez la souris, l'association avec la cimétidine a permis de limiter la néphrotoxicité du cisplatine par inhibition du transport par OCT2. Cette association a pour effet de diminuer l'accumulation du cisplatine dans les cellules rénales, permettant ainsi de maintenir des doses plasmatiques élevées de cisplatine tout en limitant sa néphrotoxicité (Ciarimboli et al., 2005).

Les transporteurs OCT1 et OCT2 partagent de nombreux substrats et inhibiteurs avec les transporteurs MATE, comme la metformine et la cimétidine. Les interactions les concernant seront abordées plus loin dans le paragraphe des interactions avec les protéines MATE.

Plus de 200 mutations génétiques ont été identifiées pour la protéine OCT1 (Zair et al., 2008). Parmi elles, les variants 41C>T, 181C>T, 566C>T, 1203G>A, 1260delATG et 1393G>A sont associés à une diminution voire une perte de prise en charge de la metformine (Shu et al., 2007). Concernant les mutations d'OCT2, l'effet du variant 808G>T sur l'élimination rénale de metformine en présence de cimétidine a été étudié chez l'homme par Wang et al. Les individus possédant le génotype muté homozygote TT présentaient une diminution de 12,5% de la clairance rénale de la metformine en présence de cimétidine, contre une diminution de 26% et 42,4% chez les individus portant les génotypes GT et GG respectivement (Wang et al., 2008). Les homozygotes mutés TT sont donc beaucoup moins sensibles à l'inhibition par la cimétidine que le génotype sauvage GG. Ces observations ont également été retrouvées *in vitro* sur des cellules HEK transfectées (Zolk et al., 2009).

2.3. La famille des PEPT

2.3.1. Localisations et fonctions des PEPT

La famille des PEPT est constituée de protéines transmembranaires spécialisées dans le transport de dipeptides et tripeptides grâce à un gradient de proton. Deux membres de cette famille, PEPT1 et PEPT2, codés par les gènes *SLC15A1* et *SLC15A2* respectivement, ont été identifiés au niveau intestinal (PEPT1 uniquement) et rénal (Liu et al., 1995) (Figure 22), mais aussi au niveau pulmonaire (Groneberg et al., 2001).

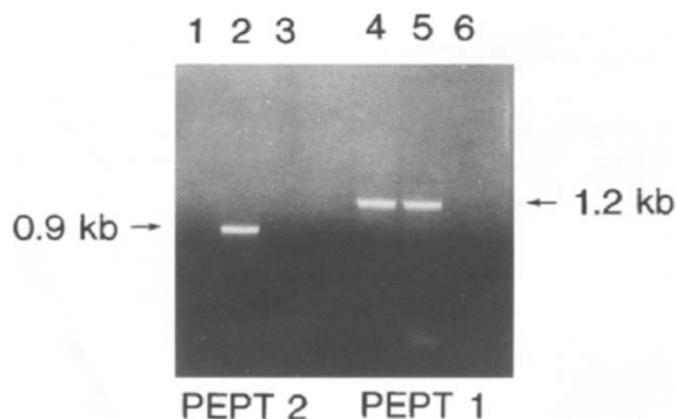


Figure 22. Expression de l'ARN de PEPT1 et PEPT2 dans l'intestin et le rein (d'après Liu et al., 1995). Les puits 1 et 4 correspondent à l'intestin et les puits 2 et 5 correspondent au rein. Les puits 3 et 6 sont des contrôles négatifs.

2.3.2. Implications des PEPT dans la pharmacocinétique des médicaments

Les PEPT permettent le transport de molécules dites « peptide-like », telles que certains antiviraux, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines (Rubio-Aliaga et Daniel, 2008). Au niveau intestinal, la protéine PEPT1 joue un rôle important dans l'absorption des bêta-lactamines. Bien que des interactions médicamenteuses n'aient pas encore été démontré *in vivo*, certains facteurs, comme un état pathologique ou des molécules pharmacologiques, peuvent moduler l'expression et la fonctionnalité de ce transporteur (Adibi, 2003). Par exemple, la clonidine, un agoniste des récepteurs adrénergiques α_2 , est capable de multiplier par deux l'absorption d'un antibiotique de la classe des bêta-lactamines par stimulation de la translocation du transporteur à la membrane des cellules (Berlioz et al., 2000). Au contraire, des agents immunosuppresseurs tels que le tacrolimus et la ciclosporine A diminuent l'activité du transporteur PEPT1 (Motohashi et al., 2001).

A ce jour, 40 mutations génétiques ont été identifiées pour PEPT1, mais seulement deux ont conduit à une diminution du transport du substrat glycyl-sarcosine, soit par une expression plus faible de la protéine variante (Zhang et al., 2004), soit par une diminution de l'affinité du transporteur pour les dipeptides (Anderle, 2006). Actuellement, aucune étude *in vivo* n'a montré une implication cliniquement significative de ces variations génétiques sur la pharmacocinétique des médicaments.

2.4. La famille des transporteurs MATE

2.4.1. Localisations et fonctions des transporteurs MATE

La famille des transporteurs MATE est composée de seulement deux membres, MATE1 et MATE2-K, codées respectivement par les gènes *SLC47A1* et *SLC47A2* situés sur le chromosome 17 (Otsuka et al., 2005 ; Masuda et al., 2006). Ces deux protéines transmembranaires sont exprimées au pôle luminal des cellules épithéliales rénales (Masuda et al., 2006), avec une localisation également dans le muscle et au niveau du pôle canaliculaire des hépatocytes pour MATE1 (Otsuka et al., 2005) (Figure 23).

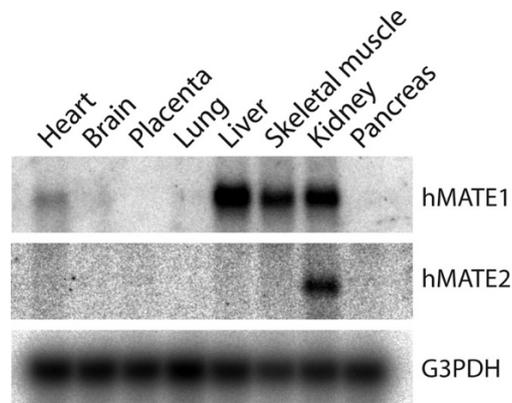


Figure 23. Expression de MATE1 et MATE2-K dans les tissus humains par northern blot (d'après Otsuka et al., 2005)

Bien que faisant partie de la superfamille des transporteurs SLC, les protéines MATE constituent des transporteurs d'efflux de par leur localisation au pôle apical des barrières impliquées dans l'élimination des médicaments. Elles possèdent toutes les deux les mêmes substrats endogènes comme la guanidine, la thiamine et la créatinine (Damme et al., 2011).

2.4.2. Rôles des MATE dans la pharmacocinétique des médicaments

A ce jour, plus de trente médicaments ont été identifiés comme substrats ou inhibiteurs des protéines MATE, parmi lesquels la cimétidine, la metformine, l'aciclovir, le topotécan et l'oxaliplatine (Damme et al., 2011). La metformine représente le substrat le plus utilisé dans les études d'interactions. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs des protéines MATE1 et MATE2-K provoque une augmentation des concentrations de metformine par diminution de son élimination biliaire et de sa clairance rénale. Ces effets ont été observés *in vivo* avec la cimétidine (Ito et al., 2012), les inhibiteurs de tyrosine kinase (Minematsu et Giacomini, 2011) ou encore la pyriméthamine (Kusuhara et al., 2011).

Bien que peu étudiées, plusieurs mutations génétiques ont été identifiées pour MATE1 et MATE2-K (Kajiwara et al., 2009 ; Chen et al., 2009). Douze des treize variants étudiés *in vitro* par Kajiwara et al. ont pour conséquence une diminution de l'activité des transporteurs MATE, notamment par diminution de leur expression membranaire (Kajiwara et al., 2009). Ces mutations peuvent donc jouer un rôle important dans les étapes d'élimination des substrats des transporteurs MATE.

3. La superfamille des transporteurs ABC

La superfamille des transporteurs ABC est constituée de sept familles (A à G) et comprend au total 48 protéines transmembranaires identifiées chez l'homme. Ces pompes d'efflux utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour effluer leurs substrats contre leur gradient de concentration, diminuant ainsi leur concentration intracellulaire. En plus de leur implication dans la pharmacocinétique de nombreux médicaments, pouvant être à l'origine d'interactions médicamenteuses (IM), les transporteurs ABC participent souvent aux phénomènes de résistance pharmacologique, notamment avec les anticancéreux (Declèves et Legrand, 2008). A ce jour, les transporteurs ABC les plus décrits sont la Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1) ou P-glycoprotéine (P-gp), la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) et les Multidrug Resistance-associated Proteins (MRPs).

3.1. La P-glycoprotéine

3.1.1. Structure, localisation et fonction

La P-gp est une glycoprotéine phosphorylée transmembranaire de 170 kDa, codée par le gène *ABCB1* situé sur le chromosome 7. Elle a été découverte en 1976 par Juliano et Ling sur des cellules CHO (cellules ovariennes de hamster chinois) résistantes à la colchicine (Juliano et Ling, 1976). Elle est constituée de deux domaines intracellulaires permettant la liaison à l'ATP (domaines NBD) et de deux domaines transmembranaires comprenant chacun six hélices α qui s'assemblent pour former un pore pour le passage des composés (Schinkel et Jonker, 2003) (Figure 24). Ces domaines transmembranaires contiennent aussi les résidus responsables de la spécificité de reconnaissance des substrats.

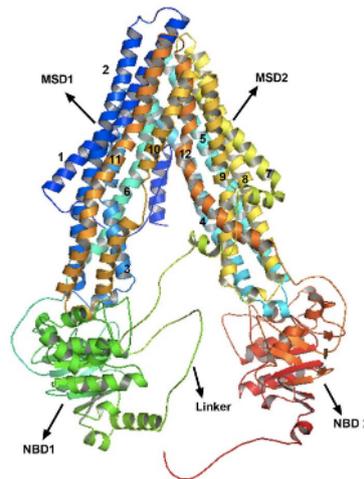


Figure 24. Structure tridimensionnelle de la P-glycoprotéine (d'après Syed et al., 2017).

La P-gp est constituée de deux domaines transmembranaires (MSD) et de deux domaines intracellulaires (NBD).

La P-gp a été localisée dans de nombreux tissus sains, notamment au niveau des barrières physiologiques impliquées dans la pharmacocinétique des médicaments, comme par exemple l'intestin, le foie, les reins et la barrière hémato-encéphalique (Canaparo et al., 2007 ; Thiebaut et al., 1987). Elle est exprimée au pôle apical des cellules (Figure 25) et joue un rôle de protecteur cellulaire en limitant l'accumulation intracellulaire des composés exogènes. La P-gp possède une spécificité de substrat extrêmement large, avec une tendance pour les substances lipophiles et cationiques.

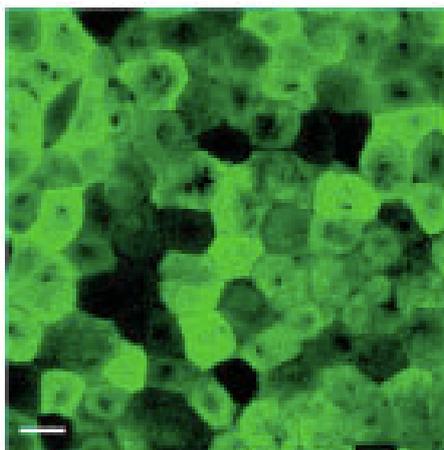


Figure 25. Expression et localisation apicale de la P-gp sur des cellules Caco-2 (d'après Belliard et al., 2004)
P-gp est marquée en vert au niveau apical des cellules. Barre d'échelle = 20 μ m.

3.1.2. Implications de P-gp en pharmacologie

La liste des médicaments substrats et/ou inhibiteurs de P-gp ne cesse de croître, incluant notamment des anticancéreux, des antibiotiques/antiviraux, des immunosuppresseurs ou encore des antiarythmiques (Schinkel et Jonker, 2003 ; Chan et al., 2004). Une liste non exhaustive des substrats, inhibiteurs et inducteurs identifiés et reconnus par la Food and Drug Administration (FDA) est illustrée par la Table 2.

Cette grande variété de substrats et d'inhibiteurs est à l'origine de nombreuses interactions médicamenteuses cliniquement pertinentes. Ceci explique le fait que la FDA recommande depuis quelques années l'évaluation systématique de l'implication de la P-gp dans la prise en charge d'une molécule lors de son développement (FDA, 2012).

Table 2. Liste non exhaustive de substrats, inhibiteurs et inducteurs de la P-gp, d'après la FDA (FDA, 2012).

Classes thérapeutiques	Substrats	Inhibiteurs	Inducteurs
Antiarythmiques	Digoxine	Amiodarone, dronédarone, propafénone	-
Antibiotiques	-	Azithromycine, clarithromycine, érythromycine	Rifampicine
Anticancéreux	Topotécan, vinblastine	-	-
Antidiabétiques	Saxagliptine, sitagliptine	-	-
Antidiarrhéique	Lopéramide	-	-
Antiépileptiques	-	-	Carbamazépine, phénytoïne
Antifongiques	Posaconazole	Itraconazole, kétoconazole	-
Antigoutteux	Colchicine	-	-
Antihistaminiques	Fexofénadine	-	-
Antihypertenseurs	Aliskiren, ambrisentan	Captopril, diltiazem, félodipine, vérapamil	-
Antithrombotiques	Dabigatran étéxilate	Ticagrelor	-
Antirétroviraux	Maraviroc	Lopinavir, ritonavir, saquinavir, tipranavir	-
Antiviraux	-	Télaprévir	-
Bétabloquants	Talinolol	carvédilol	-
Diurétique	Tolvaptan	-	-
Immunosuppresseurs	Évérolimus, sirolimus	Ciclosporine, tacrolimus	-
Inhibiteurs de tyrosine kinase	Imatinib, lapatinib, nilotinib	Lapatinib	-
Normolipémiant	-	-	Avasimibe,
Autres	Quinidine, ranolazine	Zosuquidar, quercétine, quinidine, ranolazine	Millepertuis

Le substrat le plus connu et le plus étudié dans les interactions avec la P-gp est la digoxine car elle a l'avantage de ne pas être métabolisée par les cytochromes P450 (Lacarelle et al., 1991). Plusieurs études chez l'homme ont rapporté une diminution de l'exposition à la digoxine en présence de rifampicine, un inducteur de P-gp (Greiner et al., 1999) (Figure 26), ou au contraire une augmentation de son exposition en présence d'inhibiteurs comme la clarithromycine (Tanaka et al., 2003) ou le ritonavir (Ding et al., 2004 ; Penzak et al., 2004).

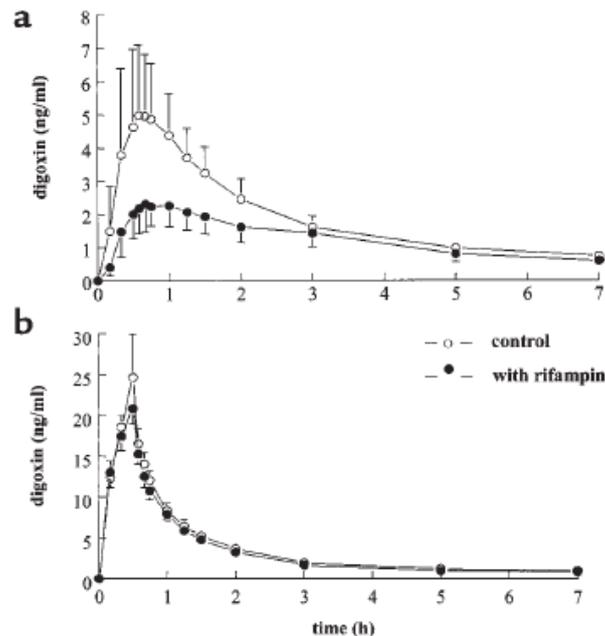


Figure 26. Effet d'une coadministration de rifampicine sur la concentration plasmatique de digoxine administrée par voie orale (a) ou injectable (b) (d'après Greiner et al., 1999)

Greiner et al. ont montré que l'administration concomitante de rifampicine et de digoxine par voie orale conduisait à une diminution de la biodisponibilité de la digoxine (passant de 63% à 44%). L'absence d'effet lors d'une administration par voie injectable suggère que cette diminution est due à une augmentation de l'expression de la P-gp au niveau intestinal. Les répercussions cliniques de l'inhibition ou de l'induction de la P-gp sont d'autant plus importantes que les molécules concernées ont une faible biodisponibilité orale ou un index thérapeutique étroit. Enfin, les inhibiteurs de P-gp étant également pour la plupart des inhibiteurs des cytochromes P450, des interactions liées au métabolisme peuvent aussi être associées à celles liées au transport par la P-gp.

Bien que beaucoup de mutations de P-gp aient été identifiées, seul l'impact de trois polymorphismes génétiques, 1236C>T, 2677G>T/A et 3435C>T a été bien étudié. La

fréquence de distribution de ces variants est hautement dépendante de l'origine des populations (Table 3).

Table 3. Liste et fréquence des variants de P-gp dans trois populations ethniques (d'après Ieiri, 2012)

gene	variant	dbSNP ID	AA substitution	frequency		
				Asian	European	African
<i>ABCB1</i>	-1517aT>C	rs28381796		0.047-0.081	0	0
	-1459aG>A	rs12720464		0.186-0.329	0	0-0.027
	-1132a CCATC>del			0.037	0	ND
	-1017aT>C	rs28746504		0.062	0.045	0.1-0.167
	-824a T>C			0.005	0	ND
	-42a A>G	rs57806198		0.106	0	ND
	-145C>G	rs34976462		0.032	0	ND
	-129T>C	rs3213619		0.047-0.081	0.031-0.062	0.043-0.167
	61A>G		21Asn>Asp	0-0.017	0.08	0.025
	1199G>A	rs2229109	400Ser>Asn	0	0.021-0.2	0
	1236T>C	rs1128503		0.312-0.333	0.523-0.614	0.750-1
	2677G>T	rs2032582	893Ala>Ser	0.522-0.616	0.339-0.469	0-0.077
	2677G>A		893Ala>Thr	0.152	0.042	0.021
	2956A>G		986Met>Val	0.005	ND	ND
	3421T>A		1141Ser>Thr	0	0	0.111
	3435C>T	rs1045642		0.375-0.523	0.468-0.625	0-0.208

AA: amino acid, ND: no data

Le variant 3435C>T a été associé à une diminution de l'expression intestinale de P-gp chez les homozygotes TT, entraînant des concentrations plasmatiques plus élevées de digoxine après une administration orale comparé aux homozygotes CC (Hoffmeyer et al., 2000 ; Kurata et al., 2002). Cependant, ces observations ne concordent pas avec d'autres études utilisant les mêmes substrats et les mêmes populations. En effet, d'autres équipes ont à l'inverse rapporté que l'ASC de la digoxine tendait à être plus faible chez les homozygotes TT que chez les homozygotes CC (Sakaeda et al., 2001 ; Kim et al., 2001). Bien que la ciclosporine, comme la digoxine, soit un bon substrat pour étudier la P-gp, les résultats varient quant aux effets des mutations 3435C>T et 2677G>T/A sur sa pharmacocinétique (Ieiri, 2012). Dans leur méta-analyse, Jiang et al. n'ont pas réussi à définir clairement l'impact du variant 3435C>T sur la pharmacocinétique de la ciclosporine (Jiang et al., 2008). De plus, il a été montré que les trois principaux polymorphismes de P-gp (1236C>T, 2677G>T et 3435C>T) n'affectent pas le transport du vérapamil par P-gp au niveau de la BHE (Takano et al., 2006). Toutes ces études suggèrent que, s'il y a une modification de l'activité de P-gp liée aux polymorphismes, celle-ci semble très faible.

3.2. La Breast Cancer Resistance Protein

3.2.1. Structure, localisation et fonction

La BCRP est une protéine transmembranaire de 72 kDa codée par le gène *ABCG2*, situé sur le chromosome 4. Sa structure ne comprenant qu'un seul domaine transmembranaire, elle est qualifiée de demi-transporteur (Schinkel et Jonker, 2003). De ce fait, ce transporteur peut fonctionner sous forme d'homodimère ou de tétramère par formation de ponts disulfures (Xu et al., 2004) (Figure 27).

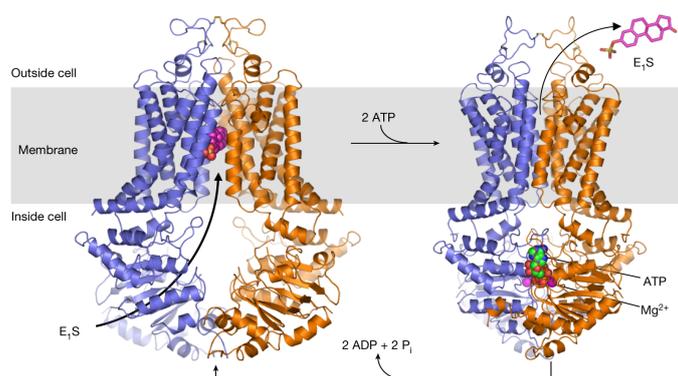


Figure 27. Structure tridimensionnelle d'un homodimère de la protéine BCRP (d'après Manolaridis et al., 2018)

La protéine BCRP est constituée d'un seul domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire. Les monomères sont colorés en bleu et en orange.

Comme la P-gp, elle est localisée au niveau apical des epithelia et endothelia impliqués dans la pharmacocinétique des médicaments (Maliepaard et al., 2001). BCRP est fortement exprimée dans le placenta, l'intestin grêle, le côlon et le foie, mais très peu au niveau du rein (Doyle et Ross, 2003) (Figure 28).

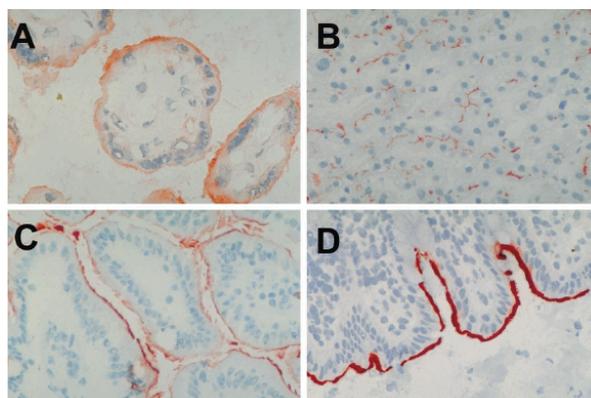


Figure 28. Localisation de la protéine BCRP dans le placenta (A), le foie (B), l'intestin grêle (C) et le côlon (D) (d'après Maliepaard et al., 2001).

BCRP est localisée en rouge au niveau apical des cellules du placenta (A), de l'intestin grêle (C) et du côlon (D), et au pôle canaliculaire des hépatocytes (B).

Elle prend en charge une large gamme de substrats, reconnaissant des molécules de charge négative ou positive, des anions organiques et des conjugués sulfatés (Staud et Pavék, 2005). Bien que BCRP possède sa propre gamme de spécificité, elle est aussi impliquée dans l'efflux de nombreux substrats de P-gp (Sharom et al., 2008).

3.2.2. Implications de BCRP en pharmacologie

La protéine BCRP possède une large gamme de plus 200 substrats, recouvrant en partie celle de P-gp et de MRP1. De plus, de nombreux inhibiteurs de P-gp sont aussi d'excellents inhibiteurs de BCRP (Mao et Unadkat, 2015). Ce large spectre de substrats et d'inhibiteurs favorise la survenue d'interactions médicamenteuses. La Table 4 présente quelques exemples de substrats et d'inhibiteurs de BCRP.

Table 4. Liste non exhaustive de substrats et inhibiteurs de BCRP, d'après la FDA (FDA, 2012).

Classes thérapeutiques	Substrats	Inhibiteurs
Anticancéreux	Irinotécan, méthotrexate, mitoxantrone, topotécan	-
Antihypertenseurs	Prazosine,	-
Anti-inflammatoires	Sulfasalazine	-
Facteur de croissance hématopoïétique	-	Eltrombopag
Immunosuppresseurs	-	Ciclosporine
Inhibiteurs de tyrosine kinase	Imatinib, lapatinib	Géfitinib
Myorelaxant	Dantrolène	-
Normolipémiants	Rosuvastatine	-
Autres	-	Curcumine, élacridar (GF120918)

Malgré un intérêt plus récent pour le transporteur BCRP, son implication dans les phénomènes de résistance et les interactions médicamenteuses semble aussi importante que pour la P-gp. Par exemple, une interaction entre le topotécan et des inhibiteurs de BCRP tels que le géfitinib ou l'élacridar a abouti à une augmentation de la biodisponibilité du topotécan (Nakamura et al., 2005 ; Kruijtzter et al., 2002). En effet l'élacridar, un inhibiteur puissant de BCRP et de P-gp, a augmenté la biodisponibilité orale du topotécan de 40 à 97% chez huit

patients et l'ASC plasmatique a augmenté de façon significative, passant d'environ 32 à 78 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ (Kruijtzter et al., 2002) (Figure 29). Le topotécan étant un substrat sélectif de BCRP avec une faible affinité pour P-gp, ces résultats suggèrent que l'interaction est liée à l'inhibition de BCRP au niveau intestinal.

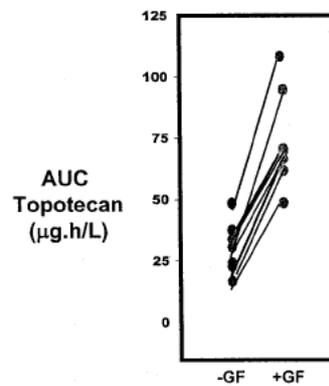


Figure 29. Augmentation de l'ASC du topotécan après une prise orale en présence d'élacridar chez huit patients (d'après Kruijtzter et al., 2002)

Plus de 80 mutations ont été relevées pour la protéine BCRP (Mao et Unadkat, 2015). Le polymorphisme 421C>A est le plus étudié en raison de sa fréquence élevée, avec une différence ethnique notable (asiatiques : 29%-36%, européens : 4,5%-12%, africains : 0%-2,3%) (Ieiri, 2012). Il est associé à une plus faible expression de BCRP au niveau membranaire, exposant donc à une diminution de l'efflux (Imai et al., 2002). Chez l'homme, ce variant est responsable d'une augmentation des concentrations plasmatiques de topotécan (Sparreboom et al., 2005), rosuvastatine (Keskitalo et al., 2009) et sulfasalazine (Yamasaki et al., 2008), suggérant une augmentation de la biodisponibilité de ces médicaments. Cependant, beaucoup d'autres études basées sur l'utilisation d'autres substrats n'ont montré aucune différence significative de la pharmacocinétique de ces médicaments (Bruhn et Cascorbi, 2014). On peut donc supposer que l'effet de ce polymorphisme sur la pharmacocinétique des médicaments dépend donc majoritairement du substrat. Un autre polymorphisme bien connu, le 34G>A, agit sur la pharmacocinétique des inhibiteurs de tyrosine kinase mais semble avoir une faible pertinence clinique (Bruhn et Cascorbi, 2014).

3.3. Les transporteurs MRP

3.3.1. Structures, localisations et fonctions

Les transporteurs MRP sont représentés par 9 protéines transmembranaires (MRP1 à 9) codées par les gènes *ABCC1-6* et *ABCC10-12*. En fonction de leurs isoformes, les transporteurs MRP présentent des structures différentes avec deux ou trois domaines transmembranaires (Schinkel et Jonker, 2003) (Figure 30).

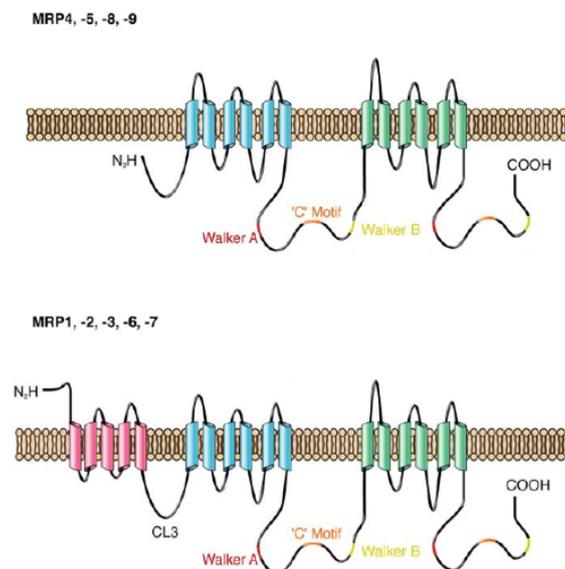


Figure 30. Structure des protéines MRP (d'après Deeley et al., 2006).

Les protéines MRP1, 2, 3, 6 et 7 sont constituées de trois domaines transmembranaires alors que MRP4, 5, 8 et 9 possèdent deux domaines transmembranaires. Toutes les MRP possèdent deux domaines intracellulaires.

L'expression des différents isoformes des protéines MRP dépend des tissus, de même que leur localisation cellulaire (Borst et al., 2000 ; Schinkel et Jonker, 2003) (Table 5).

Table 5. Localisation et distribution des MRP1 à 5 (d'après Schinkel et Jonker, 2003 ; Borst et al., 2007).

Protéine	Localisation cellulaire	Distribution tissulaire
MRP1	Basolatérale	Ubiquitaire
MRP2	Apicale	Foie, rein, intestin, placenta
MRP3	Basolatérale	Foie, intestin, pancréas, rein, rate, glandes surrénales
MRP4	Apicale / Basolatérale	Rein, foie, poumon, glandes surrénales, BHE, intestin, pancréas / Prostate
MRP5	Basolatérale	Ubiquitaire (<i>a priori</i>)

Les conséquences d'une inhibition ou d'une induction de ces transporteurs va donc dépendre de leur localisation au niveau cellulaire. En effet, les protéines MRP2 et MRP4, situées au pôle apical, vont jouer un rôle particulièrement important dans la sécrétion tubulaire des médicaments en favorisant leur passage dans l'urine. Au niveau intestinal, ces transporteurs auront tendance à limiter l'absorption des médicaments en les effluant dans la lumière intestinale. Une inhibition de MRP2 ou MRP4 engendrera donc une augmentation des concentrations plasmatiques des médicaments pouvant mener à un surdosage. A l'inverse, les protéines MRP1, MRP3 et MRP5, situées au pôle basolatéral des cellules (Figure 31), vont faciliter le transport des médicaments de la lumière intestinale vers le sang et limiter leur élimination au niveau rénal. Leur inhibition pourra conduire à une diminution des concentrations plasmatiques des médicaments substrats, soit par diminution de l'absorption, soit par augmentation de l'élimination.

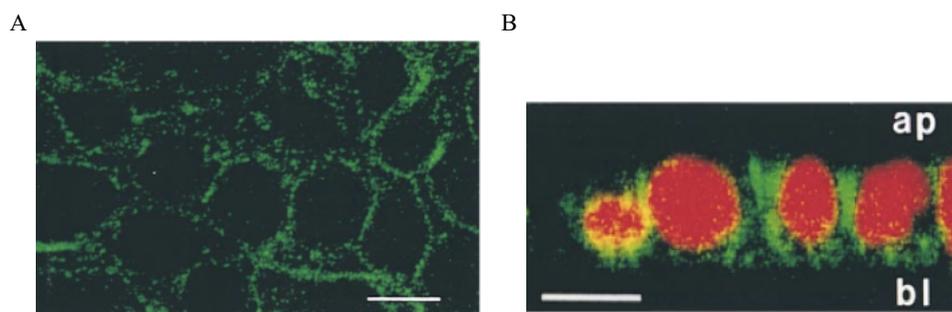


Figure 31. Localisation de MRP1 dans des cellules de cryptes intestinales (d'après Peng et al., 1999). MRP1 est détectée en vert au niveau basolatéral des cellules et les noyaux sont colorés en rouge. Barre d'échelle = 20 μ m, ap=apical, bl=basolatéral.

Les transporteurs MRP sont principalement impliqués dans la prise en charge d'anions organiques, ainsi que de substrats sulfoconjugués, glucuronoconjugués ou conjugués au glutathion (Schinkel et Jonker, 2003).

3.3.2. Implications des MRP en pharmacologie

A l'image des précédents transporteurs ABC, les protéines MRP possèdent de nombreux substrats, plus particulièrement les anticancéreux. Des exemples de substrats et inhibiteurs des protéines MRP sont répertoriés dans la Table 6.

Table 6. Liste non exhaustive de substrats et inhibiteurs des MRP (d'après Schinkel et Jonker, 2003 et Giacomini et al., 2010).

Classes thérapeutiques	Substrats	Inhibiteurs
Anticancéreux	Doxorubicine, étoposide, irinotécan, méthotrexate, mitoxantrone, SN-38, topotécan, vinblastine, vincristine	-
Antihistaminiques	Féxofénadine	-
Antihypertenseurs	Olmésartan, valsartan	-
Antigoutteux	-	Probénécide
Anti-inflammatoires	-	Diclofénac
Antirétroviraux	Ténofovir	Délavirdine, éfavirenz, emtricitabine
Antiviraux	Adéfovir	-
Diurétique	Furosémide	-
Immunosuppresseur	-	Ciclosporine

Comme pour P-gp et BCRP, les protéines MRP sont impliquées dans la pharmacocinétique et la toxicité des médicaments et sont donc une source potentielle d'interactions médicamenteuses. *In vitro*, l'inhibition de MRP2 et MRP4 par des anti-inflammatoires non stéroïdiens a été associée à une diminution de l'efflux du méthotrexate, suggérant une probable diminution de sa clairance rénale *in vivo* (El-Sheikh et al., 2007). Au niveau intestinal, l'indométacine inhibe MRP2 et augmente par conséquent l'absorption de la sulfasalazine *in vitro* et *in vivo* (Dahan et Amidon, 2010). Ces deux molécules étant co-prescrites dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, il est important de connaître les potentielles interactions.

De plus, des variations génétiques associées à une perte de fonction de MRP2 ont un impact sur l'exposition des certains médicaments comme le méthotrexate. Parmi les polymorphismes les plus étudiés, on retrouve le 24C>T qui est associé *in vivo* à une augmentation de l'exposition au méthotrexate (Rau et al., 2006) mais aussi à l'acide mycophénolique (Lévesque et al., 2008). Un deuxième polymorphisme, le 1249G>A, semble également jouer un rôle dans la pharmacocinétique de certains médicaments comme la carbamazépine, en limitant son passage à travers la BHE (Kim et al., 2010). L'impact clinique des polymorphismes génétiques de MRP2 paraît être dépendant du tissu et du substrat considérés.

En conclusion, ce deuxième chapitre décrit les différentes familles de transporteurs membranaires impliqués dans l'influx et l'efflux des médicaments. Ces transporteurs jouent un rôle clé dans les différentes étapes de la pharmacocinétique d'un médicament, et l'existence de polymorphismes génétiques ainsi que d'interactions médicamenteuses en font une importante source de variabilité. Afin de limiter les effets indésirables dus à une modification de cette prise en charge, il est essentiel de pouvoir étudier le transport des médicaments lors de leur développement. Le chapitre suivant abordera les différents systèmes disponibles pour étudier la prise en charge des médicaments par un transporteur membranaire et évaluer sa potentielle implication *in vivo*.

Chapitre 3 : Les modèles d'étude des transporteurs membranaires des médicaments

Lors du développement d'un médicament, on peut distinguer deux étapes clés. La première représente la phase préclinique, qui permet notamment d'évaluer différents paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'un médicament sur des modèles *in vitro* (par exemple des cultures cellulaires) et dans des modèles *in vivo* animaux. La seconde étape consiste en la phase clinique, qui correspond au passage chez l'homme, afin de tester le médicament chez des personnes saines puis des malades.

1. Les modèles d'étude *in vitro* des transporteurs

Les modèles d'études *in vitro* sont de plus en plus utilisés au cours du développement des médicaments en complément ou comme alternative des modèles animaux. Ces modèles *in vitro* sont d'autant plus intéressants qu'ils contribuent au respect du principe des 3R intégré dans le renforcement de l'éthique de l'expérimentation animale. En effet, ces modèles sont des outils incontournables par leur facilité de mise en œuvre, leur faible coût, l'existence de cellules humaines, leur bonne reproductibilité due à la maîtrise des conditions de culture et l'existence d'une corrélation *in vitro* – *in vivo* pour certains (Lennernäs et al., 1996 ; Mathias et al., 2002). Chaque système *in vitro* possède ses avantages et ses limites. De nombreux modèles cellulaires *in vitro* de barrière cellulaire intestinale, hépatique, rénale ou pulmonaire, ont été développés pour prédire l'absorption des médicaments à travers les diverses barrières de l'organisme (Sarmiento et al., 2012). De plus, ils comblent les limites des modèles animaux en offrant la possibilité d'étudier indépendamment les différents transporteurs et de s'affranchir des différences inter-espèces. Dans le but d'étudier en particulier le transport des médicaments, les modèles *in vitro* doivent présenter certains critères pharmacologiques de barrière épithéliale.

1.1. Les critères d'un bon modèle pharmacologique de barrière *in vitro*

Un bon modèle pharmacologique de barrière épithéliale *in vitro* doit présenter des caractéristiques essentielles inhérentes à la nature de l'épithélium *in vivo* considéré, telles que certaines caractéristiques histologiques morpho-fonctionnelles (présence de mucus, polarisation des cellules, microvillosités, ...) et posséder une certaine étanchéité qui peut être

évaluée par plusieurs techniques comme par exemple la mesure de la résistance électrique transépithéliale. De plus, il doit exprimer les protéines de jonctions intercellulaires et les différents transporteurs membranaires. La présence et la localisation des protéines de jonction et des transporteurs peut être évaluée par diverses techniques comme le western blot, le whole cell ELISA, la microscopie à fluorescence et la spectrométrie de masse (ces techniques seront abordées en détail dans le chapitre suivant).

1.1.1. L'étanchéité de la barrière

Pour étudier la prise en charge de molécules par des protéines de transport, les molécules doivent diffuser au travers des cellules, il est donc important de disposer d'un modèle ne laissant pas passer les molécules entre les cellules. L'étanchéité d'un modèle cellulaire de barrière est évaluée par deux techniques complémentaires : la mesure de la résistance électrique transépithéliale et la mesure de la perméabilité paracellulaire.

La mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) permet d'estimer l'intégrité d'un modèle *in vitro* de barrière de manière non-invasive. La TEER mesurée de part et d'autre de la couche cellulaire est le reflet de la perméabilité des ions au niveau des espaces intercellulaires (Srinivasan et al., 2015). Les barrières développent ainsi une résistance d'autant plus forte que la perméabilité aux ions est faible. Plusieurs techniques de mesure de la TEER existent, comme par exemple l'utilisation de deux électrodes disposées de part et d'autre de la couche cellulaire et reliées à un ohmmètre. La résistance est déterminée en appliquant une tension aux électrodes et en mesurant le courant résultant, puis en soustrayant la résistance due au support sans cellules. Cette résistance doit être multipliée par la surface de la couche cellulaire pour obtenir la résistance effective de la barrière.

Cependant, les valeurs de TEER mesurées peuvent fortement varier d'une étude à l'autre sur un même modèle. En effet, la TEER est sensible à de nombreux facteurs comme la composition du milieu de culture, la température, la technique de mesure ou encore la position des électrodes (Srinivasan et al., 2015). Afin de s'assurer de la bonne étanchéité d'un modèle il est nécessaire de compléter cette mesure de la TEER par une mesure de la perméabilité paracellulaire.

La perméabilité paracellulaire permet également d'évaluer l'étanchéité d'un modèle et notamment la présence des complexes de jonctions serrées. Elle repose sur la diffusion passive

d'une molécule d'un compartiment apical vers un compartiment basal suivant son gradient de concentration (Figure 32). Il en résulte une perméabilité apparente qui est calculée selon l'équation suivante :

$$P_{app} = \frac{C_f \times V}{\Delta t \times S \times C_0} \quad (\text{Equation 1})$$

où C_f est la concentration finale du composé dans le compartiment basal, V est le volume du compartiment basal, Δt est le temps d'incubation, S est la surface de la couche cellulaire et C_0 est la concentration initiale du composé dans le compartiment apical.

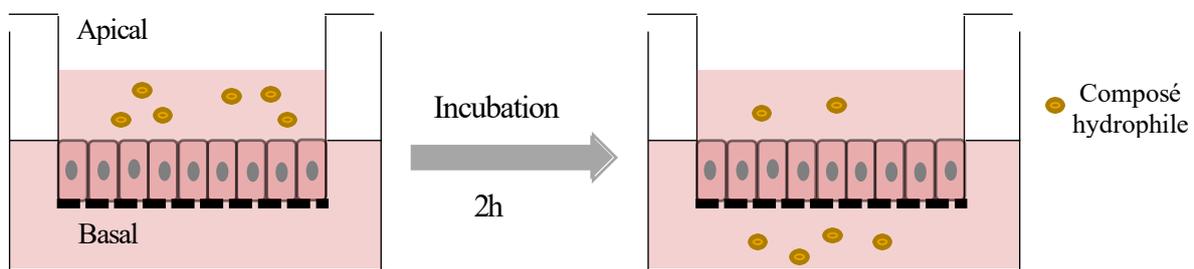


Figure 32. Représentation schématique d'une étude de la perméabilité paracellulaire d'une molécule hydrophile sur un modèle cellulaire de barrière

La quantification de cette perméabilité paracellulaire s'effectue grâce à des petites molécules hydrophiles de référence, qui ne sont substrats ni de transporteurs, ni de récepteurs, ni d'enzymes. Les principaux représentants sont le jaune lucifer, la sodium fluorescéine (NaF), le sucrose, le mannitol et l'aténolol (Irvine et al., 1999 ; Lacombe et al., 2004). Toutes ces molécules ont des poids moléculaires compris entre 182 et 457 Da. Pour le NaF ou le mannitol, cette perméabilité paracellulaire est généralement de l'ordre de 1 à 5×10^{-6} cm/s dans plusieurs modèles cellulaires de barrière (van Breemen et Li, 2005 ; Mercier et al., 2018 ; Puech et al., 2018). Des marqueurs de poids moléculaires plus élevés, comme le dextran-FITC, peuvent être utiles pour évaluer la capacité d'un modèle à discriminer des composés hydrophiles selon leur poids moléculaire. Les perméabilités sont alors logiquement plus faibles.

1.1.2. L'expression des jonctions intercellulaires

Un bon modèle de barrière doit obligatoirement exprimer un ensemble de protéines de jonctions intercellulaires, garantissant ainsi une bonne étanchéité afin d'étudier le transport des médicaments. Les complexes de jonctions permettent aux cellules épithéliales adjacentes de former des contacts adhésifs importants. Ils sont également impliqués dans la prolifération et la

différenciation cellulaire (Koch et Nusrat, 2009). Ces complexes sont définis comme l'association de différentes protéines transmembranaires entre deux cellules adjacentes et sont formés de deux types de jonctions, les jonctions dites adhérentes et les jonctions dites serrées. Les jonctions adhérentes possèdent plusieurs rôles tels que la formation des jonctions serrées et l'adhésion cellule-cellule, tandis que les jonctions serrées contrôlent la sélectivité et la perméabilité paracellulaire des ions et des solutés entre les cellules (Hartsock et Nelson, 2008).

Les **jonctions adhérentes** participent à de nombreuses fonctions cellulaires telles que la formation et la stabilisation de l'adhésion intercellulaire, la régulation de l'actine du cytosquelette ou encore la régulation de la transcription (Hartsock et Nelson, 2008). Les jonctions adhérentes impliquent des interactions entre des glycoprotéines transmembranaires de la superfamille des cadhérines, comme l'E-cadhérine retrouvée principalement au sein des tissus épithéliaux tels que l'intestin (Escaffit et al., 2005), et des protéines cytoplasmiques de la famille des caténines permettant une connexion au cytosquelette d'actine ainsi que le transport et la stabilisation des cadhérines à la membrane cellulaire (Perez-Moreno et Fuchs, 2006).

Les **jonctions serrées**, exprimées au pôle apical des cellules épithéliales, sont constituées de protéines transmembranaires telles que l'occludine ou les claudines, conférant les propriétés de régulation du passage des ions, associées à des protéines cytoplasmiques représentées majoritairement par les zonula occludens (ZO) assurant la liaison au cytosquelette d'actine et aux jonctions adhérentes (Shin et al., 2006 ; Niessen, 2007). L'occludine représente un marqueur fiable de l'expression des jonctions serrées. En effet, une diminution de l'expression membranaire de l'occludine a été corrélée à une diminution de la TEER et donc de l'étanchéité dans un modèle Madin-Darby canine kidney (MDCK) de barrière épithéliale (Chen et al., 2002). Les différentes claudines ont des profils d'expression variables selon les tissus et les cellules considérés (Furuse et al., 1998 ; Chiba et al., 2008). Les claudines ont un rôle déterminant dans la fonction de barrière des jonctions serrées en régulant sélectivement le flux paracellulaire des ions. Par exemple, une surexpression de la claudine-1 dans les cellules MDCK conduit à une augmentation de la TEER et une diminution de la perméabilité au dextran-FITC (Inai et al., 1999). Enfin, les protéines **ZOs** interagissent avec les protéines transmembranaires, permettant la formation et le maintien des différents complexes de jonctions (Hartsock et Nelson, 2008).

1.1.3. L'expression de transporteurs membranaires fonctionnels

La dernière caractéristique importante pour un bon modèle *in vitro* d'étude du transport des médicaments est bien évidemment l'expression des transporteurs à la membrane des cellules polarisées. Pour les transporteurs ABC, une localisation apicale ou basolatérale sera attendue selon le modèle cellulaire et le transporteur considérés, bien que la majorité soit exprimée au pôle apical des cellules en raison de leur rôle de détoxification. L'expression de ces transporteurs sera détaillée ultérieurement, plus particulièrement dans le paragraphe concernant les lignées cellulaires.

1.2. Les différents systèmes cellulaires

De nombreux modèles cellulaires ont été développés pour étudier les mécanismes moléculaires à l'origine du fonctionnement des transporteurs et les interactions qui peuvent en découler. Ils sont désormais incontournables puisque l'évaluation *in vitro* de l'implication des transporteurs d'efflux P-gp et BCRP est devenue une étape obligatoire dans le développement des médicaments (FDA, 2017). On distingue trois grands systèmes utilisés actuellement pour l'étude du transport des médicaments : les cellules primaires, les lignées cellulaires et les vésicules membranaires. Les cellules ont l'avantage de pouvoir être cultivées sur des inserts possédant une membrane semi-perméable, mis en suspension dans un puits (Figure 33). Ce mode de culture est propice à l'établissement d'un modèle de barrière car il crée deux compartiments, un apical et un basal, favorisant ainsi la polarisation des cellules.

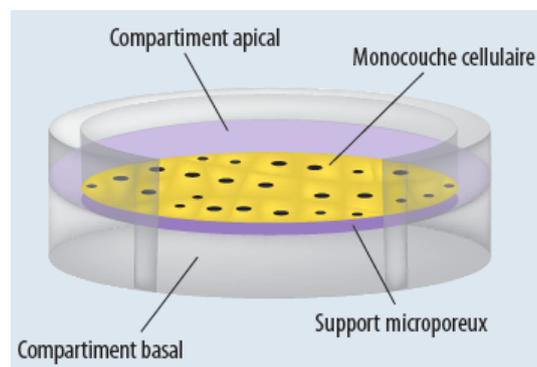


Figure 33. Représentation schématique de la culture cellulaire sur insert (d'après Le Guellec et Benz, 2011).

1.2.1. La culture de cellules primaires

Les modèles cellulaires primaires sont basés sur des cellules épithéliales isolées à partir de biopsies puis mise en culture *in vitro* et peuvent être d'origine animale ou humaine. Des modèles cérébraux, intestinaux, hépatiques et rénaux ont été développés.

Parmi les modèles primaires de BHE, un modèle murin de tri-culture a été développé par Nakagawa et al. pour étudier le passage des médicaments au niveau cérébral. Ce modèle a démontré une bonne étanchéité, ainsi que la présence de transporteurs d'efflux fonctionnels. De plus, les perméabilités de 19 composés obtenues sur ce modèle sont comparables à celles observées *in vivo* (Nakagawa et al., 2009). Mizutani et al. ont développé un modèle primaire d'épithélium intestinal murin cultivé en trois dimensions à partir de cryptes intestinales. Les cellules formant les organoïdes conservent une bonne étanchéité ainsi que l'expression et la fonctionnalité de la P-gp, faisant de ce système un modèle adapté aux études de transport (Mizutani et al., 2012). Ensuite, la culture en sandwich d'hépatocytes primaires issus de rat a notamment permis d'étudier l'implication des transporteurs ABC dans l'efflux biliaire de la rosuvastatine (Jemnitz et al., 2010). Enfin, des modèles primaires utilisant des cellules de tubule proximal rénal d'origine murine (Terlouw et al., 2001) ou humaine (Huls et al., 2008) peuvent servir pour étudier le rôle des transporteurs d'efflux dans l'élimination rénale des médicaments.

Les modèles cellulaires primaires ont pour principal avantage de conserver en grande partie l'histologie de la muqueuse ou de l'épithélium d'origine. Les différents types cellulaires sont représentés et leur répartition est similaire à celle observée *in vivo*. Même si les cellules primaires se rapprochent des conditions *in vivo* d'une barrière, leur usage pour des études de transport reste limité. En effet, leur disponibilité est variable, la culture est longue et compliquée et leur coût reste élevé. De plus, l'hétérogénéité et la durée de vie limitée de ce type de cellules sont un frein majeur dans l'évaluation du rôle des transporteurs dans la pharmacocinétique des médicaments qui nécessite une bonne reproductibilité des données expérimentales.

1.2.2. Les vésicules membranaires

Les vésicules membranaires représentent un système simple d'étude du transport des médicaments. Deux approches, validées par la Food and Drug Administration (FDA) (FDA, 2017) permettent d'étudier l'implication des protéines ABC dans le transport des composés.

Tout d'abord, lorsque les membranes sont préparées dans des conditions appropriées (Steck et al., 1970), elles produisent des vésicules orientées de l'intérieur vers l'extérieur, appelées « inside-out », le site de liaison à l'ATP et le site de liaison du substrat du transporteur ABC étant orientés vers l'extérieur (Figure 34). Les substrats sont transportés dans les vésicules par hydrolyse de l'ATP présent dans le tampon. Une filtration rapide peut être utilisée pour séparer les vésicules membranaires de la solution d'incubation.

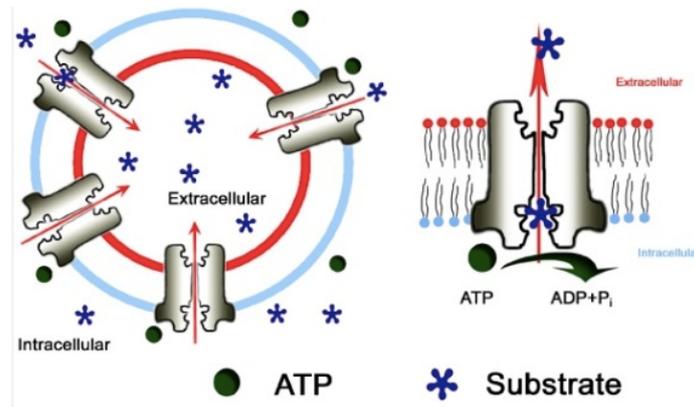


Figure 34. Schéma du principe d'une étude de transport avec vésicules membranaires (d'après Glavinas et al., 2008)

Les préparations membranaires contiennent une fraction de vésicules dites « inside-out ». Le transporteur d'efflux transporte les composés du tampon à l'intérieur des vésicules grâce à l'ATP. Les composés piégés à l'intérieur peuvent être quantifiés par différentes méthodes.

Les vésicules membranaires sont issues de différentes sources telles que des cellules d'insectes transfectées ou non, des lignées cellulaires ou peuvent être synthétisées (Sharom et al., 1999 ; Özvegy et al., 2001 ; Elsby et al., 2011). Les membranes cellulaires d'insecte sont différentes de celles des mammifères sur au moins deux propriétés : la glycosylation des protéines et la composition lipidique de la membrane. Plus particulièrement, les membranes d'insecte contiennent beaucoup moins de cholestérol que les membranes des cellules mammifères. Cette différence peut avoir un impact sur la diffusion passive des composés ainsi que sur la fonctionnalité des certains transporteurs comme BCRP (Pal et al., 2007).

Ce type de système a l'avantage de mesurer la disposition réelle du substrat à travers la membrane cellulaire. Son inconvénient est que les composés ayant une perméabilité passive élevée ne sont pas retenus à l'intérieur des vésicules, ce qui rend difficile les mesures de transport direct avec cette classe de composés (Glavinas et al., 2008). Les systèmes de vésicules membranaires sont performants pour déterminer si un composé est un substrat de transporteurs ABC (Hemauer et al., 2010) mais aussi pour détecter des interactions médicamenteuses potentielles liées aux transporteurs (Glavinas et al., 2008).

La deuxième approche possible consiste à mesurer la quantité de phosphate inorganique libéré par l'ATPase, reflétant ainsi l'activité du transporteur ABC. Il est généralement admis que le clivage de l'ATP est étroitement lié à la translocation du substrat car l'absorption des substrats dans les vésicules membranaires est un processus dépendant de l'ATP. Cette technique est surtout utilisée pour l'étude de P-gp et BCRP, mais est également disponible pour l'étude des MRPs. Bien que cette approche soit un excellent outil pour détecter les interactions d'un composé avec un transporteur, les résultats de ce seul test ne peuvent être utilisés pour prédire les conséquences sur la pharmacocinétique du composé à l'échelle de la barrière (Shirasaka et al., 2006).

1.2.3. Les lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont dites « immortalisées » car ce sont soit des cellules cancéreuses ayant un potentiel de prolifération illimité, soit des cellules modifiées génétiquement afin de prolonger leur temps de culture. Différentes techniques d'immortalisation existent, plus particulièrement par transfection d'oncogènes via des adénovirus ou rétrovirus. Une technique utilisant la surexpression de la sous-unité catalytique de la télomérase a permis d'immortaliser récemment des cellules humaines provenant du tubule rénal proximal, sans changer leur phénotype (Wieser et al., 2008). Ces lignées immortalisées sont conservées dans des banques cellulaires telles que l'American Type Culture collection (ATCC) ou l'European Collection of Animal Cell Culture (ECACC).

De nombreuses lignées ont été développées, mais seules les lignées recommandées par la FDA (FDA, 2017) seront abordées dans ce chapitre : la lignée Caco-2, la lignée Lewis-Lung Cancer Porcine Kidney (LLC-PK1), la lignée Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) et la lignée Human Embryonic Kidney (HEK293).

1.2.3.1. Caco-2

Les cellules Caco-2 sont des cellules épithéliales intestinales issues d'un adénocarcinome colorectal. Ce modèle est devenu un standard pour prédire l'absorption intestinale et étudier le transport des médicaments chez l'homme.

Lors de leur mise en culture, les cellules Caco-2 subissent une différenciation entérocytaire spontanée pour ressembler aux cellules épithéliales de l'intestin grêle. Typiquement, les cellules Caco-2 sont cultivées sur insert pendant environ 21 jours. Une fois

arrivées à confluence, les cellules se polarisent (Figure 35) et expriment les différents marqueurs essentiels pour un modèle de barrière tels que les jonctions serrées et adhérentes et plusieurs systèmes de transport actifs (Ölander et al., 2016), comme dans les cellules de l'intestin grêle humain.

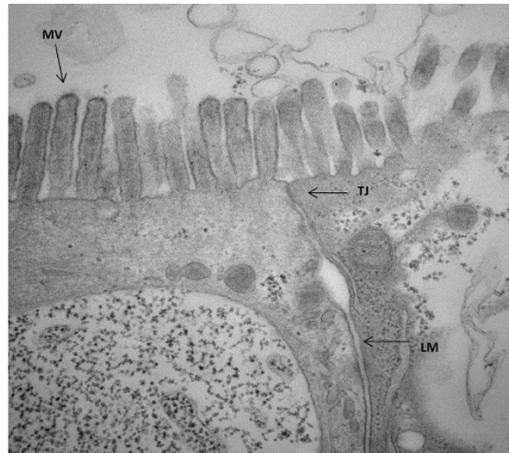


Figure 35. Microscopie électronique à transmission des cellules Caco-2 (d'après ECACC, https://www.phenaculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=09042001&collection=ecacc_gc)
MV = microvilli, TJ = jonctions serrées, LM = membrane latérale

L'intérêt majeur de ce modèle cellulaire est l'existence d'une bonne corrélation entre les perméabilités de composés de référence mesurées *in vitro* et celles observées *in vivo* (Artursson et Karlsson, 1991). Ce modèle est un excellent outil pour étudier le transport des médicaments car les cellules Caco-2 expriment à leur pôle apical l'ensemble des transporteurs ABC et SLC pouvant intervenir dans l'influx ou l'efflux des médicaments (Ölander et al., 2016) (Figure 36).

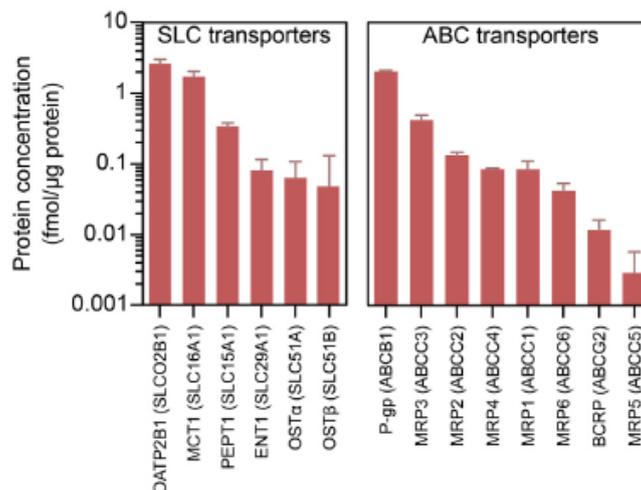


Figure 36. Quantification de transporteurs SLC et ABC dans les cellules Caco-2 (d'après Ölander et al., 2016)

De plus, le profil d'expression de ces transporteurs dans les cellules Caco-2 est similaire à celui-ci des cellules de l'intestin grêle. C'est pourquoi de nombreuses études de transport et d'interactions médicamenteuses liées aux transporteurs ABC ont été réalisées sur le modèle Caco-2, bien que l'expression de OATPB, BCRP et MRP2 diffère (Englund et al., 2006). BCRP est moins exprimée dans les cellules Caco-2 comparé aux cellules de l'intestin grêle (jusqu'à vingt fois moins), tandis que OATPB et MRP2 ont une expression plus importante dans les cellules Caco-2.

Cependant, il est nécessaire d'utiliser des combinaisons d'inhibiteurs spécifiques pour étudier le rôle de chaque transporteur individuellement. Or, l'évaluation de la part relative de chacun des transporteurs dans l'efflux des médicaments est délicate, la spécificité des inhibiteurs disponibles, notamment pour P-gp et BCRP, étant relative.

1.2.3.2. LLC-PK1

La lignée cellulaire LLC-PK1 est issue d'un tubule proximal rénal porcin sain. Ces cellules possèdent des propriétés caractéristiques des cellules de l'épithélium tubulaire proximal *in vivo* (Hull et al., 1976). D'un point de vue morphologique, elles présentent des microvillosités au pôle apical (Figure 37) ainsi que de nombreux complexes jonctionnels.

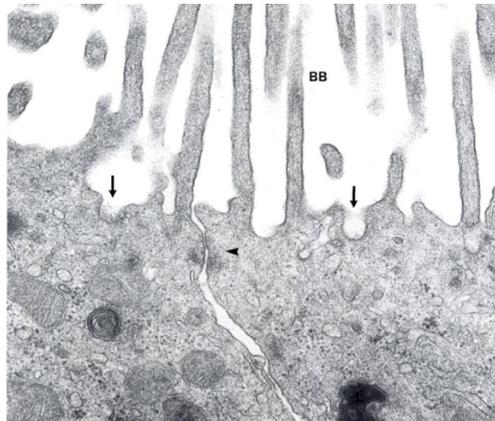


Figure 37. Microscopie électronique à transmission sur les cellules LLC-PK1 (d'après Nielsen et al., 1998)
La pointe de flèche indique un complexe jonctionnel, BB = bordure en brosse

Effectivement, les cellules LLC-PK1 expriment les principales protéines des complexes de jonctions telles que l'occludine, ZO-1, la claudine 7 et l'E-cadhérine (Prozialeck et al., 2006) (Figure 38). Elles expriment aussi faiblement la protéine d'efflux P-gp (Kuteykin-Teplyakov et al., 2010) et les ARN messagers de MRP1 et MRP2 ont été détectés (Goh et al., 2002).

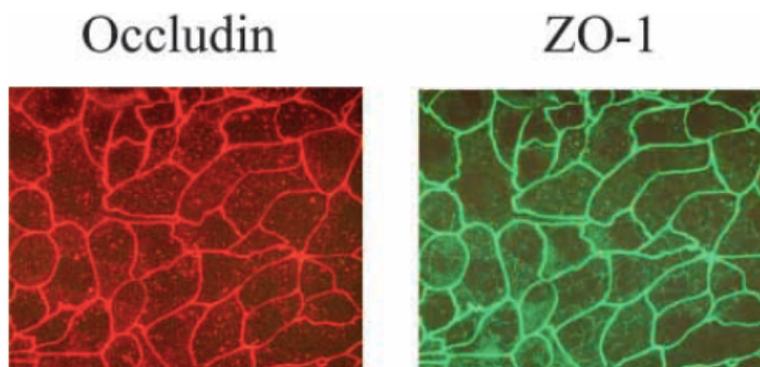


Figure 38. Expression de l'occludine et de ZO-1 par immunofluorescence sur les cellules LLC-PK1 (d'après Clarke et al., 2000)

Bien que le modèle LLC-PK1 présente toutes les caractéristiques d'une bonne barrière cellulaire, les études de transport font surtout appel à la version transfectée de ce modèle. La faible expression endogène des protéines d'efflux rend le modèle LLC-PK1 d'autant plus intéressant pour la transfection, car elles n'interféreront pas dans les mécanismes d'efflux. En effet, il existe des cellules LLC-PK1 transfectées avec la P-gp, BCRP ou la protéine MRP1 humaine (Tanigawara et al., 1992 ; Flanagan et al., 2002 ; Takada et al., 2005) qui permettent d'étudier le rôle d'un transporteur en particulier dans l'efflux des médicaments. Cependant, le phénomène de transfection peut moduler l'expression des transporteurs endogènes porcins. En effet, la transfection de la P-gp humaine dans les cellules LLC-PK1 provoque une augmentation de l'expression protéique de la protéine MRP2 porcine (Kuteykin-Teplyakov et al., 2010).

1.2.3.3. MDCK

Les cellules MDCK sont des cellules épithéliales issues d'un tubule rénal distal d'origine canine. Les cellules MDCK expriment de nombreuses protéines de jonctions, comme ZO-1, l'occludine et plusieurs claudines (Furuse et al., 2001 ; Lipschutz et al., 2005) (Figure 39). Elles sont donc capables de former une barrière cellulaire étanche.

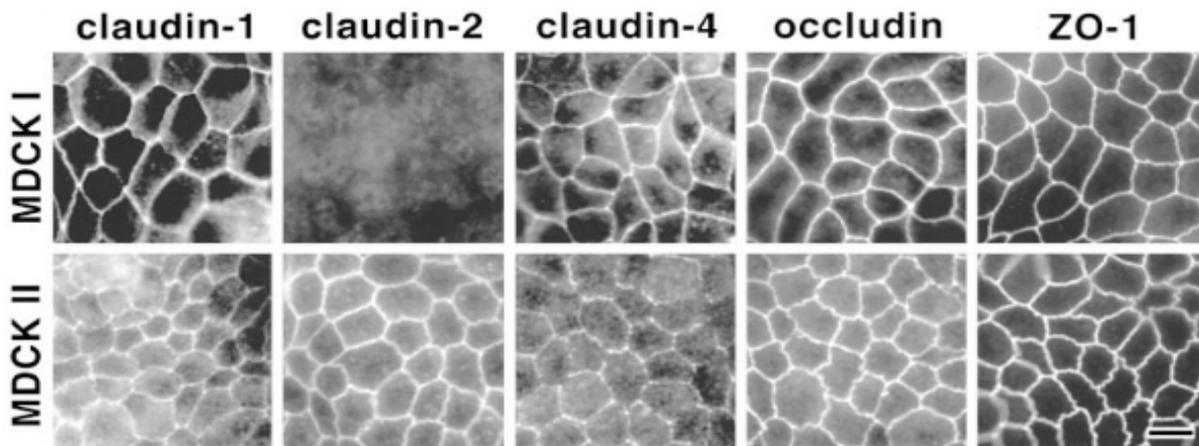


Figure 39. Localisation par immunofluorescence de ZO-1, de l'occludine et des claudines 1, 2 et 4 sur les cellules MDCK I et MDCK II cultivées sur insert (d'après Furuse et al., 2001). La claudine-2 n'est pas détectée sur les MDCK I et le signal pour la claudine-4 est plus faible sur les MDCK II. Barre d'échelle : 10 μm

Il existe plusieurs souches de cellules MDCK avec des caractéristiques différentes (Dukes et al., 2011), dont les MDCK I et les MDCK II qui sont utilisées pour les études de transport. Les MDCK I sont dérivées de la lignée parentale à faible passage alors que les MDCK II sont issues de passages plus élevés. Les MDCK I ont des TEER supérieures à 1000 ohm.cm^2 tandis que les MDCK II ont des TEER aux alentours de 100 ohm.cm^2 . Ces différences de TEER sont liées à l'expression de la claudine-2 dans les MDCK II (Furuse et al., 2001) (Figure 39). Les cellules MDCK I peuvent présenter un phénotype épithélial instable, c'est pourquoi il est recommandé d'utiliser préférentiellement les cellules MDCK II (Dukes et al., 2011).

Comme pour les cellules LLC-PK1, les études de transport et d'interactions médicamenteuses sont majoritairement réalisées sur des modèles MDCK II transfectés avec les gènes des transporteurs ABC humains, comme MDCK-MDR1, MDCK-BCRP, MDCK-MRP1 et MDCK-MRP2 (Margelidon-Cozzolino et al., 2018 ; Luo et al., 2002). Ces modèles sont très utilisés car leur culture est facile et rapide, aboutissant à un modèle fonctionnel au bout de seulement 4-5 jours de culture sur insert (Figure 40).

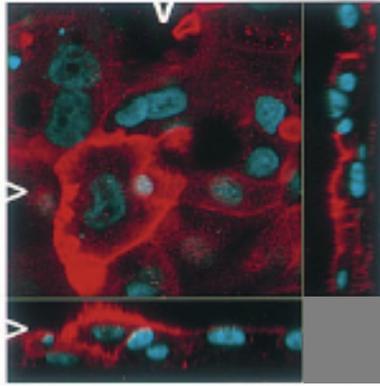


Figure 40. Expression et localisation apicale de P-gp sur les cellules MDCK-MDR1 par microscopie confocale après quatre jours de culture sur insert (d'après Hämmerle et al., 2000). P-gp est colorée en vert et les noyaux sont colorés en bleu. Les sections à droite et en bas de l'image représentent des projections en xz et yz, respectivement.

En revanche, contrairement aux cellules LLC-PK1, le niveau d'expression de la P-gp canine n'est pas négligeable et doit être pris en compte lors des études de transport (Figure 41A). De plus, la transfection avec le gène humain codant pour MRP5 induit une augmentation de l'expression de la P-gp canine (Kuteykin-Teplyakov et al., 2010) (Figure 41B).

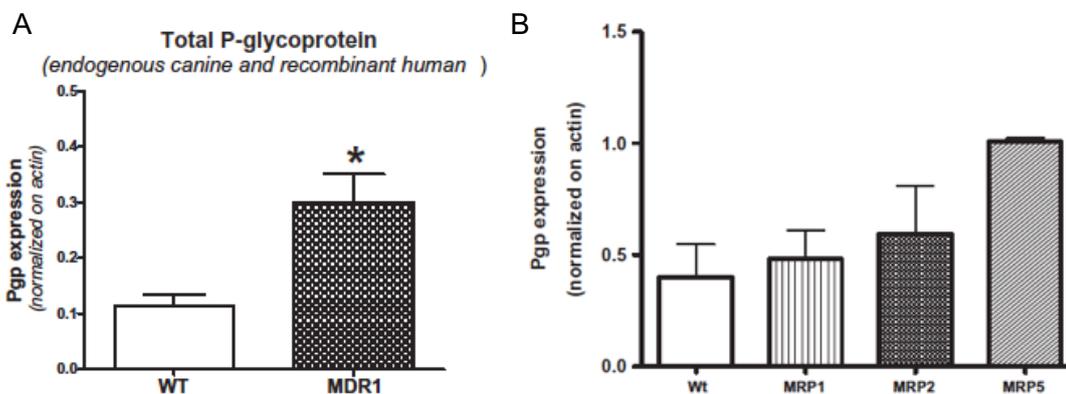


Figure 41. Expression de la P-gp dans les MDCK II natives et transfectées avec le gène MDR1 (A) et avec les gènes des MRPs (B) (d'après Kuteykin-Teplyakov et al., 2010). L'expression est évaluée par western blot avec l'anticorps anti-P-gp C219 et normalisée par l'actine pour permettre la comparaison entre les lignées. WT = MDCK II natives non transfectées

1.2.3.4. HEK293

Les cellules HEK293 sont des cellules épithéliales qui ont été isolées à partir de rein embryonnaire humain normal. Cette lignée est très populaire car elle possède des conditions de culture faciles et est facilement transfectable. Elle est très utilisée pour la production de protéines recombinantes (Thomas et Smart, 2005).

Seules les cellules HEK293 transfectées sont utilisées dans les études de transport. De plus, sa haute capacité de transfection rend cette lignée intéressante pour étudier l'impact des polymorphismes sur la fonctionnalité des transporteurs d'influx ou d'efflux. Plusieurs études ont évalué l'implication de différents transporteurs d'influx SLC et de leurs variants dans l'absorption des composés. Par exemple, un modèle transfecté avec le gène humain de la protéine OCT2 a permis de démontrer la prise en charge de la metformine par ce transporteur au niveau rénal (Kimura et al., 2005). Grâce à des cellules HEK293 transfectées avec plusieurs protéines de la famille des OATP, Taub et al. ont montré que la digoxine n'est pas un substrat de ces transporteurs mais peut inhiber le transport de substrats spécifiques pour OATP1B1 et OATP2B1 (Taub et al., 2011). Des études ont également évalué l'impact de différents variants des transporteurs ABC sur leur fonctionnalité et sur la prise en charge des médicaments. La lignée HEK293 a servi à évaluer les conséquences de polymorphismes de BCRP sur le transport de plusieurs médicaments comme le méthotrexate (Mitomo et al., 2003) ou l'imatinib (Burger et al., 2004). Une étude similaire a aussi permis d'évaluer l'impact d'un polymorphisme de P-gp sur l'accumulation intracellulaire du tacrolimus et de la ciclosporine A (Dessilly et al., 2014).

1.3. Les méthodes d'évaluation du transport des médicaments

Différentes méthodes d'évaluation de la prise en charge des médicaments par les transporteurs ABC peuvent être utilisées sur les différents modèles *in vitro*. Deux techniques principales permettent d'évaluer la fonctionnalité des transporteurs : l'accumulation intracellulaire et la perméabilité bidirectionnelle.

1.3.1. Évaluation de l'accumulation intracellulaire

Les études d'accumulation permettent de vérifier assez simplement la fonctionnalité des transporteurs ABC. Schématiquement, un substrat spécifique du transporteur d'intérêt est incubé en présence des cellules pendant une durée variable, généralement 30min à 2h. En parallèle, la même expérience est réalisée en présence d'un inhibiteur spécifique ou non du transporteur (Figure 42).

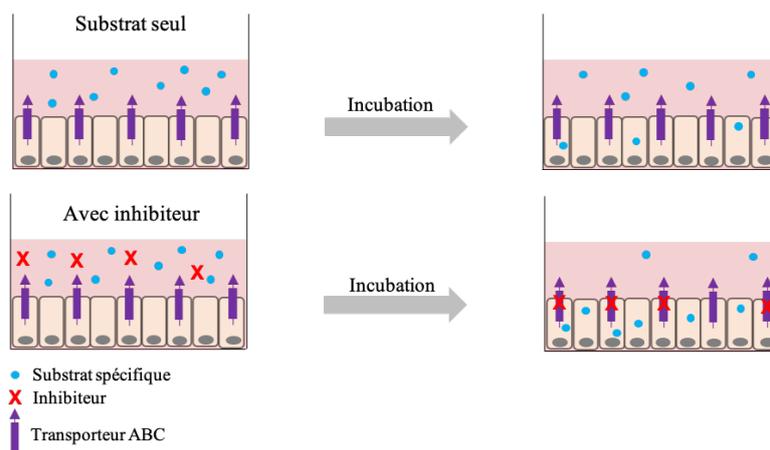


Figure 42. Représentation schématique du principe d'une étude d'accumulation intracellulaire

A la fin de l'incubation, la quantité de substrat accumulée à l'intérieur des cellules est mesurée et un ratio d'accumulation est alors déterminé selon la formule :

$$\text{Ratio d'accumulation} = \frac{\text{Accumulation du substrat seul}}{\text{Accumulation du substrat avec inhibiteur}} \quad (\text{Equation 2})$$

L'un des inconvénients de cette approche est l'absence de recommandations officielles quant à la réalisation et l'interprétation des données des études d'accumulation intracellulaires, bien que ces études soient très utiles pour évaluer rapidement la fonctionnalité d'un transporteur d'efflux au niveau cellulaire. En revanche, cette méthodologie ne prend pas en compte l'aspect de barrière cellulaire et ne reflète pas le transport d'un médicament à l'échelle de la barrière *in vivo*. En effet, bien que la fonctionnalité des transporteurs ABC ait été vérifiée au niveau cellulaire par des études d'accumulation *in vitro* sur le modèle RPMI 2650, la réelle implication des transporteurs dans le transport des molécules étudiées n'a pas été confirmée à l'échelle de la barrière lors des études de perméabilités bidirectionnelles (Mercier et al., 2018).

1.3.2. Les perméabilités bidirectionnelles et l'efflux ratio

En complément des études d'accumulation intracellulaire, l'étude du transport bidirectionnel permet d'évaluer la fonctionnalité des transporteurs ABC à l'échelle de la barrière cellulaire.

Les études de transport bidirectionnel sont basées sur l'évaluation des perméabilités bidirectionnelles d'un composé, d'un compartiment apical vers un compartiment basal et inversement, en présence ou non d'un inhibiteur du transporteur ciblé (Figure 43). Le temps

d'incubation sur les cellules peut varier en fonction des modèles cellulaires mais est généralement de 2h. Ces études sont validées et recommandées par la FDA pour évaluer le transport des médicaments et déterminer si une molécule est un substrat et/ou un inhibiteur des transporteurs (FDA, 2017)

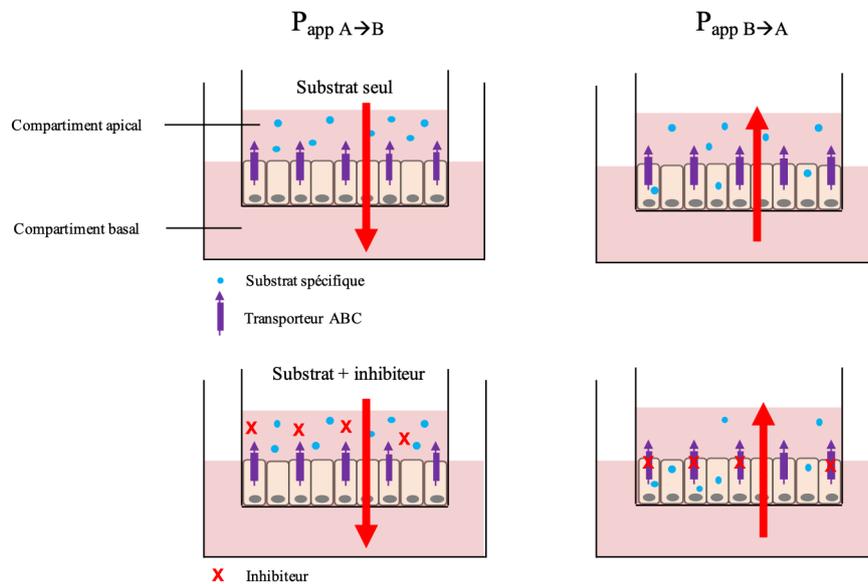


Figure 43. Représentation schématique du principe d'une étude de transport bidirectionnel

A la fin de l'incubation, les perméabilités du compartiment apical vers le basal ($P_{app A \rightarrow B}$) et du compartiment basal vers l'apical ($P_{app B \rightarrow A}$) sont calculées grâce à l'équation 1. Ces perméabilités permettent de déterminer un ratio d'efflux (RE) selon l'équation :

$$RE = \frac{P_{app B \rightarrow A}}{P_{app A \rightarrow B}} \quad (\text{Equation 3})$$

D'après les recommandations de la FDA, une valeur de RE supérieure ou égale à deux pour un substrat seul et une diminution de ce RE d'au moins 50% ou à une valeur égale à 1 en présence d'un inhibiteur spécifique signifie que le transporteur considéré est impliqué dans l'efflux actif de ce substrat (FDA, 2017).

1.3.3. Détermination des paramètres pharmacocinétiques

Afin de caractériser les interactions entre les médicaments et les transporteurs, plusieurs paramètres pharmacocinétiques doivent être déterminés *in vitro* sur les modèles cellulaires, parmi lesquels on retrouve la concentration efficace médiane (EC50) et la concentration

inhibitrice médiane (IC50). Ces paramètres peuvent être estimés à l'aide des études de perméabilités bidirectionnelles décrites précédemment.

Sur une courbe concentration-effet, l'EC50 correspond à la concentration d'un composé produisant 50% de l'effet maximal (Neubig et al. 2003). Elle reflète l'affinité d'un substrat pour un transporteur : plus la valeur de l'EC50 est basse, plus l'affinité est élevée. En modélisant les résultats d'ER obtenus *in vitro* avec différentes concentrations de substrat, il est possible d'estimer l'EC50 avec la formule suivante (Goutelle et al., 2008) :

$$ER = \frac{E_{max} \times [S]^h}{[S]^h + EC50^h} \quad (\text{Equation 4})$$

où E_{max} est l'effet maximal, $[S]$ est la concentration du substrat et h est le coefficient de Hill.

Le deuxième paramètre, l'IC50, correspond à la concentration d'un composé inhibant 50% du transport d'un substrat. Elle permet de déterminer la puissance d'un inhibiteur pour un transporteur donné : plus la valeur de l'IC50 est faible, plus l'inhibiteur est puissant. En modélisant les résultats d'ER obtenus *in vitro* en présence de concentrations croissantes d'inhibiteur, il est possible d'estimer l'IC50 avec la formule suivante (FDA, 2017) :

$$ER = I_{max} + \frac{(I_0 - I_{max})}{1 + \left(\frac{[I]}{IC50}\right)^h} \quad (\text{Equation 5})$$

où I_{max} est l'inhibition maximale, I_0 est l'effet sans inhibiteur, $[I]$ est la concentration d'inhibiteur et h est le coefficient de Hill. Lors de la détermination de l'IC50 d'un inhibiteur *in vitro*, il est recommandé d'utiliser des concentrations de substrats inférieures au K_m , afin de se rapprocher le plus possible de la valeur de sa constante d'inhibition, appelée K_i (FDA, 2017).

Bien que l'IC50 ne soit pas un indicateur direct d'affinité, il permet de calculer le K_i , grâce à l'équation de Cheng-Prusoff (Cheng et Prusoff, 1973) :

$$K_i = \frac{IC50}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (\text{Equation 6})$$

où $[S]$ est la concentration du substrat et K_m est la constante de Michaelis-Menten du substrat qui correspond à la concentration de substrat nécessaire pour obtenir 50% de l'effet maximal.

Lors du développement d'un médicament, il est demandé par la FDA et l'agence européenne du médicament de mener des études afin de déterminer si ce médicament inhibe l'efflux d'un substrat connu de P-gp ou BCRP sur des modèles cellulaires *in vitro*, et pour évaluer le pouvoir inhibiteur de ce médicament (c'est-à-dire son IC50 ou K_i). On considère que le médicament testé, administré par voie orale, possède le potentiel d'inhiber *in vivo* la P-gp ou BCRP intestinale si le rapport $[I_{\text{gut}}]/IC50$ est supérieur ou égal à 10, avec $[I_{\text{gut}}]$ correspondant à la concentration maximale du médicament pouvant être présente au niveau intestinal ($[I_{\text{gut}}] = \text{dose d'inhibiteur}/250 \text{ mL}$) (FDA, 2017). Pour l'étude des transporteurs présents au niveau hépatique ou rénal, il est préférable d'utiliser respectivement la concentration plasmatique maximale estimée à l'entrée du foie ou la concentration plasmatique maximale non liée à la place de $[I_{\text{gut}}]$. Ces données obtenues *in vitro* sont importantes car elles nous renseignent sur la probabilité d'avoir des interactions cliniquement significatives et la nécessité de les étudier *in vivo*.

1.4. La corrélation *in vitro* – *in vivo*

Les modèles d'étude *in vitro* du transport des médicaments sont des outils essentiels pour déterminer le ou les transporteurs impliqués dans la pharmacocinétique d'un médicament, et par conséquent pouvant être à l'origine d'interactions médicamenteuses. Les cellules Caco-2 représentent un excellent modèle pour prédire la biodisponibilité orale des molécules chez l'homme, car il existe une bonne corrélation entre l'absorption orale et la perméabilité apparente *in vitro* pour les molécules ayant un transport passif transcellulaire (Artursson et Karlsson, 1991 ; Lennernäs et al., 1996) (Figure 44).

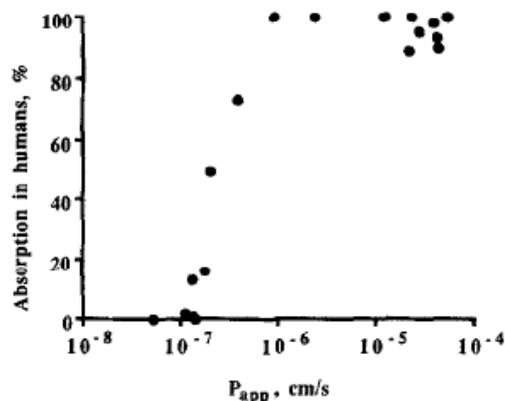


Figure 44. Corrélation entre l'absorption chez l'homme après administration orale et les perméabilités apparentes obtenues sur le modèle Caco-2 (d'après Artursson et Karlsson, 1991).

Cette corrélation a également été retrouvée avec les cellules MDCK, dont les perméabilités apparentes sont corrélées à celles observées sur les Caco-2 (Figure 45), principalement pour les composés ayant une diffusion passive (Irvine et al., 1999).

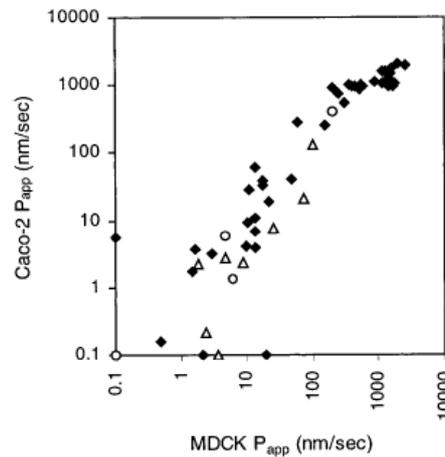


Figure 45. Corrélation des perméabilités apparentes entre Caco-2 et MDCK (d'après Irvine et al., 1999).
 (◆) composé avec diffusion passive, (▲) composé avec transport actif, (○) composé efflué

Cependant, cette corrélation ne concerne pas le transport actif des médicaments, et en particulier l'impact de la prise en charge par les transporteurs d'efflux sur l'absorption intestinale des médicaments et les interactions qui peuvent en découler. Les modèles cellulaires sont capables de prédire qualitativement la prise en charge par un transporteur d'efflux, mais il reste difficile de prédire quantitativement l'impact de cette prise en charge sur l'absorption intestinale *in vivo*. Afin de décider s'il est nécessaire de mener une étude clinique pour étudier des interactions liées aux transporteurs, la FDA propose d'utiliser des ratios tels que $[I]/IC_{50}$ ou $[I_{\text{gut}}]/IC_{50}$ avec les valeurs d' IC_{50} obtenues à partir des études *in vitro* (FDA, 2017). Fenner et al. ont pris l'exemple de la digoxine pour étudier la corrélation entre les ratios calculés à partir des IC_{50} de dix-neuf inhibiteurs obtenus sur le modèle Caco-2 et les interactions cliniquement significatives observées *in vivo* (Fenner et al., 2009). Leur analyse a révélé que le paramètre $[I]/IC_{50} > 0,1$ semble être un bon indicateur prédictif positif des interactions cliniques de la digoxine liées à P-gp, tandis que $[I_{\text{gut}}]/IC_{50} < 10$ semble être, dans une moindre mesure, un indicateur prédictif négatif. Cependant, le nombre de faux négatifs observés avec $[I]/IC_{50}$ (~40%), et de faux positifs avec $[I_{\text{gut}}]/IC_{50}$ (~40%), reste préoccupant. Il est donc important d'améliorer l'estimation des paramètres *in vitro* afin d'établir de meilleures corrélations *in vitro* – *in vivo* pour les études d'interactions liées aux transporteurs.

En effet, de nombreux facteurs, tels que la perméabilité passive et le niveau d'expression des transporteurs doivent être pris en compte. Pour P-gp, Shirasaka et al. ont démontré qu'il existe une très bonne corrélation entre les valeurs des K_m apparents obtenus sur différents modèles cellulaires et le niveau d'expression de P-gp dans ces modèles (Shirasaka et al., 2008) (Figure 46). Cependant, comme le niveau d'expression de la P-gp et des autres transporteurs varie le long du tractus intestinal, un modèle cellulaire *in vitro* ne pourra jamais ressembler complètement au modèle d'expression du transporteur de l'intestin entier (del Amo et al., 2009).

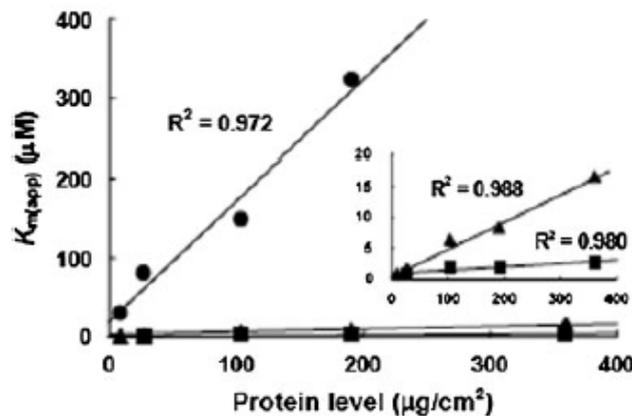


Figure 46. Corrélation entre le niveau d'expression de P-gp et les K_m apparents *in vitro* (d'après Shirasaka et al., 2008).

(▲) quinidine, (■) vérapamil, (●) vinblastine.

Les modèles pharmacocinétiques physiologiques (PBPK) permettent d'inclure l'ensemble des processus ADME liés aux transporteurs et à la diffusion passive mais aussi au métabolisme. Contrairement aux modèles développés pour prédire les interactions liées aux CYP450, la performance prédictive de la modélisation PBPK pour les interactions liées aux transporteurs n'a pas encore été établie (Wagner et al., 2015). Ceci peut s'expliquer en grande partie par un manque de connaissance en biologie des transporteurs et une expérience limitée sur la détermination et la modélisation de la cinétique des transporteurs (Pan et al., 2016).

2. Les modèles *in vivo* animaux

Les modèles animaux *in vivo* sont des outils intéressants pour étudier la pharmacocinétique des médicaments dans son ensemble avant le passage à l'homme. Ils sont importants notamment pour étudier l'interaction entre les enzymes du métabolisme (par exemple les cytochromes P450) et les différents transporteurs, ainsi que pour évaluer

l'importance relative de chaque enzyme ou transporteur en tenant compte du chevauchement des spécificités de substrat (Cummins et al., 2003 ; Kivistö et al., 2004).

Les modèles rongeurs sont les plus couramment utilisés pour évaluer le transport des médicaments, particulièrement l'impact des transporteurs d'efflux, au niveau des barrières intestinales, hépatiques et hémato-encéphalique (Doran et al., 2005 ; Glaeser et Fromm, 2008). Concernant le passage de composés au sein de la barrière hémato-encéphalique et le rôle de P-gp, les modèles murins (rat et souris) semblent être équivalents (Bundgaard et al., 2012). Cependant, contrairement à l'homme, les rongeurs possèdent deux gènes codant pour la protéine d'efflux P-gp. Ces deux gènes *Mdr1a* et *Mdr1b* codent en réalité deux protéines homologues à P-gp ayant la capacité d'effluer les médicaments.

De nombreux modèles murins modifiés génétiquement ont été développés, plus particulièrement des modèles knock-out, permettant d'étudier l'impact d'un transporteur particulier, comme P-gp (Schinkel et al., 1994), BCRP (Jonker et al., 2002) ou MRP2 (Chu et al., 2006 ; Johnson et al., 2006). Plus récemment, des modèles murins humanisés ont été développés pour étudier entre autres le métabolisme et le transport des médicaments (Scheer et Wolf, 2014). Particulièrement, Scheer et al. ont caractérisé le premier modèle de souris humanisée exprimant le transport MRP2 humain (Scheer et al., 2012). Bien que les espèces de rongeurs telles que la souris et le rat soient les plus développées pour étudier l'implication des transporteurs d'efflux, d'autres espèces comme le chien, le singe, le lapin ou le cobaye peuvent également être utilisées (Xia et al., 2007).

L'utilisation de ces modèles animaux tend à diminuer dans les années à venir au profit des modèles cellulaires. En effet, ce sont des modèles qui coûtent relativement cher et qui présentent tout de même quelques différences notables avec l'homme. Par exemple, la prise en charge des médicaments par des transporteurs pour leur élimination peut différer entre les modèles animaux et l'homme (Scheer et Wolf, 2014). Enfin, le renforcement et l'intégration du principe des 3R (Reduce, Refine, Replace) dans la législation relative à l'éthique dans l'expérimentation animale limite l'utilisation des modèles animaux *in vivo*. Cependant, les modèles animaux utilisés en combinaison avec des lignées cellulaires exprimant le transporteur restent un outil précieux pour améliorer notre compréhension des processus du transport des médicaments.

3. Les modèles humains

L'homme représente le modèle idéal d'étude du transport des médicaments et surtout des interactions médicamenteuses potentielles liées aux transporteurs ABC. L'étude du transport d'un médicament chez l'homme correspond à la phase I des études cliniques. Elle consiste à administrer le ou les médicaments d'intérêt à des volontaires sains, afin d'en déterminer les principaux paramètres pharmacocinétiques, comme la prise en charge par des transporteurs membranaires.

Les interactions les plus étudiées chez l'homme concernant les transporteurs sont celles liées à la P-gp et les substrats principalement retrouvés dans ces études sont par exemple la digoxine, le dabigatran éxilate, la fémofénadine ou le talinolol (Oswald et al., 2011). Ces médicaments ont l'avantage de ne pas être métabolisés par les CYP450, donc l'interaction observée en présence d'un inducteur ou d'un inhibiteur ne sera pas liée à une modification de l'activité des CYP450. Une coadministration de digoxine avec la rifampicine, un inducteur connu de la P-gp, a diminué la biodisponibilité orale de la digoxine de 30% chez des volontaires sains (Greiner et al., 1999). L'analyse des biopsies duodénales avant et après l'administration de rifampicine a révélé une augmentation de 3,5 fois de la quantité de P-gp intestinale après exposition à la rifampicine, en lien avec la diminution de l'ASC. Comme observé avec la digoxine, l'association de la rifampicine avec d'autres substrats de P-gp comme la fémofénadine ou le talinolol a également mené à une diminution significative des concentrations plasmatiques de ces deux médicaments, due à une biodisponibilité réduite causée par une induction de la P-gp intestinale (Hamman et al., 2001 ; Whestphal et al., 2000) (Figure 47).

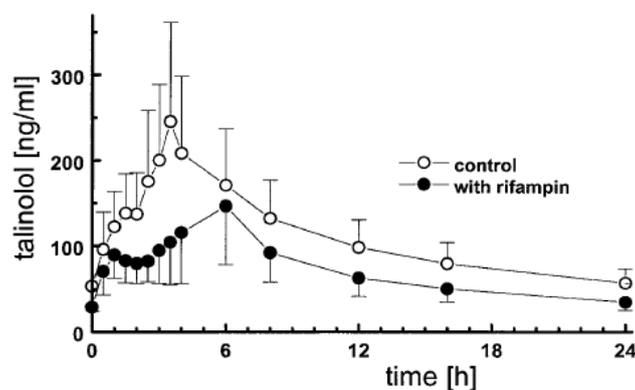


Figure 47. Concentrations plasmatiques de talinolol avant et après administration de rifampicine (d'après Whestphal et al., 2000)

A l'inverse, l'administration d'inhibiteurs de P-gp tels que la quinidine, l'amiodarone ou la dronédarone conduit à une augmentation de l'exposition plasmatique à la digoxine (Doering, 1979 ; Robinson et al., 1989 ; Vallakati et al., 2013). L'amiodarone a entraîné une augmentation d'environ 70% de la C_{max} et de l'ASC de la digoxine, tandis qu'aucune diminution significative de la clairance rénale n'a été observée chez les patients. Les auteurs expliquent l'absence d'effet sur la clairance rénale par une augmentation de l'absorption intestinale et une diminution de la clairance extrarénale impliquant l'inhibition préférentielle de P-gp dans les intestins et le foie (Robinson et al., 1989). La dronédarone a provoqué à une interaction plus forte qu'avec l'amiodarone, conduisant à une ASC de la digoxine presque deux fois plus élevée et à une diminution de sa clairance rénale de 60% chez une patiente présentant une intoxication à la digoxine (Vallakati et al., 2013). Des résultats similaires ont été observés avec d'autres substrats et inhibiteurs de P-gp. Par exemple, Terwogt et al. ont étudié l'impact de la ciclosporine, un inhibiteur des transporteurs ABC, sur l'absorption du paclitaxel administré par voie orale chez des patients présentant des tumeurs solides (Terwogt et al., 1998). L'importante prise en charge du paclitaxel par P-gp limite fortement sa biodisponibilité et empêche une administration par voie orale. Son association à la ciclosporine a multiplié par neuf son absorption orale, permettant ainsi d'atteindre des concentrations plasmatiques supérieures à la concentration seuil d'efficacité de 0,1 µmol/L (Figure 48).

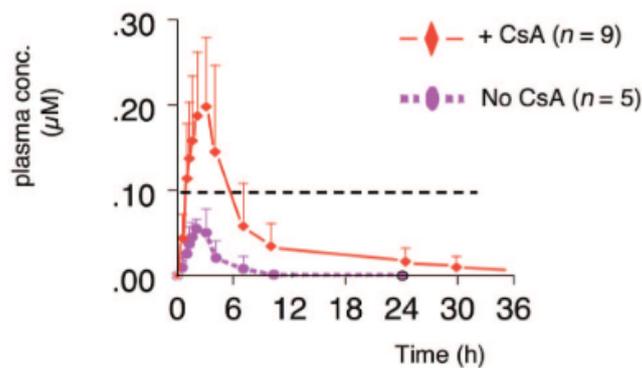


Figure 48. Effet de la ciclosporine A sur les concentrations plasmatiques du paclitaxel (d'après Terwogt et al., 1998).

Du fait d'une découverte plus récente, peu d'études se focalisent sur les interactions liées à BCRP. De plus, BCRP partage de nombreux substrats et inhibiteurs avec les autres transporteurs ABC, particulièrement P-gp, et il est difficile d'étudier *in vivo* la part de chacun dans la prise en charge d'un médicament. Toutefois, une équipe a étudié l'impact de l'administration d'un inhibiteur de P-gp et BCRP, l'élacridar, sur la pharmacocinétique du

topotécan, un substrat sélectif de BCRP ayant une faible affinité pour P-gp, chez des patients atteints de tumeurs solides (Kruijtzter et al., 2002). Les auteurs ont montré que l'élacridar modifiait la biodisponibilité orale du topotécan de 40% sans élacridar à 97% en présence d'élacridar, suggérant une augmentation de l'absorption du topotécan, préférentiellement par inhibition de la BCRP intestinale (Figure 49).

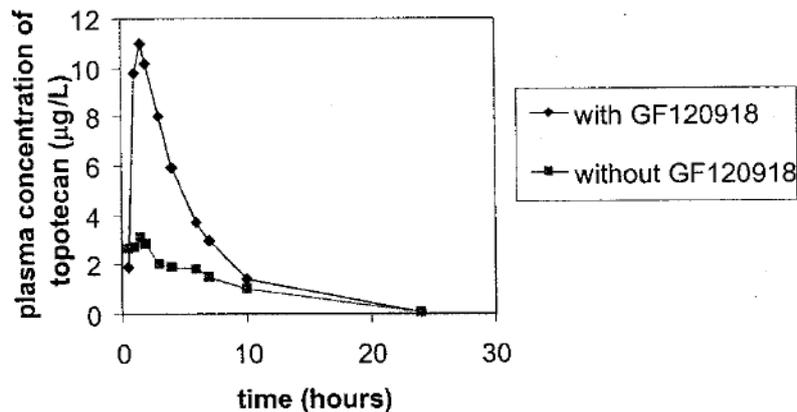


Figure 49. Pharmacocinétique du topotécan en absence ou présence d'élacridar chez un patient (d'après Kruijtzter et al., 2002)

4. Avantages et inconvénients des différents modèles

Chacun des modèles abordés précédemment possèdent ses propres avantages et limites. Les modèles cellulaires *in vitro* sont des modèles simples et faciles à utiliser au sein d'un laboratoire. Ce sont de très bons outils qualitatifs car ils permettent de faire du screening pour étudier l'absorption de nombreuses molécules en développement, et l'existence de modèles transfectés avec le gène d'un transporteur en particulier permet d'identifier précisément le ou les transporteurs impliqués dans le transport d'un médicament. Toutefois, l'utilisation des modèles *in vitro* reste limitée dans les prédictions quantitatives, particulièrement à cause de leur variabilité. Effectivement, l'expression des protéines, notamment des transporteurs membranaires, dépend de très nombreux facteurs comme les conditions de culture (composition du milieu, nature de la surface de culture, densité cellulaire, ...), le temps de culture ou encore le nombre de passage (plus le passage est élevé plus l'expression des transporteurs augmente) (Anderle et al., 1998 ; Behrens et Kissel, 2003 ; Sun et al., 2008 ; Ganga Senarathna et Crowe, 2015).

Les modèles *in vivo* animaux sont d'excellent modèles pour étudier la pharmacocinétique d'un médicament dans son ensemble, avant le passage à l'homme. De plus, l'existence de modèles knock-out permet d'étudier le rôle d'un transporteur précis dans la

pharmacocinétique et dans les interactions médicamenteuses. Cependant, l'interprétation des résultats issus des études chez l'animal reste limitée par la variabilité interspèce. Par exemple, le méthotrexate est principalement éliminé par sécrétion biliaire chez le rat ou la souris alors que l'élimination par voie rénale prédomine chez l'homme (Fuksa et al., 2010). De plus, non seulement différents profils d'expression des transporteurs ont été observés entre les espèces animales précliniques et l'homme, que ce soit au niveau hépatique, rénal ou de la BHE (Bleasby et al., 2006 ; Chu et al., 2013 ; Wang et al., 2015 ; Basit et al., 2019), mais leurs fonctions de transport peuvent également varier : bien que le transport des substrats de OAT1 sont similaires chez le rat, singe et l'homme, certains substrats d'OAT3, comme la famotidine, sont en revanche moins bien excrétés chez le rat que chez l'homme (Shitara et al., 2006). Ces différences interspèces expliquent l'absence d'inhibition de l'élimination rénale de la famotidine par le probénécide chez le rat, alors que l'interaction existe chez l'homme (Figure 50).

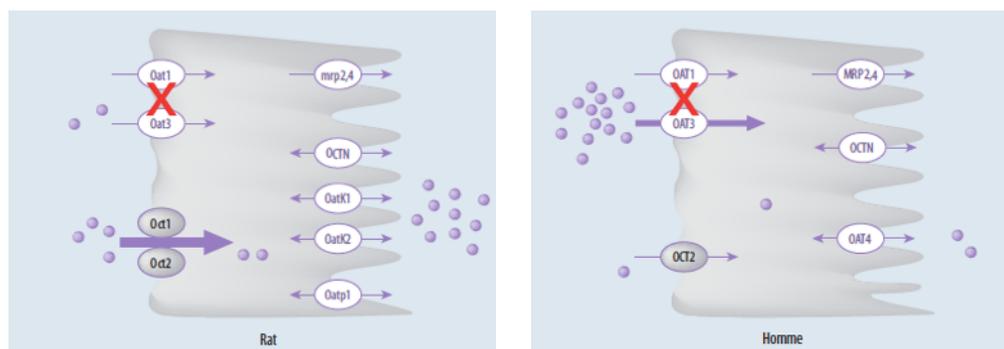


Figure 50. Variabilité d'identification d'une interaction médicamenteuse selon l'espèce (d'après Le Guellec et Benz, 2011)

Le modèle *in vivo* humain représente le modèle le plus complet et le plus proche de la réalité, permettant notamment d'étudier la pertinence clinique de potentielles interactions médicamenteuses. En effet, le modèle humain rend possible l'étude des processus ADME dans leur ensemble, en prenant en compte de nombreux paramètres tels que le transport d'influx, le transport d'efflux ou encore le métabolisme. Cependant, l'important recouvrement de substrats/inhibiteurs entre les différents transporteurs d'une part, et entre les transporteurs et les enzymes du métabolisme d'autre part, ne permet pas d'évaluer la contribution précise d'un transporteur donné ni d'identifier la part d'une interaction liée aux transporteurs et celle liée au métabolisme chez l'homme.

En conclusion, ce troisième chapitre décrit les différents modèles *in vitro* et *in vivo* permettant l'étude du transport des médicaments. Chaque modèle apporte des informations complémentaires pour étudier les différents acteurs de la pharmacocinétique des médicaments. Bien qu'ils possèdent certaines limites, les modèles *in vitro* occupent une place indispensable dans l'évaluation de la prise en charge des médicaments par les transporteurs membranaires. Il est donc important de bien les caractériser au niveau pharmacologique. Le chapitre suivant développera les différentes techniques qui permettent d'évaluer l'expression et/ou de quantifier les transporteurs ABC dans ces modèles d'étude.

Chapitre 4 : Les méthodes de quantification des transporteurs ABC

De nombreux modèles *in vitro* d'origines diverses sont disponibles pour étudier le rôle des transporteurs ABC. Quel que soit le modèle cellulaire utilisé, il est essentiel de pouvoir vérifier l'expression des transporteurs voire de les quantifier précisément pour interpréter les données issues des études de transport. De nombreuses techniques, plus ou moins récentes, ont été développées pour évaluer l'expression des protéines de manière directe ou indirecte, comme le western blot, les techniques immuno-enzymatiques, la PCR et la spectrométrie de masse.

1. Le western blot

1.1. Principe de la technique et applications aux modèles cellulaires

Le western blot, également appelé immunoblot, est la technique de référence largement utilisée pour détecter et analyser des protéines dans un échantillon. Bien qu'il possède de nombreuses étapes (Figure 51), le western blot comporte schématiquement trois principales étapes.

La première étape consiste en une séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en fonction de leur poids moléculaire et de leur charge. La concentration optimale de polyacrylamide dans le gel est un paramètre critique pour obtenir une bonne séparation des protéines et dépend de la gamme de poids moléculaires à détecter. Par exemple, un gel à 10% d'acrylamide permet de séparer des protéines ayant une taille de 20 à 300 kDa tandis qu'un gel à 15% permet de détecter des protéines de taille comprise entre 3 et 100 kDa (Kurien et Scofield, 2006).

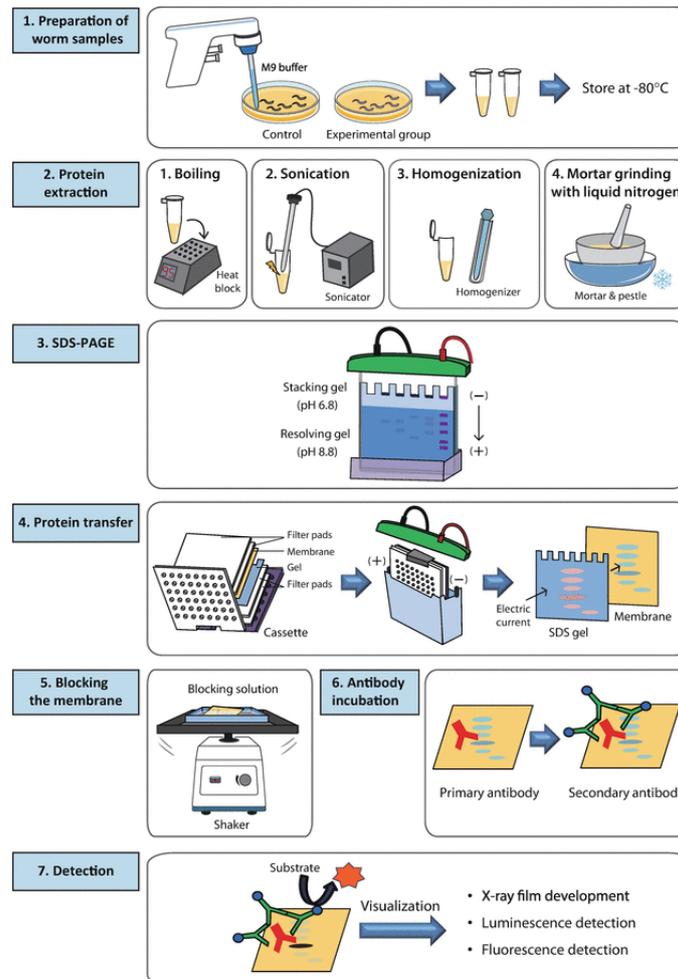


Figure 51. Représentation schématique des différentes étapes d'un western blot (d'après Jeong et al., 2018)

La deuxième étape représente le transfert des protéines à partir du gel d'électrophorèse sur une membrane en nitrocellulose ou en polyvinylidène difluoride (PVDF). Les membranes en nitrocellulose ont l'avantage d'être moins coûteuses et ne nécessitent pas d'activation préalable au méthanol contrairement aux membranes PVDF. Cependant, les membranes PVDF sont plus hydrophobes que les membranes en nitrocellulose ce qui leur confère une affinité de liaison plus importante. De plus, la composition du tampon de transfert joue un rôle important dans l'efficacité de transfert (Bolt et Mahoney, 1997 ; Mozdzanowski et al., 1992). Par exemple, l'ajout de SDS dans ce tampon facilite le transfert des protéines, particulièrement celles de haut poids moléculaire, mais diminue parallèlement la liaison des protéines à la membrane. Il est d'ailleurs déconseillé de l'utiliser avec les membranes en nitrocellulose (Jeong et al., 2018). De même, le méthanol augmente la capacité de liaison de la nitrocellulose, mais il peut diminuer l'efficacité d'éluion des protéines de haut poids moléculaire en les fixant partiellement dans le gel (Gershoni et Palade, 1983).

Finally, the last step is the detection and revelation of proteins of interest by the use of specific antibodies. Primary antibodies can be polyclonal or monoclonal. In this case, they are directed specifically against a particular epitope of the protein of interest. The primary antibody/protein complexes are generally not detectable and their revelation requires the addition of a second antibody, called secondary antibody, directed against the primary antibody. Secondary antibodies commonly used for Western blot analysis are conjugated with enzymes, such as horseradish peroxidase (HRP) and alkaline phosphatase (AP). These secondary antibodies allow visualization of primary antibody-protein targets through enzymatic reactions that produce luminescent or colorimetric compounds (Blake et al., 1984).

Western blot is widely used for the detection of proteins such as membrane transporters in cell or tissue extracts. This technique has notably allowed demonstration of the expression of efflux transporters such as Pgp, BCRP and MRPs but also of influx transporters such as OCT2 on human corneal epithelial cells (Vellonen et al., 2010) (Figure 52), on Caco-2 cells (Gutmann et al., 1999), on native MDCK cells or transfected cells (Luo et al., 2002) (Figure 53) as well as on human renal epithelial cells (Huls et al., 2008 ; Wilmer et al., 2010). Western blot also allows study of transporter expression variations. For example, Poller et al. showed regulation of Pgp and BCRP expression by inflammatory cytokines on a *in vitro* model of human BHE (Poller et al., 2010).

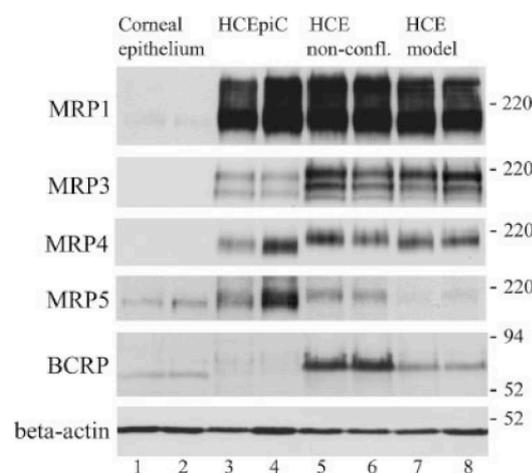


Figure 52. Exemple de détection de BCRP et des MRPs par western blot sur des cellules épithéliales cornéennes (d'après Vellonen et al., 2010).

Puits 1 et 2 : tissu épithélial cornéen humain, Puits 3 et 4 : cellules HCEpiC, Puits 5 et 6 : cellules HCE non confluentes cultivées en flasques, Puits 7 et 8 : cellules HCE stratifiées cultivées sur inserts.

La β -actine sert de contrôle pour la normalisation.

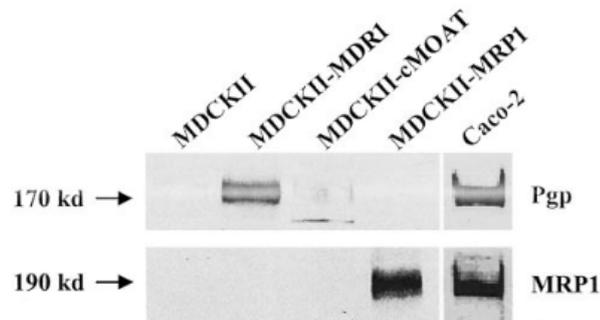


Figure 53. Détection de P-gp et MRP1 par western blot sur les cellules Caco-2 et MDCKs (d'après Luo et al., 2002).

1.2. Avantages et limites de la technique

Le western blot a l'avantage de séparer le mélange protéique par taille, charge et/ou conformation. Cette méthode permet de détecter simultanément plusieurs cibles par l'utilisation d'anticorps spécifiques de chaque protéine d'intérêt et d'une échelle de poids moléculaires connus. La taille de la protéine cible est déterminée grâce à la séparation des protéines en bandes lors de l'électrophorèse sur gel. Il est aussi possible de semi-quantifier la protéine d'intérêt grâce à une étape de normalisation par la charge protéique. Pour cela, une protéine dont l'expression est relativement constante et abondante dans les échantillons étudiés est utilisée comme étalon interne de la charge. Les deux contrôles internes les plus couramment utilisés sont la β -actine et la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Cependant, cette méthode de normalisation pose plusieurs problèmes. En effet, l'expression de la protéine de contrôle peut différer entre les échantillons, elle ne permet pas de détecter efficacement les variations d'efficacité de transfert et elle nécessite une étape supplémentaire longue et coûteuse (Dittmer et Dittmer, 2006). Pour pallier ces problèmes, des méthodes de normalisation par la quantité de protéines totales transférées sur la membrane ont été proposées et semblent plus adaptées. Pour cela, différentes colorations servant habituellement à vérifier l'efficacité du transfert comme le rouge Ponceau (Romero-Calvo et al., 2010) ou le Coomassie (Welinder et Ekblad, 2011) peuvent être utilisées. Récemment, Taylor et al. ont proposé une méthodologie de validation des différentes étapes du western blot afin d'obtenir des données quantitatives fiables et de bonne qualité (Taylor et al., 2013).

Un des principaux inconvénients du Western blot réside dans l'évaluation semi-quantitative de l'expression des protéines. Il permet de comparer relativement la quantité d'une protéine entre différents échantillons mais pas de quantifier de façon absolue son expression.

De plus, c'est une technique coûteuse en temps et qui exige de l'expérimentateur une solide expérience. En outre, il requiert une optimisation des nombreuses conditions expérimentales telles que l'extraction des protéines, la composition des tampons, le type de séparation, la composition du gel d'électrophorèse, le type de membrane et le choix des anticorps primaires et secondaires.

2. La technique immuno-enzymatique

2.1. Principe général de l'ELISA

La technique « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » (ELISA) est une technique immuno-enzymatique qualitative et quantitative permettant de mettre en évidence une protéine particulière présente dans un échantillon biologique. Elle permet de détecter des antigènes ou des anticorps en utilisant leur relation complémentaire. Comme pour le western blot, la technique ELISA utilise schématiquement deux anticorps. L'anticorps primaire est spécifique de l'antigène étudié et l'anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps primaire, est couplé à une enzyme qui produira un signal par métabolisation d'un substrat chromogène. Les enzymes le plus souvent couplées aux anticorps secondaires sont l'HRP, l'AP, la glucose oxydase ou la β -galactosidase (Aydin, 2015 ; Liu et al., 2000). Il existe de nombreuses variations de la technique ELISA.

L'ELISA sur cellules entières est une adaptation de la technique ELISA directe, dont le principe général est la détection d'un antigène cible réalisée directement sur l'ensemble du tapis cellulaire (Figure 54). En fonction de la protéine cible, elle permet de détecter des épitopes externes ou internes lorsque les cellules sont perméabilisées. Pour cette technique, il est important de normaliser les résultats obtenus par la quantité totale de protéines présente dans chaque puits de culture, afin de s'assurer que la différence d'expression observée n'est pas liée à une variation de la quantité de cellules entre les différents puits.

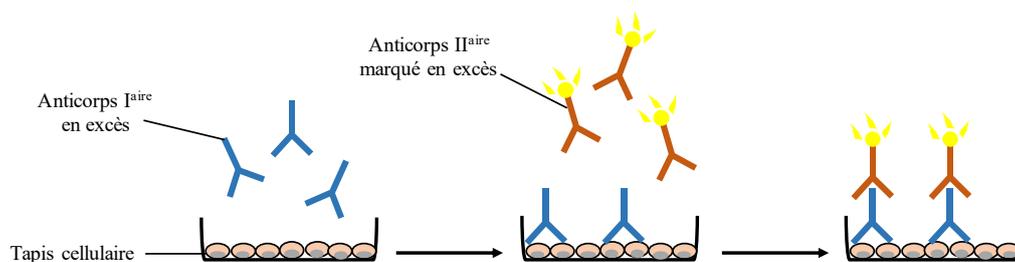


Figure 54. Schéma du principe de l'ELISA sur cellules entières.

C'est cette technique ELISA sur cellules entières qui est utilisée pour déterminer l'expression des ABC transporteurs sur des modèles cellulaires *in vitro*. L'expression de Pgp, BCRP, MRP1 et MRP2 a été évaluée lors de la caractérisation pharmacologique d'un modèle *in vitro* de BHE sur des cellules Hbec5i (Puech et al., 2018), ainsi que lors de la caractérisation d'un modèle pharmacologique de barrière nasale (Mercier et al., 2018). Mercier et al. ont notamment comparé l'expression de ces transporteurs dans le modèle nasal RPMI2650 à celle observée dans les cellules Caco-2 (Figure 55).

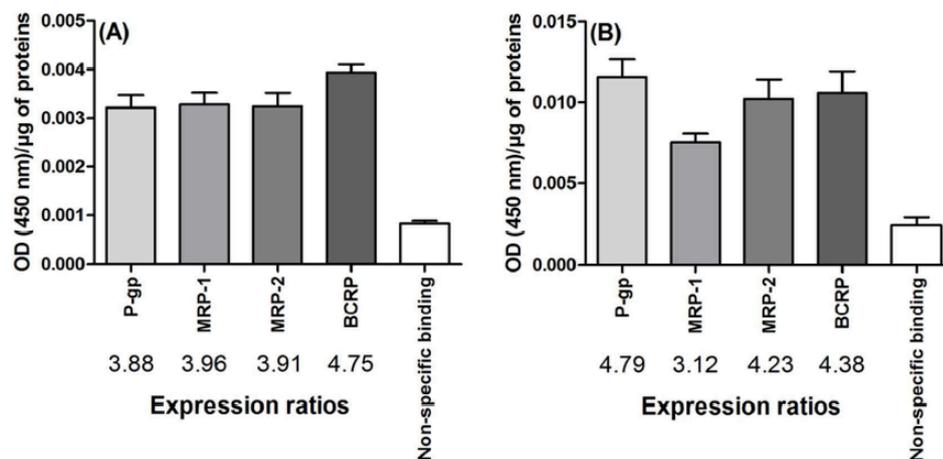


Figure 55. Expression des transporteurs Pgp, BCRP, MRP1 et MRP2 par ELISA sur cellules entières dans les modèles RPMI2650 (A) et Caco-2 (B) (d'après Mercier et al., 2018).

Les ratios d'expression sont calculés en divisant les valeurs expérimentales par la valeur du contrôle négatif, correspondant au signal dû à la fixation non spécifique de l'anticorps secondaire seul.

2.2. Avantages et limites des techniques ELISA

La technique ELISA a l'avantage de comporter moins d'étapes que le western blot et d'être plus rapide à réaliser. L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection spécifique. L'ELISA permet de quantifier les antigènes dosés grâce à la réalisation d'une gamme de calibration en parallèle. Elle offre la possibilité d'analyser des échantillons multiples en peu de temps et à faible coût. C'est une technique reproductible qui permet de détecter de faibles quantités d'antigènes (Aydin, 2015).

Chaque technique ELISA possède ses propres avantages et inconvénients. L'ELISA sur cellules entières est une technique rapide qui diminue le risque de réactivité croisée liée à l'utilisation d'anticorps secondaires lorsqu'elle utilise un anticorps primaire marqué. Cependant elle possède une faible sensibilité et peut générer des faux positifs. Le principal inconvénient

de cette approche est une possible fixation non spécifique de l'anticorps sur le support (Gan et Patel, 2013).

3. La RT-PCR

La RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) est une technique qui associe une transcription inverse suivie d'une amplification génétique *in vitro* basée sur le mécanisme de réplication de l'ADN *in vivo* : l'ADN bicaténaire est séparé en ADN monocaténaire, puis dupliqué et ré-enroulé, selon des cycles répétitifs comprenant chacun trois étapes principales (Figure 56).

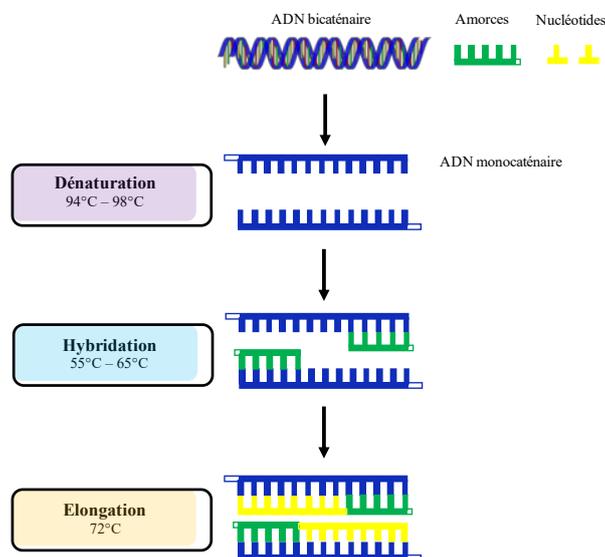


Figure 56. Principe général d'un cycle de PCR.

La RT-PCR permet de synthétiser le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante appelée transcriptase inverse. Cet ADN complémentaire est ensuite amplifié par la technique PCR. La première étape de PCR est une dénaturation de l'ADN à haute température (entre 94 et 98°C) pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire. Ensuite, deux oligonucléotides utilisés comme amorces sont hybridés à l'ADN cible à une température d'hybridation variant généralement de 55°C à 65°C. Enfin, la chaîne d'ADN est étendue par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant une ADN polymérase, la Taq polymérase, comme catalyseur. La température optimale de travail de la Taq polymérase est de 72°C (Hue-Roye et Vege, 2008).

Lorsque la transcription inverse est couplée à une technique de PCR en temps réel, elle permet de quantifier des ARN messagers (ARNm) (Gibson et al., 1996), grâce à des techniques

de quantification compétitive ou non-compétitive (Bustin, 2000). La RT-PCR quantitative est une méthode de quantification sensible qui peut être utilisée pour comparer les niveaux d'expression d'ARNm dans différentes populations d'échantillons. Elle est d'ailleurs largement utilisée pour évaluer l'expression des transporteurs ABC dans diverses populations cellulaires telles que des cellules épithéliales intestinales, des cellules rénales ou encore des lignées cellulaires pulmonaires (Albermann et al., 2005 ; Huls et al., 2008 ; Endter et al., 2009), ou pour étudier la régulation de cette expression selon différents facteurs comme par exemple la transfection (Kuteykin-Teplyakov et al., 2010). Par exemple, Maubon et al. ont comparé l'expression relative de l'ARNm de plusieurs transporteurs d'efflux et d'influx entre deux clones Caco-2 et des cellules épithéliales intestinales humaines par RT-PCR quantitative (Maubon et al., 2007). Ils ont notamment observé une différence d'expression d'un facteur au moins deux de l'ARNm de Pgp, MRP1, MRP2, OATP-B ou PEPT1 entre deux clones Caco-2 d'origine différente (Figure 57).

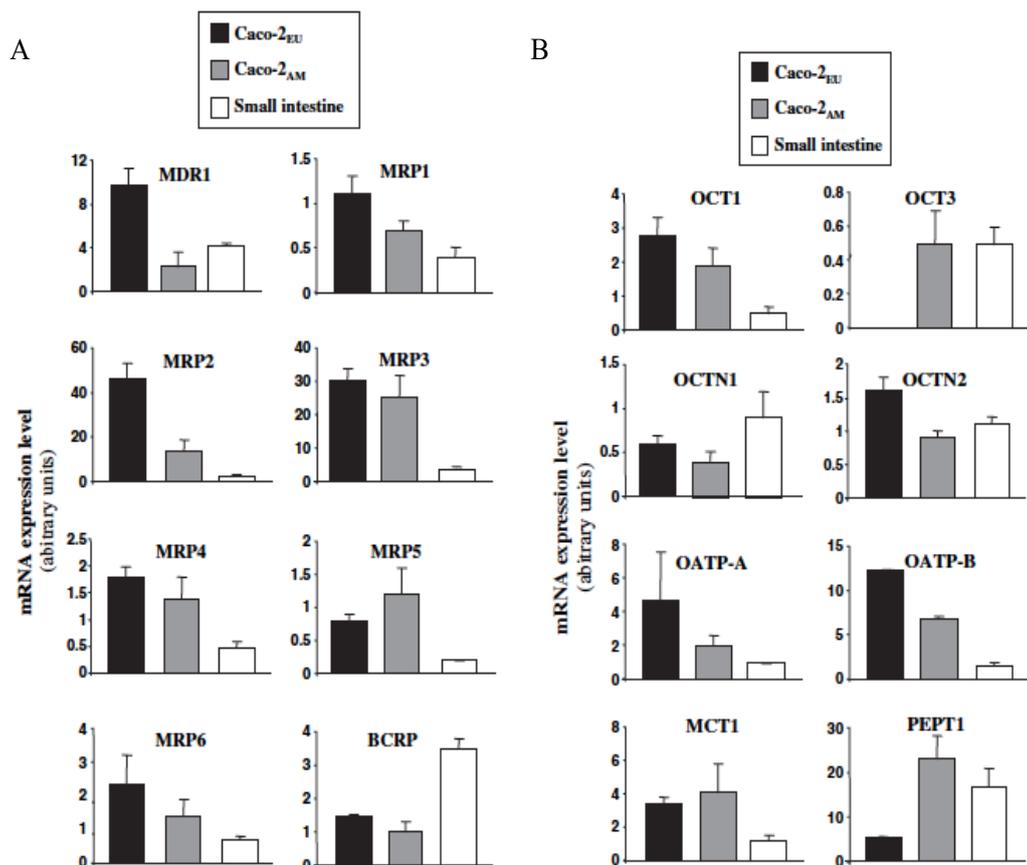


Figure 57. Expression de l'ARNm des transporteurs ABC (A) et SLC (B) dans les cellules Caco-2 et dans les cellules de l'intestin grêle par RT-qPCR (d'après Maubon et al., 2007).

Les données représentent la moyenne \pm l'écart-type des quantifications réalisées sur deux cultures indépendantes, chacune analysée en triplicat. Elles sont exprimées en unités arbitraires, une unité arbitraire correspondant pour chaque transporteur au niveau d'ARNm trouvé dans l'ARN total humain de référence.

Cette technique est généralement utilisée en association à d'autres techniques protéomiques comme le western blot ou la spectrométrie de masse.

4. La spectrométrie de masse

4.1. Principe de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur rapport masse/charge, et de caractériser leur structure chimique. Schématiquement, le spectromètre de masse comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z et les fragmentent éventuellement, d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système informatique qui traite le signal (Figure 58). Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe de ordonnées.

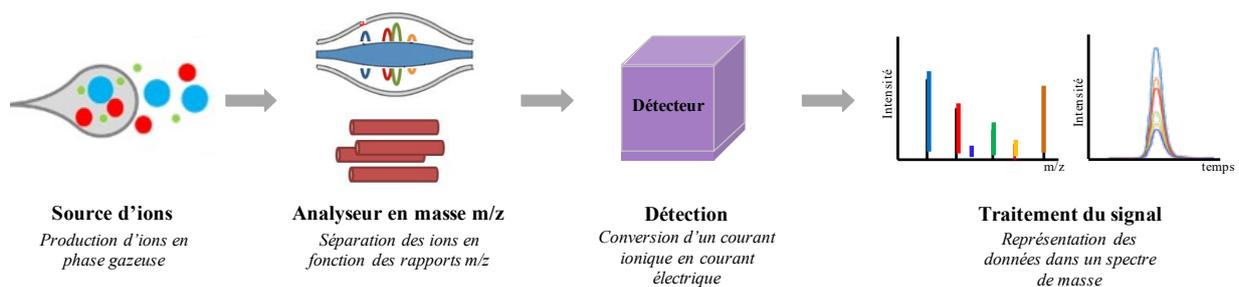


Figure 58. Représentation schématique du principe général d'un spectromètre de masse.

Plusieurs technologies sont aujourd'hui disponibles en fonction de la source d'ionisation et du type d'analyseur. L'ionisation des molécules est une étape cruciale de la spectrométrie de masse. Cette étape consiste à vaporiser les molécules d'un échantillon et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Plusieurs types de sources existent et sont utilisés en fonction du résultat recherché et des molécules analysées, les plus utilisées étant l'électrospray (ESI) (Kearle, 2000) et la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) (Karas et al., 1987 ; Strupat et al., 1991). En plus d'identifier les protéines, la source MALDI a l'avantage de permettre une localisation de la protéine au sein d'un tissu et devient donc aussi une technique d'imagerie (Walch et al., 2008).

Les analyseurs permettent de séparer et/ou fragmenter les ions produits. Ils se différencient par leur principe de mesure du rapport m/z des ions. Ce principe de mesure peut s'appuyer sur la transmission des ions traversant un champ électrodynamique (le quadripôle), la séparation des ions dans le temps selon leur vitesse (le temps de vol) ou encore le mouvement périodique des ions dans un champ magnétique ou électrodynamique (trappe ionique) (Figure 59).

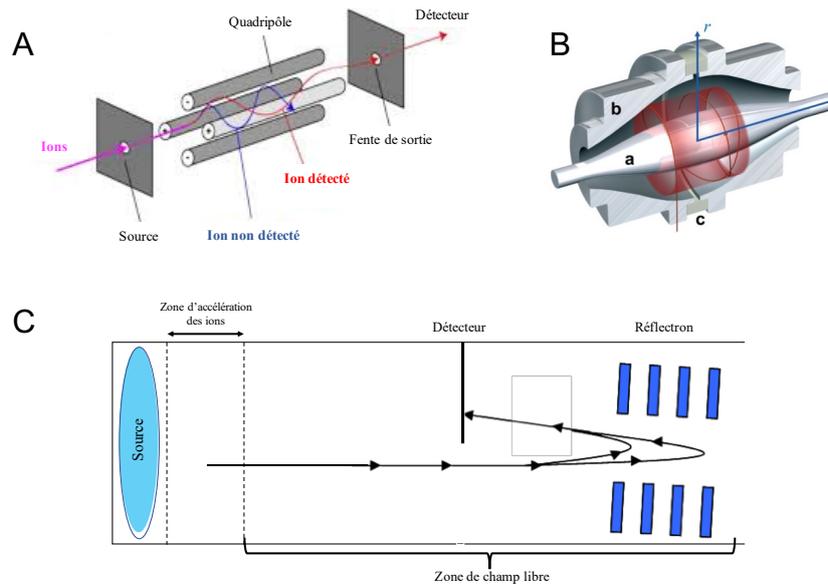


Figure 59. Représentations schématiques des analyseurs en spectrométrie de masse. (A) Quadripôle, (B) Orbitrap, (C) Analyseur à temps de vol (ToF).

L'analyseur de masse de type quadripôle est constitué de quatre électrodes parallèles à section circulaire ou hyperbolique (Figure 59A). L'opération de filtrage de masse est obtenue par l'application d'un potentiel de courant continu et de courant alternatif combinés, appliqué entre les deux tiges opposées reliées électriquement (Miller et Denton, 1986). En pénétrant dans le quadripôle, les ions conservent leur vitesse longitudinale et progressent alors dans l'analyseur. La différence de potentiel entre l'entrée et la sortie du quadripôle guide les ions dans la direction voulue, et seuls les ions de valeur m/z définie auront une trajectoire stable jusqu'au détecteur et seront détectés.

L'analyseur à temps de vol (ToF pour Time-of-Flight) consiste à mesurer le temps que met un ion, accéléré préalablement par une tension, à parcourir une distance donnée. Le rapport m/z est directement mesurable à partir du temps de vol. Un analyseur ToF se compose d'une zone d'accélération où est appliquée une tension accélératrice, et d'une zone appelée tube de vol

ou zone de champ libre (Figure 59C). La séparation des ions ne va donc dépendre que de la vitesse acquise lors de la phase d'accélération.

Enfin, l'Orbitrap est un analyseur de masse de type trappe ionique, composé d'une électrode interne centrale en forme de broche et d'une électrode externe en forme de barillet pour générer un champ électrostatique (Scigelova et Makarov, 2006) (Figure 59B). La fréquence d'oscillation harmonique d'un ion le long de l'axe des z (autour de l'électrode interne) dépend de son rapport m/z et du potentiel entre les électrodes. La fréquence des ions est mesurée en enregistrant le courant généré entre deux électrodes de détection placées le long de l'axe z, suivi par une transformation du signal mesuré par une transformée de Fourier (Scigelova et Makarov, 2006).

Différents modes d'acquisition ont été développés pour la quantification en spectrométrie de masse. Parmi eux, on distingue les modes « Data Independent Acquisition » (DIA) et « Data Dependent Acquisition » (DDA), offrant une approche non ciblée, et les modes « Multiple Reaction Monitoring » (MRM) et « Parallel Reaction Monitoring » (PRM) proposant une approche ciblée (Figure 60).

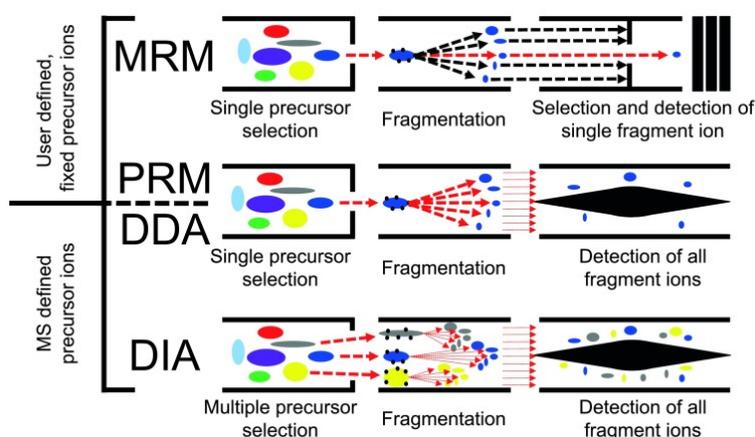


Figure 60. Représentation schématique des principaux modes d'acquisition des données pour la quantification (d'après Hu et al., 2016)

4.2. Application à la quantification des transporteurs membranaires

La spectrométrie de masse est très développée dans le domaine de la quantification de petites molécules, comme les médicaments, et prend une place de plus en plus importante dans la détection et la quantification de macromolécules comme les protéines. Pour pouvoir être analysées en spectrométrie de masse, les protéines doivent au préalable subir plusieurs

traitements aboutissant au final à la production de peptides qui pourront être ionisés puis quantifiés.

4.2.1. Préparation des échantillons

De nombreuses préparations d'échantillons à partir d'extraits cellulaires ou tissulaires ont été décrites dans la littérature (Gundry et al., 2010). Dans le cas des transporteurs membranaires, il est tout d'abord intéressant d'enrichir notre échantillon, en isolant la fraction protéique membranaire de la fraction cytosolique. Pour cela, plusieurs protocoles et kits commerciaux sont disponibles. Ensuite, il est possible soit de réaliser le protocole de digestion des protéines directement sur la solution protéique, c'est ce qu'on appelle la digestion en solution, soit de séparer préalablement les protéines par une électrophorèse en gel, on parle alors de digestion en gel (Granvogl et al., 2007). Cette étape d'électrophorèse permet d'isoler la ou les protéines d'intérêt et de diminuer la complexité de l'échantillon, mais elle rajoute des étapes pouvant biaiser la quantité de protéines (Leon et al., 2013). Le protocole de digestion protéique comporte plusieurs étapes communes à toutes les méthodes de préparation. La première étape consiste à dénaturer les protéines et à réduire les ponts disulfures à l'aide d'un agent réducteur qui convertit la liaison disulfure des cystéines en groupes sulfhydryle libres, comme par exemple le dithiothréitol. Ensuite, la deuxième étape consiste à bloquer les résidus cystéines grâce à un agent alkylant, tel que l'iodoacétamide, qui réagit avec les groupes sulfhydryles libres des résidus cystéine pour former la S-carboxyamidométhyl-cystéine, qui ne peut être réoxydée pour former des liaisons disulfures (Gundry et al., 2010 ; Aitken et Learmonth, 2002). Cette étape est essentielle pour permettre à l'enzyme un accès maximal aux sites de clivage au sein de la protéine. Enfin, la dernière étape est celle de la digestion enzymatique à l'aide de diverses protéases, la plus utilisée étant la trypsine. Une deuxième enzyme comme la Lys-C peut être utilisée en complément afin de renforcer l'action de la trypsine. Il est également possible d'ajouter une étape de dessalage après la digestion afin d'enlever les éventuelles traces de sels et détergents. Toutes ces étapes aboutissent à la formation de peptides de différentes longueurs, prêts à être quantifiés de manière relative ou absolue en spectrométrie de masse.

4.2.2. La quantification relative

La quantification relative est possible avec tous les modes d'acquisition existant. Dans la quantification relative, la quantité d'une protéine est exprimée comme une variation de l'abondance entre deux états différents, par exemple résultant d'une exposition différente à un traitement médicamenteux. Plusieurs techniques de quantification relative ont été développées (Ong et Mann, 2005 ; Bantscheff et al., 2007). Schématiquement, les deux principales approches reposent soit sur la quantification sans marqueur ou « label-free », soit sur l'utilisation d'isotopes stables des protéines et /ou des peptides.

La quantification label-free est la méthode la plus simple à mettre en œuvre. Cette approche consiste à mesurer et comparer l'intensité du signal de spectrométrie de masse des ions précurseurs ou des ions fragments de peptides appartenant à une protéine particulière (Neilson et al., 2011). Bien qu'elle soit peu utilisée pour la quantification des transporteurs, Mercier et al. ont opté pour la quantification label-free afin de comparer le niveau d'expression des transporteurs ABC entre le modèle Caco-2 et un modèle de culture primaire de barrière nasale (Mercier et al., 2019) (Figure 61).

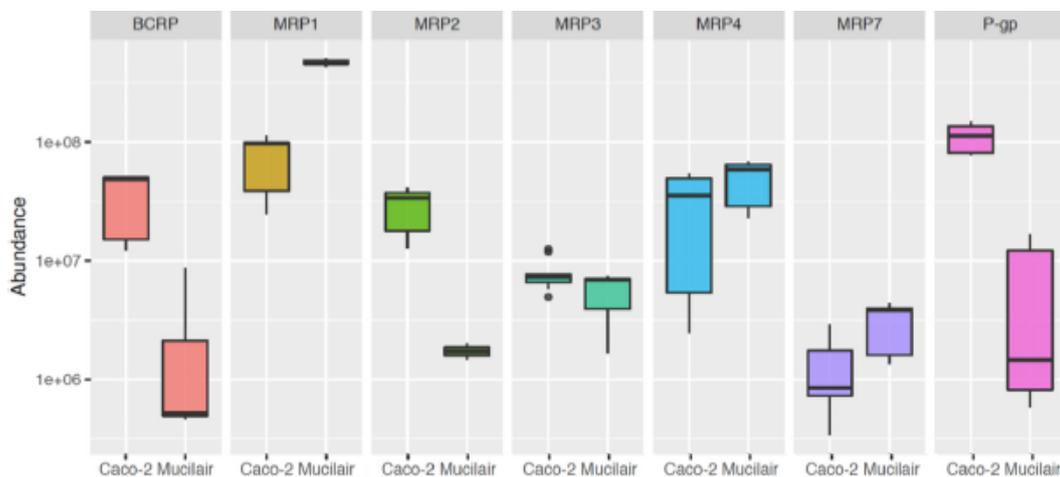


Figure 61. Quantification relative des transporteurs ABC dans les cellules Caco-2 et le modèle MucilAir™ (d'après Mercier et al., 2019).

Le principal inconvénient de cette approche est une précision relativement faible, due aux variations entre les échantillons à tous les niveaux du processus expérimental qui impacte significativement les données obtenues (Bantscheff et al., 2007).

Les stratégies de marquages avec des isotopes stables sont très utilisées. Elles se distinguent principalement par la façon dont les marqueurs isotopiques stables sont introduits comme étalon interne dans les acides aminés par voie métabolique, chimique, ou enzymatique, ou alternativement comme étalon externe en utilisant des peptides synthétiques marqués (Ong et Mann, 2005). Une première approche consiste à modifier chimiquement les deux protéomes à l'étude, l'un avec un réactif léger et l'autre avec un réactif marqué. Plusieurs méthodes de marquage ont été développées, comme par exemple l'ICPL (isotope-coded protein label) (Schmidt et al., 2005), les tags isobariques pour quantification relative et absolue (iTRAQ) (Ross et al., 2004 ; Wiese et al., 2007) et les tags pour spectrométrie en tandem (TMT) (Thompson et al., 2003). Cette approche présente l'avantage de pouvoir analyser plusieurs échantillons en une seule analyse, chaque échantillon étant lié à un tag spécifique. Une deuxième stratégie utilisée est l'incorporation d'isotopes par voie métabolique, par apport d'acides aminés marqués avec des isotopes stables dans le milieu de culture cellulaire (méthode SILAC) (Ong et al., 2002). Grâce à la croissance cellulaire et au renouvellement des protéines, ces acides aminés marqués sont incorporés au fur et à mesure dans toutes les protéines cellulaires. L'un des principaux avantages de l'incorporation métabolique par rapport au marquage chimique est que l'isotope est présent dans les cellules vivantes. Ainsi, les deux populations cellulaires peuvent être mélangées avant les différentes étapes de préparation d'échantillon, excluant les sources d'erreur de quantification liées aux étapes pré-analytiques et analytiques.

Bien que la quantification relative soit simple à mettre en œuvre, la quantification des transporteurs membranaires est surtout réalisée de manière absolue.

4.2.3. La quantification absolue

La quantification absolue est la détermination de la quantité précise d'une protéine, par exemple en ng/ml pour un biomarqueur ou en fmol/ μ g pour les protéines d'une cellule. Elle repose sur la méthode AQUA (pour Absolute Quantification) qui utilise des étalons internes synthétiques marqués isotopiquement (Gerber et al., 2003 ; Brönstrup, 2004). Cette méthode est analogue à la technique de quantification des petites molécules en spectrométrie de masse. Un peptide marqué par un isotope stable, chimiquement identique à son homologue natif, est ajouté en quantité connue dans l'échantillon peptidique. La quantification se fait alors sur la base du rapport du signal du peptide léger sur le signal du peptide lourd. La méthode de quantification absolue est la plus répandue pour la quantification des transporteurs ABC.

Bien que les modes DDA et DIA soient plus appropriés à la quantification relative et au screening, ils représentent également des approches intéressantes pour étudier le protéome de cellules *in vitro*. Par exemple, Ölander et al. ont étudié l'expression de protéines impliquées dans la pharmacocinétique des médicaments dans des cellules Caco-2 cultivées sur inserts en utilisant le mode DDA (Ölander et al., 2016). Ils ont réussi à quantifier de nombreuses protéines pouvant être impliquées dans le processus ADME des médicaments, notamment les transporteurs SLC et ABC (Figure 62).

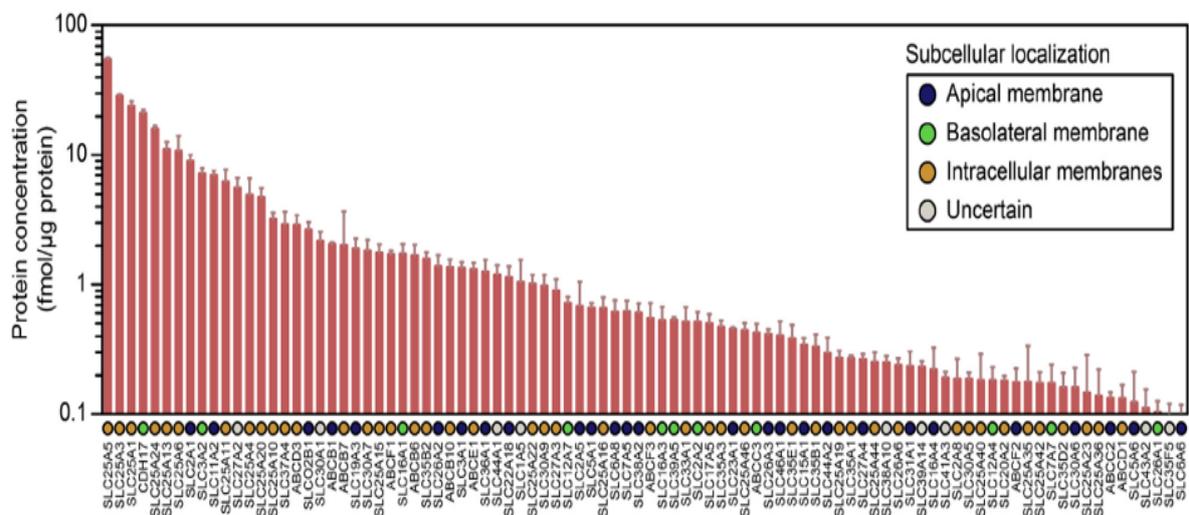


Figure 62. Quantification et localisation subcellulaire des transporteurs ABC et SLC dans les cellules Caco-2 (d'après Ölander et al., 2016)

Seuls les transporteurs ayant une concentration supérieure à 0,1 fmol/μg de protéines sont représentés.

Nakamura et al. ont récemment réussi à quantifier simultanément vingt-sept enzymes du métabolisme et cinquante-quatre transporteurs dans des microsomes humains de rein, de foie et d'intestin par une approche DIA (Nakamura et al., 2016) (Figure 63).

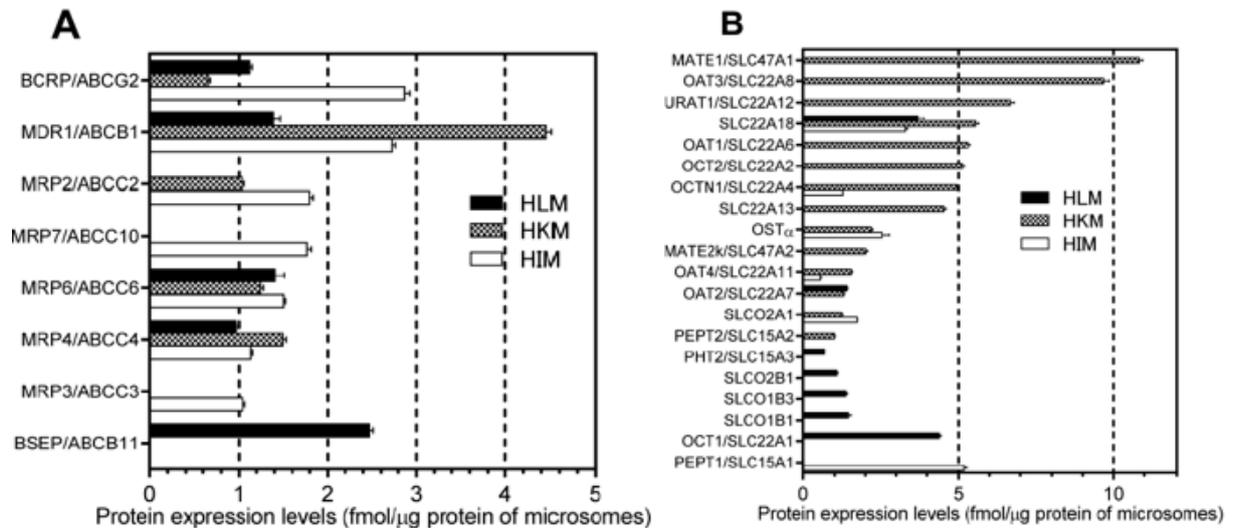


Figure 63. Quantification des transporteurs ABC (A) et SLC (B) dans des microsomes hépatiques, rénaux et intestinaux humains par une approche DIA (d'après Nakamura et al., 2016).

HLM=microsomes hépatiques, HKM=microsomes rénaux, HIM=microsomes intestinaux

Un autre mode d'acquisition, la méthode SIM peut être utilisée pour quantifier les protéines. Il s'agit d'un mode de détection dans lequel seule une plage de rapport m/z limitée et définie est transmise puis détectée par le spectromètre, sans fragmentation du précurseur (Gallien et al., 2012). Plus la plage de masse est étroite, plus la détection est spécifique. Lorsque cette plage de masse est très réduite, voire correspond au rapport m/z souhaité, on parle de targeted-SIM (t-SIM). Cette technique est peu répandue actuellement pour la quantification des transporteurs car elle n'est disponible que sur les spectromètres de masse à haute résolution. Récemment, Weiss et al. ont développé une méthode de quantification des cytochromes et transporteurs présents au niveau de tissus hépatiques associant une technique d'immunodosage et la spectrométrie de masse en mode t-SIM. (Weiss et al., 2018) (Figure 64).

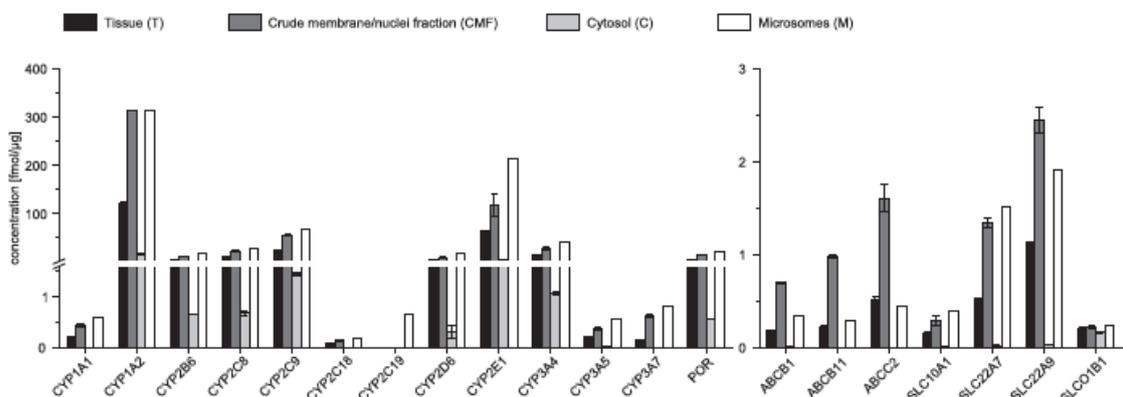


Figure 64. Quantification des cytochromes P450 et des transporteurs à partir de tissus hépatiques (d'après Weiss et al., 2018)

Cependant, la technique de quantification absolue la plus répandue reste celle basée sur le mode MRM. La quantification des transporteurs ABC et SLC est très largement développée avec cette méthode. Par exemple, Uchida et al. ont réussi à quantifier jusqu'à vingt-huit transporteurs membranaires sur du tissu rénal murin (Uchida et al., 2016) et sur des cellules Caco-2 à 14, 21 et 28 jours de culture sur insert (Uchida et al., 2014) (Table 7).

Table 7. Niveau d'expression de 10 transporteurs membranaires dans les cellules Caco-2 en fonction de leur temps de culture sur insert (d'après Uchida et al., 2014).

Classification	Molecular names	Protein expression level (fmol/ μ g protein)		
		2 weeks	3 weeks	4 weeks
High expression	MDR1/ABCB1	4.14 \pm 0.24	4.15 \pm 0.33	5.08 \pm 0.34
	OST β /SLC51B	1.86 \pm 0.11	2.16 \pm 0.17	2.08 \pm 0.21
	BCRP/ABCG2	2.32 \pm 0.15	1.79 \pm 0.15	1.74 \pm 0.14
	OST α /SLC51A	1.56 \pm 0.12	1.51 \pm 0.06	1.51 \pm 0.10
	PEPT1/SLC15A1	1.67 \pm 0.23	1.48 \pm 0.21	1.55 \pm 0.17
Moderate expression	MCT1/SLC16A1	0.707 \pm 0.031	0.871 \pm 0.029	0.838 \pm 0.047
	OATP2B1/SLC21A9	0.672 \pm 0.087	0.771 \pm 0.139	0.820 \pm 0.149
	MRP2/ABCC2	0.704 \pm 0.044	0.649 \pm 0.064	0.696 \pm 0.058
	MRP4/ABCC4	0.390 \pm 0.011	0.328 \pm 0.023	0.367 \pm 0.027
Membrane marker protein	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	36.7 \pm 2.5	45.4 \pm 2.7	39.8 \pm 2.3

Certaines études se sont concentrées sur la validation d'une méthode de quantification précise d'un seul transporteur, comme MRP2 (Li et al., 2008) ou P-gp (Zhang et al., 2011) sur les lignées cellulaires MDCK natives et transfectées, ou sur du tissu mammaire sain et cancéreux (Yang et al., 2014). A l'inverse, d'autres études ont quantifié plusieurs transporteurs et/ou enzymes afin d'établir un profil d'expression de ces protéines dans divers types d'échantillons cellulaires ou tissulaires. De nombreuses études rapportent la quantification de transporteurs et/ou récepteurs au niveau de la BHE (Gomez-Zepeda et al., 2019 ; Uchida et al., 2011 ; Ohtsuki et al., 2013). Par exemple, Ohtsuki et al. ont utilisé la spectrométrie de masse afin de caractériser un modèle cellulaire de BHE *in vitro*, en quantifiant des transporteurs et des récepteurs exprimés sur les cellules hCMEC/D3 et en les comparant à la quantité retrouvée au niveau de la BHE *in vivo* (Ohtsuki et al., 2013) (Figure 65). Ils en ont conclu que le modèle hCMEC/D3 possède un profil d'expression des transporteurs similaire à celui de la BHE, à l'exception de MRP1, ce qui en fait un bon modèle pour étudier le transport des médicaments à travers la BHE.

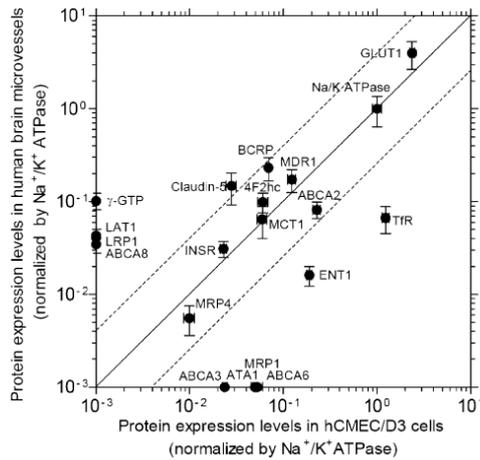


Figure 65. Comparaison de la quantité de transporteurs et récepteurs entre les cellules hCMEC/D3 et des microvaisseaux cérébraux humains (d'après Ohtsuki et al., 2013)

D'autres équipes se sont intéressées à la quantification des transporteurs ABC et SLC impliqués dans l'absorption intestinale des médicaments (Gröer et al., 2013) (Figure 66). Ils ont ainsi démontré des différences d'expression en fonction de la partie de l'intestin considérée, avec une expression globalement plus importante des transporteurs SLC au niveau de l'iléum.

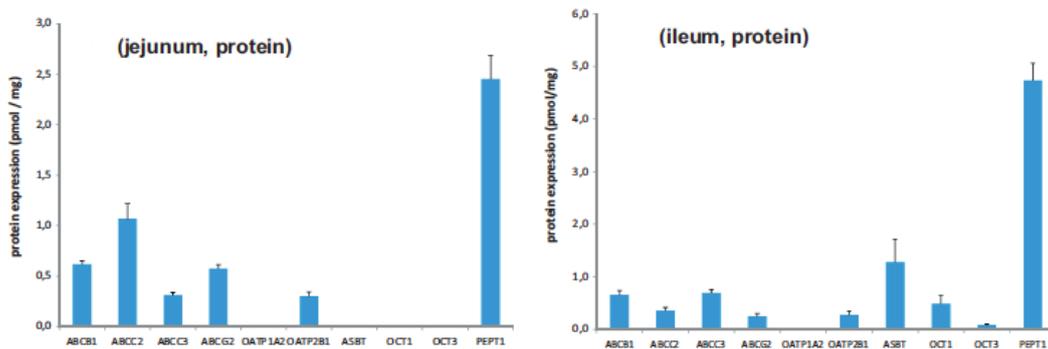


Figure 66. Quantification des transporteurs ABC et SLC dans le jéjunum et l'iléum humains (d'après Gröer et al., 2013)

Des études semblables ont été conduites sur des échantillons de tissus hépatiques humains ou des cultures primaires d'hépatocytes humains (Ohtsuki et al., 2012 ; Schaefer et al., 2012). Dans les deux cas, les quantités de cytochromes P450 et de transporteurs ont été déterminées à partir de la fraction microsomale et de la fraction membranaire des hépatocytes, respectivement. Enfin, le rein étant un site d'élimination important des médicaments, plusieurs études se sont concentrées sur la quantification des transporteurs membranaires au niveau du cortex rénal (Prasad et al., 2016 ; Basit et al., 2019). Basit et al. ont comparé la quantité de dix-neuf transporteurs ABC et SLC présents au niveau du cortex rénal chez l'homme et quatre espèces animales utilisées dans les études précliniques, dont la souris, le rat, le chien et le singe

(Basit et al., 2019) (Figure 67). Ils ont démontré que les quantités de transporteurs peuvent fortement varier selon l'espèce considérée, ce qui peut biaiser les études de toxicité rénale ou de pharmacocinétique chez certaines espèces et leur extrapolation à l'homme.

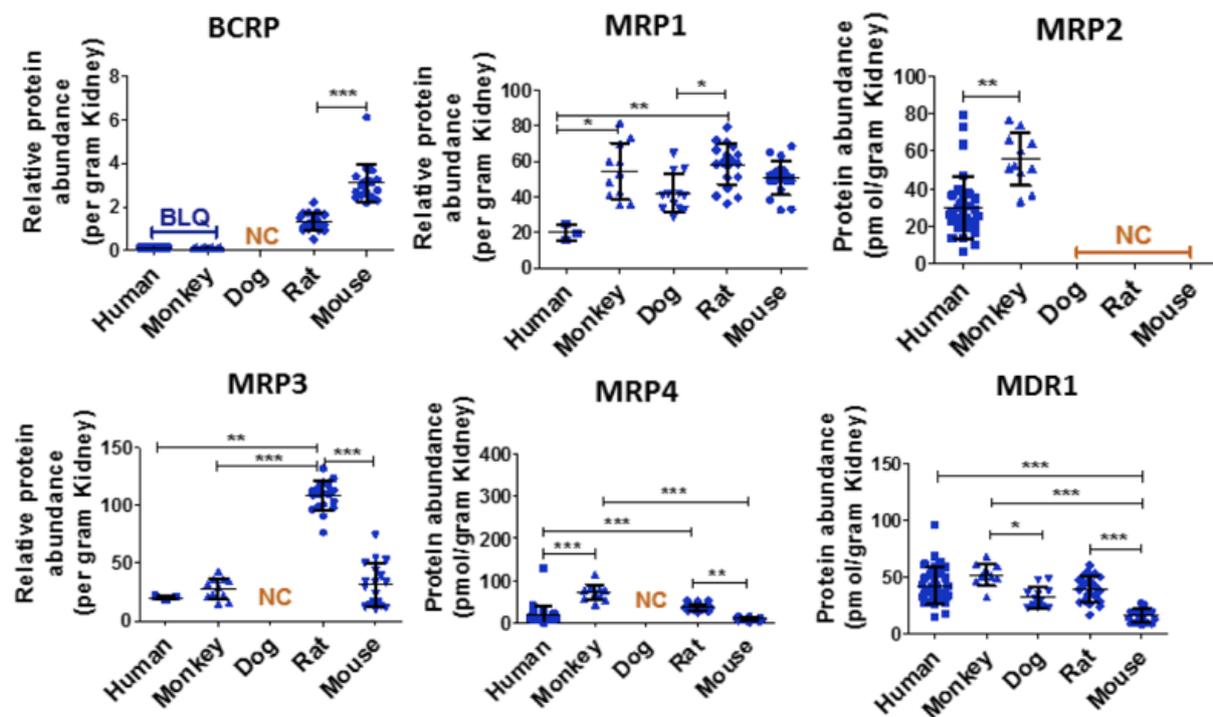


Figure 67. Quantification de six transporteurs ABC dans le cortex rénal de cinq espèces (d'après Basit et al., 2019)

En conclusion, ce dernier chapitre décrit les principales techniques de quantification disponibles pour évaluer l'expression des transporteurs dans des échantillons variés. A côté des techniques plus anciennes, la spectrométrie de masse prend une place de plus en plus importante dans la quantification relative mais surtout précise des protéines et devient un outil incontournable. Elle est capable de quantifier les transporteurs ABC dans différents types cellulaires ainsi que dans une grande variété de tissus animaux et humains. L'ensemble de mes travaux personnels s'intéressera particulièrement aux rôles de la P-gp et de BCRP dans la pharmacocinétique du rivaroxaban, ainsi qu'aux modèles permettant de l'étudier *in vitro*.

PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre 1 : Étude d'interaction médicamenteuse liée aux transporteurs ABC entre le riociguat et les anticoagulants oraux directs

1. Contexte et objectifs de l'étude

Avec le développement récent de nouvelles thérapies ciblées (Humbert et al., 2004), les patients atteints d'hypertension pulmonaire (HTP) peuvent maintenant recevoir simultanément plusieurs thérapies ciblées en plus d'autres traitements, parmi lesquels on retrouve principalement des diurétiques et des anticoagulants. L'utilisation des AOD en remplacement des AVK est souvent discutée chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (HTP-TEC), même si les AOD n'ont jamais été évalués dans ce contexte, car ils possèdent une variabilité pharmacocinétique moindre, une utilisation moins contraignante et un meilleur profil de tolérance que les AVK (Gómez-Outes et al., 2015 ; Bertoletti et al., 2017). Cependant, contrairement aux AVK, les AOD sont des substrats bien connus des transporteurs d'efflux tels que P-gp et BCRP (Hodin et al., 2018 ; Gong et al., 2013), qui sont particulièrement impliqués dans leur absorption intestinale et leur élimination rénale et/ou biliaire. Récemment, une IAM potentiellement significative *in vivo* a été mise en évidence *in vitro* sur des modèles cellulaires entre les AOD et les inhibiteurs de phosphodiesterase de type 5 (IPDE5) qui sont indiqués dans le traitement de l'HTP (Margelidon-Cozzolino et al., 2018). Cette interaction est notamment liée à l'inhibition du transport par P-gp des AOD par les IPDE5.

Actuellement, le riociguat est la seule thérapie ciblée indiquée dans le traitement de l'HTP-TEC, et il a également été décrit comme substrat des transporteurs P-gp et BCRP dans des modèles *in vitro* et des études pharmacocinétiques cliniques (Rickert et al., 2014 ; Becker et al., 2016). A ce jour, aucune étude n'a évalué le risque d'IAM entre les AOD et le riociguat, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. L'inhibition de P-gp et/ou BCRP par le riociguat pourrait mener à une exposition accrue aux AOD entraînant un risque excessif de saignement, particulièrement avec l'apixaban et le rivaroxaban (actuellement les AOD les plus fréquemment prescrits (Loo et al., 2017)) dont la pharmacocinétique peut être fortement modifiée par l'inhibition de leur transport (Frost et al., 2015 ; Brings et al., 2019).

Cette étude avait donc pour objectifs d'évaluer *in vitro* la prise en charge du riociguat par deux transporteurs ABC, P-gp et BCRP, puis d'évaluer une potentielle IAM par inhibition de l'efflux de deux AOD, l'apixaban et le rivaroxaban, par le riociguat sur des modèles cellulaires MDCK transfectés.

2. Méthodes

Les modèles cellulaires transfectés MDCK-MDR1 et MDCK-BCRP ont été cultivés sur inserts pendant cinq jours. La TEER a été mesurée pour vérifier l'intégrité de la barrière cellulaire avant la réalisation d'études de perméabilités bidirectionnelles. La prise en charge du riociguat par les transporteurs ABC a été évaluée par des études de transport bidirectionnel sur des modèles transfectés MDCK-MDR1 et MDCK-BCRP. Ces études ont permis de déterminer le Km apparent du riociguat sur ces modèles. Ensuite, le potentiel inhibiteur du riociguat sur l'efflux de l'apixaban et du rivaroxaban a été évalué. Pour cela, les concentrations inhibitrices médianes (IC50) du riociguat ont été déterminées sur chaque modèle cellulaire pour les deux AOD. Enfin, les pourcentages d'inhibition de l'efflux des AOD ont été calculés pour chaque condition.

3. Résultats

3.1. Évaluation de la prise en charge du riociguat par P-gp et BCRP

Le premier objectif était d'évaluer le rôle des transporteurs P-gp et BCRP dans la prise en charge du riociguat, dans des modèles MDCK exprimant le transporteur humain d'intérêt. Des concentrations de riociguat allant de 0,5 à 100 μM ont été testées. Les valeurs d'efflux du riociguat sur les cellules MDCK-MDR1 variaient entre 12,7 et 35,3, confirmant que le riociguat est un substrat de P-gp (Figure 68A). Sur les cellules MDCK-BCRP, les valeurs d'efflux du riociguat variaient entre 13,6 et 55, ce qui confirme que le riociguat est également un substrat de BCRP (Figure 68B). Les ratios d'efflux obtenus ont été modélisés pour comparer les caractéristiques du transport du riociguat par P-gp et BCRP. La valeur du Km apparent était environ dix-sept fois plus faible sur le modèle MDCK-MDR1 (3,3 μM) (Figure 68A) que sur le modèle MDCK-BCRP (56,9 μM) (Figure 68B), suggérant une plus grande affinité du riociguat pour la P-gp.

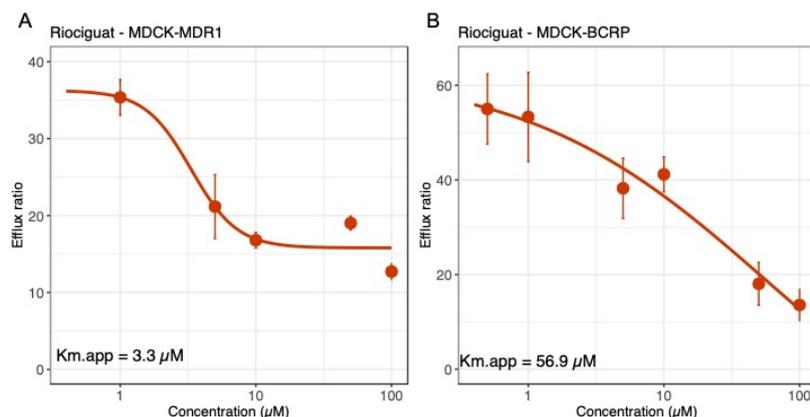


Figure 68. Km apparent du riociguat sur le modèle MDCK-MDR1 (A) et MDCK-BCRP (B).

3.2. Inhibition de l'efflux de l'apixaban et du rivaroxaban par le riociguat

Les ratios d'efflux du rivaroxaban et de l'apixaban en l'absence de riociguat étaient respectivement de 22,8 et 28,4 sur les cellules MDCK-MDR1 (figures 69A et 69B), et de 8 et 22,7 dans les cellules MDCK-BCRP (figures 69C et 69D), confirmant une prise en charge par P-gp et BCRP pour les deux AOD.

Dans l'ensemble, l'efflux de l'apixaban et du rivaroxaban n'a pas été affecté par l'ajout de riociguat à une concentration croissante jusqu'à 100 μM sur les cellules MDCK-MDR1 (figures 69A et 69B). Toutefois, cette observation doit être nuancée dans le cas du rivaroxaban dont l'efflux semble commencer à diminuer à une concentration élevée de riociguat (100 μM) (figure 69A). En revanche, l'efflux de l'apixaban et du rivaroxaban sur les cellules MDCK-BCRP a été significativement diminué par l'augmentation des concentrations de riociguat (figures 69C et 69D), particulièrement à partir de 50 μM.

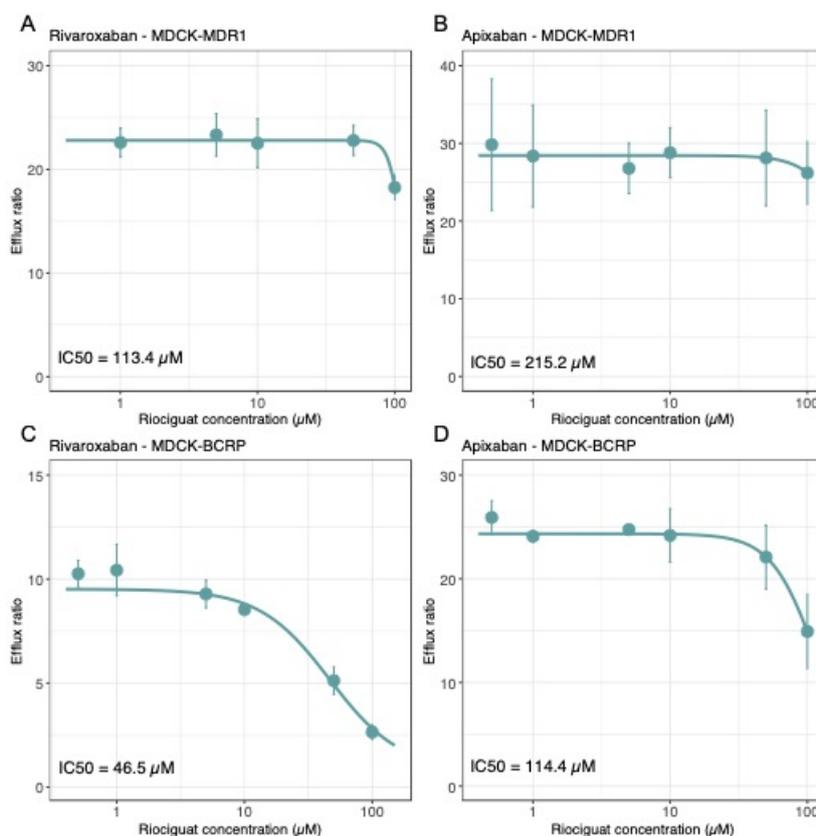


Figure 69. Détermination des IC₅₀ du riociguat sur le modèle MDCK-MDR1 (A et B) et MDCK-BCRP (C et D) pour le rivaroxaban (A et C) et l’apixaban (B et D).

La valeur d’IC₅₀ la plus faible a été obtenue avec le rivaroxaban sur les deux modèles MDCK-MDR1 et MDCK-BCRP (113,4 µM et 46,5 µM pour le rivaroxaban contre 215,2 µM et 114,4 µM pour l’apixaban, respectivement). Pour évaluer la pertinence clinique de l’inhibition de l’efflux de l’apixaban et du rivaroxaban, les rapport $[I_{\text{gut}}]/IC_{50}$ ont été calculés. Les valeurs obtenues pour l’apixaban et le rivaroxaban étaient de 0,11 et 0,21 sur le modèle MDCK-MDR1 et 0,21 et 0,51 sur le modèle MDCK-BCRP, respectivement.

L’absence d’effet du riociguat sur l’efflux de l’apixaban par P-gp a été confirmée par le calcul des pourcentages d’inhibition obtenus avec le riociguat. L’efflux du rivaroxaban par P-gp n’a pas été affecté par le riociguat à des concentrations allant jusqu’à 50 µM, mais une faible inhibition (21 %) semble avoir été induite par 100 µM de riociguat (figure 70). L’inhibition de l’efflux de l’apixaban et du rivaroxaban par BCRP a augmenté considérablement avec l’augmentation des concentrations de riociguat, atteignant environ 36 % et 77 % pour l’apixaban et le rivaroxaban respectivement.

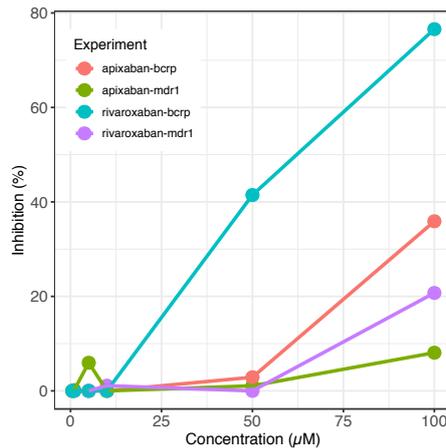


Figure 70. Pourcentage d'inhibition de l'efflux du rivaroxaban et de l'apixaban par le riociguat sur les modèles MDCK-MDR1 et MDCK-BCRP.

En conclusion, ce travail présente la première étude d'interaction médicamenteuse entre le riociguat et deux AOD, liée aux transporteurs ABC P-gp et BCRP, sur deux modèles cellulaires MDCK transfectés. Les études de perméabilité bidirectionnelle ont confirmé que le riociguat est un substrat de P-gp et de BCRP. Un risque d'interaction semble exister entre le riociguat et les AOD inhibiteurs du facteur Xa pour des concentrations élevées de riociguat, bien que les valeurs des IC50 et des rapports $[I_{\text{gut}}]/IC50$ ne suggèrent pas d'interaction cliniquement significative. Cependant, il faut garder à l'esprit que les patients atteints d'hypertension pulmonaire présentent plusieurs facteurs de risque de bioaccumulation pouvant augmenter le risque de survenue d'une interaction. De plus, cette étude a été réalisée sur des modèles MDCK transfectés dont les caractéristiques phénotypiques et l'expression des transporteurs diffèrent comparativement aux autres modèles cellulaires tels que les Caco-2.

ORIGINAL
ARTICLE

In vitro assessment of P-gp and BCRP transporter-mediated drug–drug interactions of riociguat with direct oral anticoagulants

 Elodie Jacquerox^{a*} , Clément Mercier^a, Victor Margelidon-Cozzolino^a, Sophie Hodin^a, Laurent Bertolotti^{a,b}, Xavier Delavenne^{a,c}
^aINSERM U1059, Laboratoire Sainbiose, Equipe Dysfonctions Vasculaires et Hémostase, Faculté de médecine de Saint-Etienne, Université de Lyon, F-42055, Saint-Etienne, France

^bService de Médecine Vasculaire et Thérapeutique, CHU de Saint-Etienne, F-42055, Saint-Etienne, France

^cLaboratoire de Pharmacologie Toxicologie, CHU de Saint-Etienne, F-42055, Saint-Etienne, France

Keywords

 ABC transporters,
Breast Cancer Resistance
Protein,
drug–drug interaction,
in vitro model,
MDCK cells,
P-glycoprotein

ABSTRACT

As an alternative to vitamin K antagonists (VKAs), direct oral anticoagulants (DOACs) are increasingly prescribed in combination with riociguat in the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH). Pharmacokinetics of riociguat and DOACs are influenced by efflux transporters, such as P-glycoprotein (P-gp) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). This work aimed to assess P-gp and BCRP-mediated drug–drug interactions of riociguat with DOACs using in vitro models. Bidirectional permeabilities of apixaban and rivaroxaban were investigated across MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP models, in the absence and in the presence of increasing concentrations of riociguat (0.5–100 μM). Calculated efflux ratios were subsequently used to determine riociguat inhibition percentages and half maximal inhibitory concentration (IC₅₀). P-gp-mediated efflux of apixaban and rivaroxaban was inhibited by 8% and 21%, respectively, in the presence of 100 μM riociguat. BCRP-mediated transport of apixaban and rivaroxaban was inhibited by 36% and 77%, respectively. IC₅₀s of riociguat on MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP models were higher than 100 μM for apixaban and higher than 100 μM and 46.5 μM for rivaroxaban, respectively. This work showed an in vitro inhibition of BCRP-mediated DOACs transport by riociguat. In vivo studies may be required to determine the clinical relevance of these transporter-mediated interactions.

 Received 31 May 2019;
revised 19 July 2019;
accepted 12 August 2019

 *Correspondence and reprints:
elodie.jacquerox@univ-st-
etienne.fr

INTRODUCTION

Drug–drug interactions (DDIs) in patients with pulmonary hypertension (PH) are a challenging issue [1]. With the recent development of novel therapies targeting three pathophysiological pathways involved in PH (NO, endothelin, and prostaglandin pathways) [2], patients can now receive concomitantly several targeted therapies, added to treatments considered as “supportive therapy” (mainly diuretics and

anticoagulants) [1]. Numerous DDIs have been reported during coadministration of several targeted therapies and/or their combination with other related treatments given to PH patients [3–7].

Anticoagulant therapy is considered as a cornerstone of the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) [1], a particular type of PH in which thrombosis and venous thromboembolic disease (VTE) play a central role [8]. DDIs concerning anticoagulants with targeted therapies are currently a burning



topic, especially since the rise of a new generation of oral anticoagulants, direct oral anticoagulants (DOACs) [9,10]. DOACs are direct specific activated factor X (rivaroxaban, apixaban, edoxaban) and thrombin (dabigatran) inhibitors [11], which are characterized by a lower pharmacokinetic variability, a less constraining use (no need for biological monitoring of anticoagulant effect), and a better safety profile than vitamin K antagonists (VKAs) [11–13]. Due to all these advantages, the use of DOACs instead of VKAs is often discussed in patients with CTEPH [9,14,15], even though DOACs have never been assessed in the context of CTEPH. This is a major concern, as DOAC-associated bleeding risk is related to bioaccumulation risk factors, such as low weight, renal or hepatic impairment and DDIs, which are found in one in two patients with PH [16].

DOACs are well-known substrates of efflux transporters, such as P-glycoprotein (P-gp) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) [17–19], which are particularly involved in their intestinal absorption and their elimination. Significant *in vivo* pharmacokinetic DDIs have been reported when cytochromes P450 (CYP), particularly CYP3A4, and efflux transporters were inhibited by other drugs (such as verapamil, ketoconazole, or ritonavir), leading to an increased exposure. These DDIs have exposed patients to bioaccumulation risk leading to a higher bleeding risk [13,20]. P-gp-mediated DDIs of DOACs with targeted therapies used in PH treatment has recently been highlighted with Type-5 phosphodiesterase inhibitors (involved in NO pathway), in an *in vitro* model of drug transport [21].

Riociguat is currently the only targeted therapy which has been approved in the field of CTEPH treatment [1]. Riociguat is a stimulator of soluble guanylate cyclase, belonging to the family of drugs acting on NO pathway, which allows to improve vasoreactivity and to decrease vascular remodeling in CTEPH patients [22,23]. This drug has already been characterized as a P-gp and BCRP substrate *in vitro* models and clinical pharmacokinetic studies [5,24,25], but never tested with DOACs. As previously described for other drugs [26], inhibition of P-gp and/or BCRP by riociguat in patients with CTEPH receiving DOACs could lead to increased exposure leading to an excessive bleeding risk. Among DOACs, these issues represent a particular concern for apixaban and rivaroxaban, as it has been shown that their pharmacokinetics can be highly altered by drug transport inhibition [17], and as they are currently the most frequently prescribed DOACs [27].

To our knowledge, the risk of efflux transporter-mediated DDIs for DOACs with riociguat has never been assessed *in vitro*. The aim of this work was to assess the potential transporter-mediated DDIs of riociguat with apixaban and rivaroxaban (the two most frequently prescribed DOACs) with different efflux transport profiles [17]. First, the involvement of P-gp and BCRP in riociguat transport was assessed. In a second part, the inhibitory properties of riociguat on apixaban and rivaroxaban efflux transport were compared.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Apixaban, [$^2\text{H}_7$ ^{13}C]-apixaban, rivaroxaban, [$^{13}\text{C}_6$]-rivaroxaban, and riociguat were purchased from Alsachim (Illkirch, France). Verapamil, Ko143, dimethyl sulfoxide (DMSO), formic acid, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose, Hank's balanced salt solution (HBSS), HEPES solution, fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, nonessential amino acids (NEAA), penicillin G, amphotericin B, and streptomycin were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Water and acetonitrile were purchased from Carlo Erba Reagents (Milan, Italy). All solvents were LC-MS grade.

Cell culture

Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-MDR1 and MDCK-BCRP cells were a generous gift from Dr Piet Borst (Netherlands Cancer Institute, Netherlands). Cells were routinely cultured in DMEM high-glucose supplemented with 10% FBS, 1% NEAA, 100 U/mL penicillin G, 250 ng/mL amphotericin B, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin at 37 °C and 5% CO_2 . Culture medium was changed every 2 days. Once 80% confluence was reached in flasks, cells were seeded onto porous culture inserts for drug transport studies.

MDCK-MDR1 were seeded at a density of 125 000 cells/insert on Falcon[®] translucent PET inserts (high density, pore size 0.4 μm , surface area 0.3 cm^2) while MDCK-BCRP was seeded at a density of 250 000 cells/insert on BRAND[®] translucent PET inserts (high density, pore size 0.4 μm , surface area 0.6 cm^2). Cells were cultured in inserts for 5 days with a daily medium replacement until confluence. To monitor cell monolayer confluence, transepithelial electrical resistance (TEER) was evaluated using an EVOM resistance meter coupled with STX 2 electrodes (World Precision Instruments, Sarasota, USA). TEER was

calculated according to the following equation:

$$\text{TEER} = (R_i - R_b) \times S \quad (1)$$

where R_i is the resistance in the insert, R_b is the resistance in the blank insert (without cells), and S is the area of the cell monolayer. Transport studies were only performed on inserts with a $\text{TEER} > 35 \Omega \text{ cm}^2$.

Drug transport studies

Bidirectional drug transport studies were performed across MDCK-MDR1 or MDCK-BCRP cell monolayer cultured on a porous membrane separating an apical and a basal compartment. Tested drugs were spiked in the donor compartment (either apical or basolateral) and quantified in the receiver compartment following a 2-h incubation. Apical-to-basolateral apparent permeability ($P_{\text{app}} \text{ A} \rightarrow \text{B}$) and basolateral-to-apical apparent permeability ($P_{\text{app}} \text{ B} \rightarrow \text{A}$) were then computed according to the following equation:

$$P_{\text{app}} = \left(\frac{V}{[C_i] \times S} \right) \times \left(\frac{[C_f]}{t} \right) \quad (2)$$

where V is the volume of the receiver compartment, $[C_i]$ is the initial concentration of the compound, S is the area of the cell monolayer, $[C_f]$ is the final concentration of the compound in the receiver compartment, and t is the incubation time. Each condition was assessed in triplicate.

To investigate the active efflux of tested drugs by ABC transporters P-gp or BCRP, efflux ratios (ER) were computed according to the following equation:

$$\text{ER} = \frac{P_{\text{app}}(\text{B} \rightarrow \text{A})}{P_{\text{app}}(\text{A} \rightarrow \text{B})} \quad (3)$$

The assays were conducted in HBSS transport buffer supplemented with 10 mM HEPES. Apical and basolateral compartment volumes were 0.7 and 0.8 mL for MDCK-MDR1 and 0.5 and 1 mL for MDCK-BCRP models, respectively. The assay plates were then incubated for 2 h at 37 °C. Following incubation, the amount of drug permeating through the model in both directions was quantified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

Transport of riociguat

We initially investigated the involvement of P-gp and BCRP in the transport of riociguat with bidirectional drug transport studies through MDCK-MDR1 and

MDCK-BCRP models, respectively. The transport of riociguat was assessed over a range of six concentrations from 0.5 to 100 μM to determine apparent Michaelis–Menten constants ($K_{\text{m,app}}$). Efflux ratios were calculated for each concentration according to Equation 3. The $K_{\text{m,app}}$ of riociguat on MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP models was calculated by fitting a maximum effect model to the plots of efflux ratio vs. riociguat concentration, according to the following formula.

$$\text{ER} = \left[\frac{\text{ER}_{\text{max}} \times C^h}{C^h + K_{\text{m,app}}^h} \right] \quad (4)$$

where ER_{max} is the maximal effect, C is the concentration of riociguat, h is the hill coefficient of the sigmoid model.

Drug–drug interaction studies

MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cell lines are both reference models for the *in vitro* investigation of P-gp and BCRP-related DDIs, respectively [28]. We investigated the riociguat as a potential inhibitor of rivaroxaban and apixaban efflux, two known substrates of P-gp and/or BCRP. Drug transport studies therefore consisted in studying the bidirectional permeability and the subsequent efflux of apixaban and rivaroxaban in the presence of an increasing range of riociguat (0, 0.5, 1, 5, 10, 50, and 100 μM). Verapamil (100 μM) and Ko143 (10 μM) were used as positive control inhibitors of P-gp and BCRP, respectively. Inhibitory properties of riociguat on DOACs efflux were assessed as previously described [21]. Inhibition percentage was calculated according to the formula:

$$\% \text{ inhibition} = \left(1 - \frac{\text{ER}_i - 1}{\text{ER}_a - 1} \right) \times 100 \quad (5)$$

where ER_i is the efflux ratio obtained with riociguat, ER_a is the efflux ratio obtained without riociguat. The IC_{50} was determined from unweighted nonlinear least squares regression modeling of efflux ratio with the $\text{nls}()$ function in R software, according to the following equation:

$$\text{ER} = I_{\text{max}} + \left[\frac{(I_0 - I_{\text{max}})}{1 + \left(\frac{[I]}{\text{IC}_{50}} \right)^h} \right] \quad (6)$$

where $[I]$ is the riociguat concentration, h is the hill coefficient of the sigmoid model, I_0 is the initial effect

without riociguat, and I_{\max} is the maximal effect of the model. When I_{\max} could not be estimated, it was fixed at the value of the maximal inhibition observed with specific and potent P-gp and BCRP inhibitors, verapamil, and ko143, respectively. The $[I_{\text{gut}}]/IC_{50}$ ratio was calculated from the following formula according to FDA recommendations [28]:

$$\frac{[I_{\text{gut}}]}{IC_{50}} = \frac{D}{250} \times \frac{1}{IC_{50}} \quad ((7))$$

where $[I_{\text{gut}}]$ represents the expected riociguat in vivo concentration at apical side of enterocytes, D the maximal oral riociguat dose given in once, and 250 mL the mean intestinal fluid volume.

Liquid chromatography-Mass spectrometry analysis

Quantification of apixaban (m/z 460.19793), rivaroxaban (m/z 436.07285), and riociguat (m/z 423.16878) was performed using an Ultimate U3000 liquid chromatography system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) coupled with a Q-Exactive Plus mass spectrometer (ThermoFisher, Bremen, Germany).

LC separations were achieved using an Hypersil Gold C18 (3 μm , 50 \times 2.1 mm) analytical column (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) at a flow rate of 0.6 mL/min. The mobile phase A was water with 0.1% formic acid (FA), and the mobile phase B was acetonitrile with 0.1% FA. For rivaroxaban, the gradient was: 0–0.3 min, 10%B; 0.3–1 min, linear from 10% to 70%B; 1–1.5 min, 70%B; 1.51 min return to starting conditions until 3 min. For apixaban, the gradient was: 0–0.3 min, 10%B; 0.3–0.7 min, linear from 10% to 90%B; 0.7–1.5, 90%B; 1.51 min return to starting conditions until 3 min. For riociguat, the gradient was: 0–0.3 min, 5%B; 0.3–2 min, linear from 5% to 90%B; 2–2.5 min, 90%B; 2.6 min return to starting conditions until 4 min.

Detection was performed in electrospray positive-Parallel reaction monitoring (PRM) mode, at a resolution of 35 000 (at m/z 200). The internal standards (IS) were [^{13}C , $^2\text{H}_7$]-apixaban (m/z 468.2452) for apixaban and [$^{13}\text{C}_6$]-rivaroxaban (m/z 442.09297) for rivaroxaban and riociguat. For each drug and their respective IS, a target ion (for quantification) and a confirming ion were monitored. For rivaroxaban and its IS, target ion was m/z 144.95125 and confirming ions were m/z 231.11280 and m/z 237.13298, respectively. For apixaban and its IS, target ion was m/z 199.08656 and

confirming ions were m/z 282.12387 and m/z 241.06062, respectively. For riociguat, target ion was m/z 109.04510 and confirming ion was m/z 391.14218.

Data analysis

LC-MS/MS data were collected and processed using TraceFinder Clinical 4.1 software (ThermoFisher Scientific). The peak area ratios of the drugs and their respective IS were used in the permeability calculation. R software was used for statistical analysis and graphic outputs (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <https://www.R-project.org/>). Data are expressed as the mean \pm standard deviation.

RESULTS

Assessment of riociguat transport by P-gp and BCRP

Bidirectional permeabilities of riociguat across MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cells are summarized in *Table 1*. Efflux ratios of riociguat across MDCK-MDR1 cells range between 12.7 and 35.3, confirming that riociguat is a P-gp substrate. Efflux ratios of riociguat across MDCK-BCRP cells range between 13.6 and 55, confirming that riociguat is also a BCRP substrate. Efflux ratios have been modeled to compare characteristics of riociguat transport by P-gp and BCRP (*Figure 1*). $K_{m\text{app}}$ of riociguat was lower with MDCK-MDR1 cells (3.33 μM , standard error (SE) = 5.11) than with MDCK-BCRP cells (15.8 μM , SE = 8.6).

Drug transport assay of rivaroxaban and apixaban with riociguat

Bidirectional transport assays were performed to study the transport of two DOACs, rivaroxaban and apixaban, incubated at apical or basolateral side of the cell monolayer at a constant concentration of 10 μM , in the presence of increasing concentrations (0–100 μM) of riociguat. Permeabilities values of apixaban and rivaroxaban across MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cells are summarized in *Tables II* and *III*, respectively.

Efflux ratios of apixaban and rivaroxaban across MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cells

Efflux ratios of rivaroxaban and apixaban in the absence of riociguat were 28.4 and 22.8 across MDCK-MDR1 cells, confirming the existence of a P-gp-mediated efflux for both of these drugs (*Figure 2a* and *b*). Efflux ratios of rivaroxaban and apixaban in

Table I Riociguat permeabilities across MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cells.

Cell line	Concentration (μM)	$P_{\text{app A-B}}$ (10^{-6} cm/s)	$P_{\text{app B-A}}$ (10^{-6} cm/s)
MDCK-MDR1	0.5	3.30 ± 0.15	52.39 ± 6.16
MDCK-MDR1	1	1.59 ± 0.09	56.24 ± 1.48
MDCK-MDR1	5	3.72 ± 0.71	78.78 ± 4.03
MDCK-MDR1	10	3.33 ± 0.01	55.93 ± 3.39
MDCK-MDR1	50	3.48 ± 0.10	66.18 ± 2.51
MDCK-MDR1	100	4.29 ± 0.35	54.59 ± 2.02
MDCK-BCRP	0.5	0.58 ± 0.04	31.76 ± 3.67
MDCK-BCRP	1	0.74 ± 0.13	39.48 ± 1.33
MDCK-BCRP	5	1.03 ± 0.17	39.41 ± 0.72
MDCK-BCRP	10	1.16 ± 0.10	47.64 ± 1.50
MDCK-BCRP	50	1.65 ± 0.27	29.77 ± 5.73
MDCK-BCRP	100	1.61 ± 0.36	21.92 ± 2.77

Each data are presented with the mean value \pm standard deviation. Bidirectional permeabilities (apical-to-basolateral: $P_{\text{app A}\rightarrow\text{B}}$, basolateral-to-apical: $P_{\text{app B}\rightarrow\text{A}}$, expressed in cm/s, $n = 3$ for both) of riociguat are presented with increasing concentrations (0.5, 1, 5, 10, 50, 100 μM).

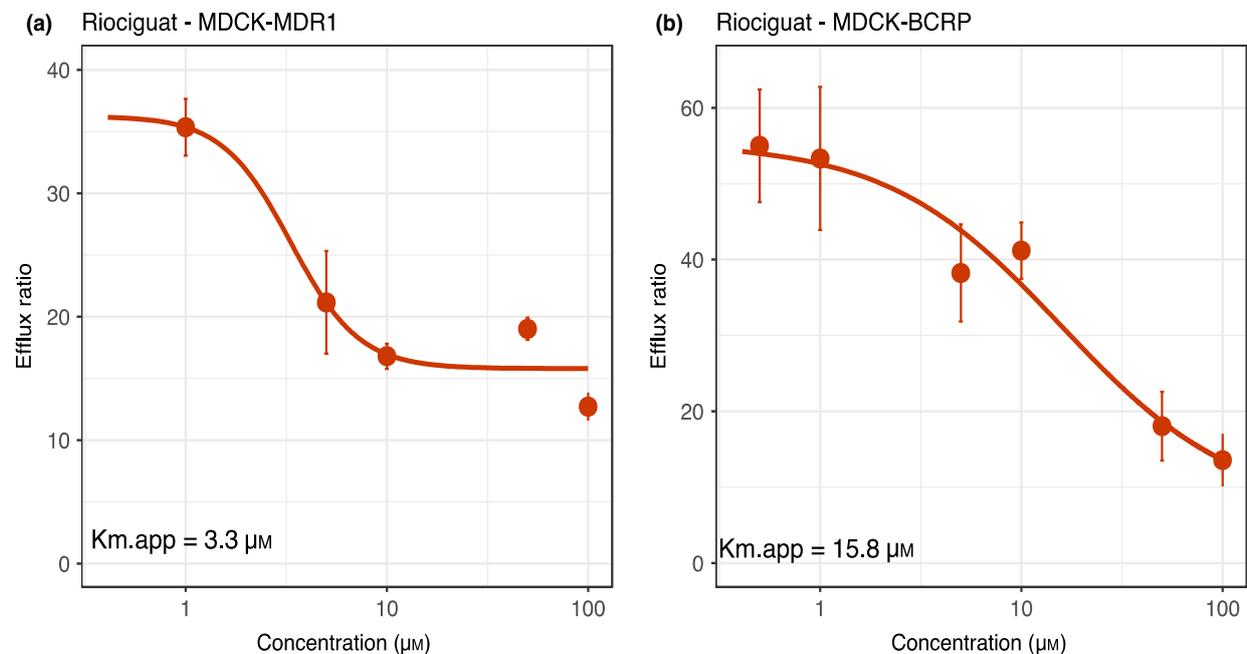


Figure 1 $K_{m,\text{app}}$ and efflux ratios at 0.5, 1, 5, 10, 50, and 100 μM of riociguat across MDCK-MDR1 (a) and MDCK-BCRP (b) cell monolayers after 2 h incubation. Experimental data ($n = 3$) are represented with a dot and its standard deviation.

the absence of riociguat were 22.7 and 8 across MDCK-BCRP cells, confirming the existence of a BCRP-mediated efflux for both of these drugs (Figure 2c and d).

Overall, bidirectional permeabilities and efflux ratios of apixaban and rivaroxaban were not affected by the addition of riociguat at increasing concentration until 100 μM across MDCK-MDR1 cells (Figure 2a and b). However, this observation must be nuanced for rivaroxaban efflux which seems to start to

decrease at high concentration of riociguat (100 μM) (Figure 2a).

Bidirectional permeabilities values of apixaban and rivaroxaban across MDCK-BCRP cells were significantly modified by increasing concentrations of riociguat (Table III). From 50 μM riociguat, apical-to-basolateral permeabilities started to decrease when basolateral-to-apical permeabilities started to increase, resulting in decreased efflux ratios for both rivaroxaban and apixaban (Figure 2c and d).

Table II Apixaban and rivaroxaban permeabilities across MDCK-MDR1 cells.

Substrate	Riociguat concentration (μM)	P_{app} A-B (10^{-6} cm/s)	P_{app} B-A (10^{-6} cm/s)
Apixaban	–	1.85 ± 0.23	52.51 ± 2.77
Apixaban	0.5	1.77 ± 0.33	52.74 ± 11.23
Apixaban	1	2.28 ± 0.49	64.83 ± 5.26
Apixaban	5	2.80 ± 0.18	75.05 ± 7.73
Apixaban	10	2.52 ± 0.27	72.54 ± 2.31
Apixaban	50	2.32 ± 0.34	65.24 ± 10.62
Apixaban	100	1.95 ± 0.20	50.98 ± 6.07
Rivaroxaban	–	3.11 ± 0.43	70.82 ± 3.71
Rivaroxaban	0.5	3.52 ± 0.24	53.78 ± 5.14
Rivaroxaban	1	3.30 ± 0.10	74.46 ± 4.03
Rivaroxaban	5	2.63 ± 0.19	61.31 ± 2.87
Rivaroxaban	10	2.86 ± 0.27	64.34 ± 2.84
Rivaroxaban	50	2.14 ± 0.13	48.80 ± 0.87
Rivaroxaban	100	2.40 ± 0.03	43.87 ± 3.02

Each data are presented with the mean value \pm standard deviation. For each DOAC, bidirectional permeabilities (apical-to-basolateral: P_{app} A \rightarrow B, basolateral-to-apical: P_{app} B \rightarrow A, expressed in cm/s, $n = 3$ for both) are presented without riociguat (DOAC concentration = 10 μM) and with increasing riociguat concentrations (0.5, 1, 5, 10, 50, 100 μM).

Table III Apixaban and rivaroxaban permeabilities across MDCK-BCRP cells

Substrate	Riociguat concentration (μM)	P_{app} A-B (10^{-6} cm/s)	P_{app} B-A (10^{-6} cm/s)
Apixaban	–	0.57 ± 0.47	17.34 ± 0.73
Apixaban	0.5	0.63 ± 0.03	16.29 ± 0.46
Apixaban	1	0.76 ± 0.01	18.27 ± 0.29
Apixaban	5	0.74 ± 0.02	18.25 ± 4.50
Apixaban	10	0.70 ± 0.05	16.97 ± 1.36
Apixaban	50	0.75 ± 0.06	16.48 ± 1.88
Apixaban	100	0.92 ± 0.06	13.66 ± 3.24
Rivaroxaban	–	3.11 ± 0.27	25.01 ± 4.53
Rivaroxaban	0.5	2.82 ± 0.09	28.88 ± 1.53
Rivaroxaban	1	2.91 ± 0.34	30.32 ± 0.08
Rivaroxaban	5	3.19 ± 0.18	29.59 ± 1.33
Rivaroxaban	10	3.21 ± 0.07	27.42 ± 0.62
Rivaroxaban	50	3.25 ± 0.25	16.66 ± 1.73
Rivaroxaban	100	4.26 ± 0.08	11.28 ± 1.51

Each data are presented with the mean value \pm standard deviation. For each DOAC, bidirectional permeabilities (apical-to-basolateral: P_{app} A \rightarrow B, basolateral-to-apical: P_{app} B \rightarrow A, expressed in cm/s, $n = 3$ for both) are presented without riociguat (DOAC concentration = 10 μM) and with increasing riociguat concentrations (0.5, 1, 5, 10, 50, 100 μM).

Maximal inhibition assessment

The absence of effect of riociguat on P-gp-mediated apixaban efflux was confirmed with calculation of inhibition percentages obtained with riociguat. The P-gp-mediated rivaroxaban efflux was not affected by riociguat for concentrations up to 50 μM ; however, some inhibition (21%) appeared to be induced from 100 μM of riociguat (Figure 3). Inhibition of BCRP-mediated apixaban and rivaroxaban efflux dramatically increased

with increasing concentrations of riociguat, reaching around 36% and 77%, respectively (Figure 3).

IC₅₀ and I_{gut} /IC₅₀ ratios

Modeling of efflux ratios were performed for IC₅₀ determinations for rivaroxaban and apixaban P-gp-mediated transport (Figure 2a and b) and BCRP-mediated transport (Figure 2c and d). The lowest IC₅₀ was obtained for rivaroxaban across the MDCK-BCRP cell

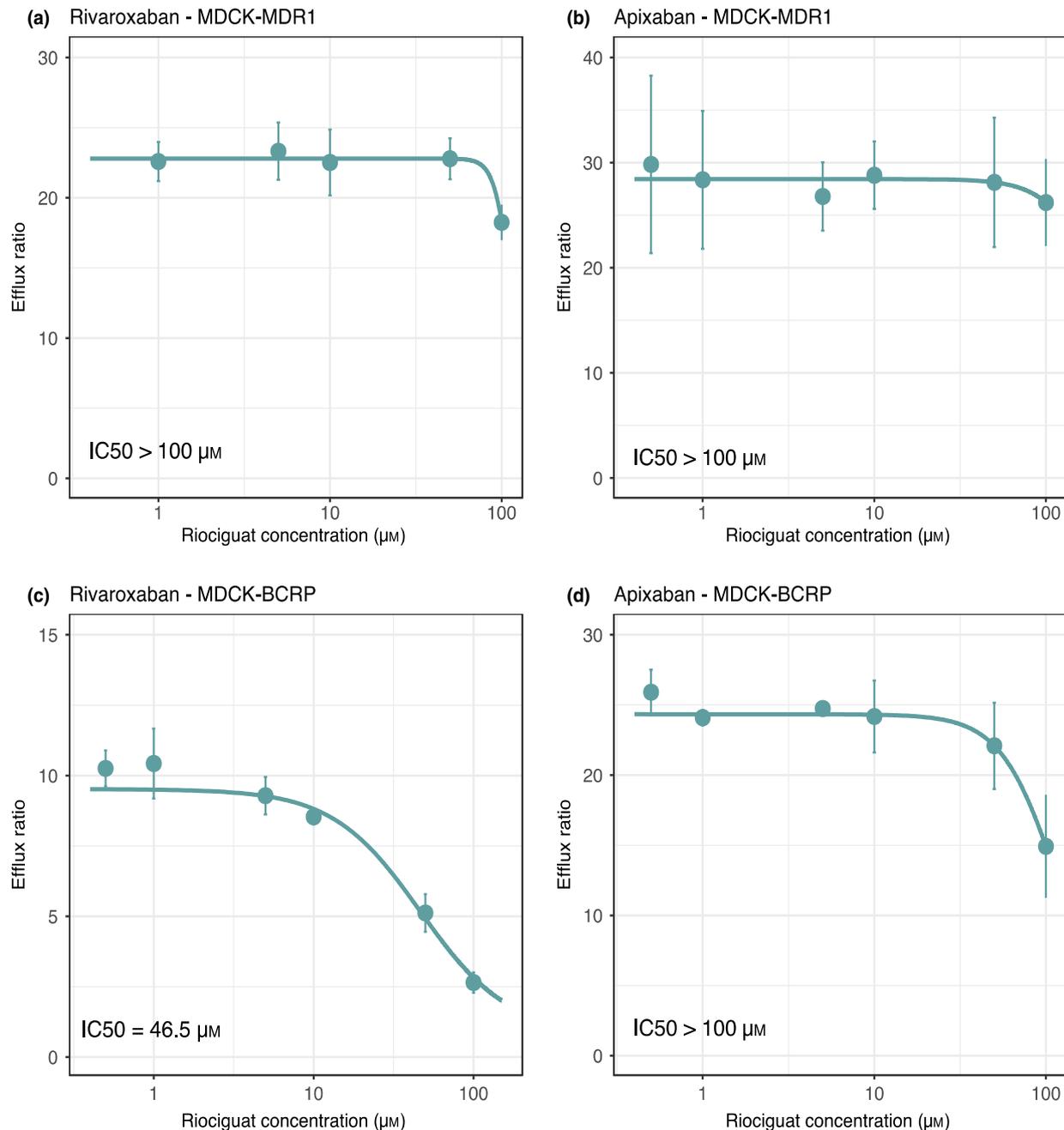


Figure 2 Efflux ratios of rivaroxaban (10 μM) and apixaban (10 μM) across MDCK-MDR1 (a and b) and MDCK-BCRP cells (c and d), without and with increasing riociguat concentrations (0.5, 1, 5, 10, 50, 100 μM) after 2 h incubation. Experimental data ($n = 3$) are represented with a dot and its standard deviation. The lines represent the corresponding sigmoid models obtained with a nonlinear regression algorithm. IC₅₀ determined from these models are shown for each model.

model (46.5 μM (SE = 12.7) vs. higher than 100 μM for other conditions). In order to assess clinical relevance of the inhibition of apixaban and rivaroxaban transporter-mediated efflux, $[I_{\text{gut}}]/\text{IC}_{50}$ ratios were calculated. The values obtained across MDCK-MDR1 cells were less than 0.24 for both apixaban and rivaroxaban, whereas the values across MDCK-BCRP cells were

of 0.51 for rivaroxaban and less than 0.24 for apixaban.

DISCUSSION

DOACs are increasingly replacing VKAs in CTEPH patients, due to their simplicity of use and a lower

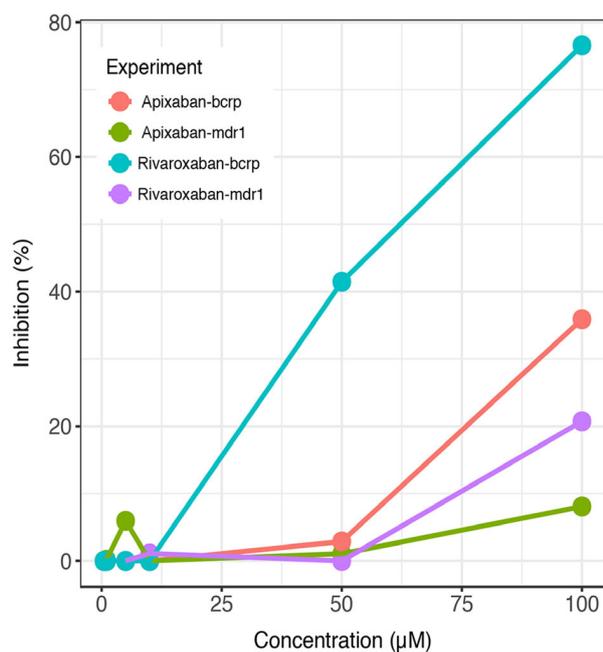


Figure 3 Inhibitory effect of riociguat (expressed in inhibition %) on rivaroxaban and apixaban efflux after 2 h incubation. Each DOAC/cell combination is represented according to the legend on the figure. All values are normalized to the DOAC efflux ratio at 10 µM without riociguat.

bleeding risk. Although CTEPH is not an approved label for DOACs, some patients may already receive DOACs in other approved labels, such as acute VTE and AF [29,30]. DOACs are efflux transporter substrates [17,18,31] and it has been previously reported that riociguat, the only approved targeted therapy in CTEPH treatment, is also a P-gp and BCRP substrate [5,25]. However, only limited information demonstrating the involvement of efflux transporters in the pharmacokinetics of riociguat is available in vitro [24]. To the best of our knowledge, this work is the first to provide data on P-gp and BCRP-mediated DDIs of riociguat with DOACs.

Our main results confirm that riociguat is a P-gp and BCRP substrate. We found that riociguat inhibits BCRP more strongly than P-gp. At the maximal concentration of riociguat (100 µM), inhibition of efflux transport by P-gp and BCRP was maximal and higher with rivaroxaban (21% and 77%, respectively) than apixaban (8% and 36%, respectively). Riociguat inhibition of BCRP-mediated DOACs transport was more powerful for rivaroxaban (IC₅₀ values of 46.5 µM (SE = 12.7) and higher than 100 µM for rivaroxaban and apixaban, respectively).

First, our study confirmed that riociguat is a substrate of P-gp and BCRP in vitro. The results of transport assays and the determination of $K_{m_{app}}$ suggest a concentration-dependent efflux of riociguat by P-gp and BCRP at concentrations ranging from 0.5 to 100 µM. Riociguat concentrations higher than 100 µM were not tested due to limited solubility. The involvement of efflux transporters in riociguat disposition has already been described [5,24,25]. Rickert *et al.* performed growth inhibition assays in different cell lines (such as native MDCKs, transfected-MDCKs, and L-MDR1) to assess the involvement of P-gp and BCRP in riociguat transport. They demonstrated that riociguat is transported by P-gp, but they found no difference in sensitivity between MDCKs and MDCK-BCRP, suggesting that riociguat is not a substrate of BCRP in vitro. The differences between Rickert's results and ours can be explained by the use of cell monolayers grown on semi-porous filters to determine bidirectional permeabilities while Rickert *et al.* used growth inhibition assays and the intracellular accumulation of fluorescent substrates.

Then, we highlighted a potential transporter-mediated DDI between riociguat and DOACs. To our knowledge, this drug combination has never been assessed either in vitro or in vivo. Some of in vivo studies have focused on potential DDIs between riociguat and other medications [5,32,33]. In particular, Becker *et al.* [5] have described an increase in riociguat mean C_{max} by approximately 46% and mean $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ by 150% when combined with a P-gp inhibitor (such as ketoconazole) in healthy volunteers. These results are consistent with our in vitro results and confirm a possible transporter-mediated DDI. DOACs are well-known P-gp and BCRP substrates and transporter-mediated DDIs with several drug classes have been reported [21,34,35]. Among the DOACs, we decided to study two activated factor X inhibitors, apixaban and rivaroxaban, because they have different efflux transport profiles. Hodin *et al.* have demonstrated that BCRP is the main transporter involved in apixaban efflux whereas both P-gp and BCRP play an equivalent role in rivaroxaban efflux. The lowest $K_{m_{app}}$ value of riociguat was obtained with the MDCK-MDR1 model, suggesting a higher affinity for P-gp than BCRP. Despite this, inhibition percentages of DOACs efflux surprisingly suggest that riociguat is not a P-gp inhibitor and is a moderate BCRP inhibitor while a previous in vitro study showed that riociguat is a moderate P-gp and BCRP inhibitor [24]. At the maximal concentration of

riociguat (100 μM), maximal inhibition was higher for rivaroxaban than apixaban in both MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP transfected cell models. This suggests a more likely DDI of riociguat with rivaroxaban than with apixaban. The data of this study did not allow an accurate estimation of the IC50s, but this does not affect the findings on clinical implications. The relatively high IC50 values and $[I_{\text{gut}}]/\text{IC50}$ ratios (a validated negative predictor to detect a potential clinically relevant DDI [36]) inferior to 10 suggest a low probability of clinically relevant in vivo DDIs, in the absence of other risk factor of bioaccumulation.

Our study has some limitations. Although transfected-MDCK cell models are FDA-validated systems for the study of drug transport and transporter-mediated DDIs, they remain in vitro models and they do not exempt from performing in vivo studies to validate or invalidate our in vitro results. Indeed, our study only focused on the effect of riociguat on P-gp and BCRP-mediated transport of DOACs, whereas in vivo comprehensive drug transport is more complex with a potential involvement of other drug transporters. We did not assess the potential metabolism-mediated DDIs. However, riociguat and its main metabolite and DOACs are also known to be substrates of cytochromes P450 (CYP) [5,13,25]. Furthermore, the main metabolite of riociguat, which is pharmacologically active, seems to be a P-gp and BCRP substrate [25]. Further information on a potential interaction of this metabolite on DOACs transport may be interesting. Additional in vitro data on potential metabolism-mediated DDIs between riociguat and DOACs are needed to perform an integrated prediction of the in vivo effects of riociguat on DOACs pharmacokinetics. Moreover, $[I_{\text{gut}}]/\text{IC50}$ ratio is a validated predictor to detect a potential clinically relevant DDI for orally administrated drugs, according to FDA recommendations [28] (values inferior to 10 indicate a low probability of in vivo DDIs [36]). However, this is a simplified method and other approaches can be used to make such predictions, like integrative PBPK models, even though the predictive performance of PBPK modeling for transporter-based DDIs has not been established [37]. This is particularly true as phenomena that occur in vivo like protein binding are not considered in this model (whereas in vivo riociguat showed a high plasma protein binding, at approximately 95%) [25]. We did not make any assumptions regarding the type of interaction. For that, several DOAC concentrations should have been tested. In competitive inhibition, the IC50 estimation depends on the substrate concentration. The

main risk is to not be able to estimate IC50 using a too high substrate concentration. However, other strong inhibitor of P-gp and BCRP induced strong effect at these substrate concentrations [21]. Moreover, substrate concentrations were close to the K_m of each drugs, there is a little evidence to miss the existence of competitive inhibition. In the case of noncompetitive inhibition, the IC50 is not or slightly influenced by the substrate concentration. For these reasons, the clinical implications of this study are not affected by the type of inhibition.

CONCLUSION

In conclusion, our in vitro study is the first to assess potential transporter-mediated DDIs of riociguat with DOACs. We confirmed that riociguat is a P-gp and BCRP substrate and also a moderate inhibitor of BCRP transporter. A risk of DDIs seems to exist between riociguat and activated factor X inhibitors, but it is unlikely that a clinically significant DDI will occur in vivo considering the IC50 and $[I_{\text{gut}}]/\text{IC50}$ values. However, PH patients may present several bioaccumulation risk factors. So, if the use of a DOAC is required, it seems preferable to choose apixaban rather than rivaroxaban due to a lower risk to lead to DDIs. This suggestion must be confirmed in further clinical research.

ACKNOWLEDGMENTS

MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cells were a generous gift from Dr Piet Borst (Netherland's Cancer Institute, Netherlands).

REFERENCES

- 1 Galie N., Humbert M., Vachiery J.-L. et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Respir. J.* (2015) **46** 903–975.
- 2 Humbert M., Sitbon O., Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* (2004) **351** 1425–1436.
- 3 Gotzkowsky S.K., Kumar P., Mottola D., Laliberte K. Lack of a pharmacokinetic interaction between tadalafil, diosmin and sildenafil in healthy adult volunteers. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (2013) **61** 444–451.

- 4 Venitz J., Zack J., Gillies H., Allard M., Regnault J., Dufton C. Clinical pharmacokinetics and drug-drug interactions of endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Pharmacol.* (2012) **52** 1784–1805.
- 5 Becker C., Frey R., Unger S. et al. Pharmacokinetic interaction of riociguat with ketoconazole, clarithromycin, and midazolam. *Pulm. Circ.* (2016) **6** S49–S57.
- 6 Dingemans J., van Giersbergen P.L.M. Clinical pharmacology of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Clin. Pharmacokinet.* (2004) **43** 1089–1115.
- 7 Burgess G., Hoogkamer H., Collings L., Dingemans J. Mutual pharmacokinetic interactions between steady-state bosentan and sildenafil. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* (2008) **64** 43–50.
- 8 Simonneau G., Torbicki A., Dorfmueller P., Kim N. The pathophysiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur. Respir. Rev.* (2017) **26** 160112.
- 9 Bertoletti L., Delavenne X., Montani D. Antithrombotics in pulmonary hypertension: more work needed before we turn to newer agents!. *Eur. Respir. J.* (2013) **41** 775–777.
- 10 Roldan T., Landzberg M.J., Deicicchi D.J., Atay J.K., Waxman A.B. Anticoagulation in patients with pulmonary arterial hypertension: an update on current knowledge. *J. Heart Lung Transplant.* (2016) **35** 151–164.
- 11 Gómez-Outes A., Suárez-Gea M.L., Lecumberri R., Terleira-Fernández A.I., Vargas-Castrillón E. Direct-acting oral anticoagulants: pharmacology, indications, management, and future perspectives. *Eur. J. Haematol.* (2015) **95** 389–404.
- 12 Zirlik A., Bode C. Vitamin K antagonists: relative strengths and weaknesses vs. direct oral anticoagulants for stroke prevention in patients with atrial fibrillation. *J. Thromb. Thrombolysis* (2017) **43** 365–379.
- 13 Bertoletti L., Ollier E., Duvillard C. et al. Direct oral anticoagulants: current indications and unmet needs in the treatment of venous thromboembolism. *Pharmacol. Res.* (2017) **118** 33–42.
- 14 Robbins I.M., Pugh M.E., Hemnes A.R. Update on chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Trends Cardiovasc. Med.* (2017) **27** 29–37.
- 15 Gavilanes-Oleas FA, Alves JL, Fernandes CJC et al. Use of direct oral anticoagulants for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Clin. Sao Paulo Braz.* (2018) **73** e216.
- 16 Gabriel L., Delavenne X., Bedouch P. et al. Risk of direct oral anticoagulant bioaccumulation in patients with pulmonary hypertension. *Respiration* (2016) **91** 307–315.
- 17 Hodin S., Basset T., Jacqueroux E. et al. In vitro comparison of the role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on direct oral anticoagulants disposition. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* (2018) **43** 183–191.
- 18 Gnath M.J., Buetehorn U., Muenster U., Schwarz T., Sandmann S. In vitro and in vivo P-glycoprotein transport characteristics of rivaroxaban. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2011) **338** 372–380.
- 19 Gong I.Y., Mansell S.E., Kim R.B. Absence of both MDR1 (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) transporters significantly alters rivaroxaban disposition and central Nervous system entry. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* (2013) **112** 164–170.
- 20 Chang S.-H., Chou I.-J., Yeh Y.-H. et al. Association between use of non-vitamin K oral anticoagulants with and without concurrent medications and risk of major bleeding in nonvalvular atrial fibrillation. *JAMA* (2017) **318** 1250–1259.
- 21 Margelidon-Cozzolino V., Hodin S., Jacqueroux E., Delezay O., Bertoletti L., Delavenne X. In vitro assessment of pharmacokinetic drug-drug interactions of direct oral anticoagulants: type 5-phosphodiesterase inhibitors are inhibitors of rivaroxaban and apixaban efflux by P-glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2018) **365** 519–525.
- 22 Mielniczuk L.M., Swiston J.R., Mehta S. Riociguat: a novel therapeutic option for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Can. J. Cardiol.* (2014) **30** 1233–1240.
- 23 Ghofrani H.-A., Humbert M., Langen D. et al. Riociguat: mode of action and clinical development in pulmonary hypertension. *Chest* (2016) **151** 468–480.
- 24 Rickert V., Haefeli W.E., Weiss J. Pharmacokinetic interaction profile of riociguat, a new soluble guanylate cyclase stimulator, in vitro. *Pulm. Pharmacol. Ther.* (2014) **28** 130–137.
- 25 European Medicines Agency. Adempas – Summary of product characteristics [Internet]; 2018. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/adempas> [cited 2019 Mar 17]
- 26 Delavenne X., Ollier E., Basset T. et al. A semi-mechanistic absorption model to evaluate drug-drug interaction with dabigatran: application with clarithromycin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2013) **76** 107–113.
- 27 Loo S.Y., Dell'Aniello S., Huiart L., Renoux C. Trends in the prescription of novel oral anticoagulants in UK primary care: novel oral anticoagulant prescription trends. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2017) **83** 2096–2106.
- 28 Food and Drug Administration. In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry (2017).
- 29 EINSTEIN-PE Investigators. Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism. *N. Engl. J. Med.* (2012) **366** 1287–1297.
- 30 Granger C.B., Alexander J.H., McMurray J.J.V. et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N. Engl. J. Med.* (2011) **365** 981–992.
- 31 Zhang D., He K., Herbst J.J. et al. Characterization of efflux transporters involved in distribution and disposition of apixaban. *Drug Metab. Dispos.* (2013) **41** 827–835.
- 32 Frey R., Mück W., Kirschbaum N., Krätzschmar J., Weimann G., Wensing G. Riociguat (BAY 63-2521) and warfarin: a pharmacodynamic and pharmacokinetic interaction study. *J. Clin. Pharmacol.* (2011) **51** 1051–1060.
- 33 Frey R., Reber M., Krätzschmar J., Unger S., Mück W., Wensing G. Riociguat (BAY 63-2521) and aspirin: a randomized, pharmacodynamic, and pharmacokinetic interaction study. *Pulm. Circ.* (2016) **6** S35–S42.

- 34 Frost C.E., Byon W., Song Y. et al. Effect of ketoconazole and diltiazem on the pharmacokinetics of apixaban, an oral direct factor Xa inhibitor. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2015) **79** 838–846.
- 35 Härter S., Koenen-Bergmann M., Sharma A. et al. Decrease in the oral bioavailability of dabigatran etexilate after co-medication with rifampicin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2012) **74** 490–500.
- 36 Giacomini K.M., Huang S.M., Tweedie D.J. et al. Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2010) **9** 215–236.
- 37 Wagner C., Zhao P., Pan Y. et al. Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) modeling to support dose selection: report of an FDA public workshop on PBPK: physiologically based pharmacokinetic modeling to support dose selection. *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* (2015) **4** 226–230.

Chapitre 2 : Impact de la quantité de transporteurs ABC sur la prédiction des modèles cellulaires *in vitro* dans la pharmacocinétique du rivaroxaban

1. Contexte et objectifs de l'étude

Le rivaroxaban est un substrat bien connu des transporteurs d'efflux ABC, plus particulièrement de P-gp et BCRP (Gnoth et al., 2011 ; Gong et al., 2013 ; Hodin et al., 2018). Cette prise en charge par des transporteurs d'efflux est à l'origine d'interactions médicamenteuses observées *in vivo*, particulièrement lorsqu'il est co-administré avec des inhibiteurs ou inducteurs puissants des CYP3A4 et de P-gp et/ou BCRP, comme le kétoconazole ou le ritonavir (Mueck et al., 2013), conduisant à une surexposition au rivaroxaban. Afin d'étudier l'implication des transporteurs ABC dans la pharmacocinétique des médicaments, la FDA recommande différents systèmes *in vitro*, notamment les modèles cellulaires (FDA, 2017). Les lignées cellulaires Caco-2 et MDCK, plus particulièrement les lignées MDCK transfectées, sont très souvent utilisées pour étudier *in vitro* l'absorption et l'élimination des médicaments (Artursson et al., 1996 ; Irvine et al., 1999), notamment leur prise en charge par les transporteurs d'efflux. Cependant, les modèles Caco-2 et MDCK ont des caractéristiques différentes en termes d'expression des protéines (Tang et al., 2002a ; Tang et al., 2002b). Les cellules MDCK transfectées surexpriment les transporteurs comparativement aux cellules Caco-2. De plus, le profil d'expression des transporteurs dépend également de la provenance des cellules. En effet, le niveau d'expression des ARN messagers de divers transporteurs diffère selon que les cellules Caco-2 proviennent de la banque cellulaire ATCC ou ECACC (Maubon et al., 2007). Ces variations d'expression des protéines impliquées dans la pharmacocinétique des médicaments rendent les corrélations *in vitro-in vivo* délicates. En effet, le rapport $[I_{\text{gut}}]/IC_{50}$ est communément utilisé pour prédire la survenue d'IAM *in vivo* à partir des IC_{50} obtenues *in vitro*. Or, les études de transport *in vitro* des médicaments peuvent être affectées par la quantité de transporteurs membranaires présents sur les cellules. Ainsi, une information quantitative précise de l'expression des transporteurs ABC dans ces modèles cellulaires est nécessaire pour améliorer la prédiction des IAM *in vivo* liées aux transporteurs d'efflux à partir des modèles *in vitro*.

Cette étude était composée de trois axes :

- Évaluer les caractéristiques de barrière de cinq modèles recommandés par la FDA
- Développer et valider une méthode de quantification précise et robuste des transporteurs ABC, particulièrement P-gp et BCRP, en spectrométrie de masse
- Étudier l'influence de la quantité de P-gp et BCRP sur l'interprétation des études de transport bidirectionnel du rivaroxaban dans quatre de ces modèles.

2. Méthodes

Une approche multi techniques a été choisie pour étudier l'impact de la quantité des transporteurs sur les résultats des études de transport du rivaroxaban. Tout d'abord, nous avons réalisé une quantification relative des protéines de jonctions et des transporteurs ABC dans les modèles Caco-2_{ATCC}, Caco-2_{ECACC}, MDCK II, MDCK-BCRP et MDCK-MDR1 grâce à une étude protéomique en spectrométrie de masse. L'expression relative de deux marqueurs phénotypiques a également été évaluée et a servi de contrôle positif afin de valider notre approche. Nous avons confirmé l'expression de la protéine de jonction serrée ZO-1 et des transporteurs P-gp et BCRP au moyen de techniques complémentaires telles que la microscopie à épifluorescence et le western blot. Une méthode de quantification absolue en spectrométrie de masse a ensuite été développée puis validée selon les recommandations de la FDA afin d'évaluer plus précisément la quantité des transporteurs P-gp et BCRP présente sur chacun des modèles cellulaires. Enfin, la prise en charge du rivaroxaban par les transporteurs P-gp et BCRP a été évaluée grâce à des études de perméabilité bidirectionnelle et à la détermination des IC50 de deux inhibiteurs de référence de P-gp et BCRP (vérapamil et ko143 respectivement) sur les modèles Caco-2_{ATCC}, Caco-2_{ECACC}, MDCK-BCRP et MDCK-MDR1.

3. Résultats

3.1. Expression des protéines de jonction et des marqueurs phénotypiques

La première partie de ce travail consistait à examiner les propriétés de barrière des divers modèles cellulaires en termes d'expression des protéines de jonctions et de marqueurs phénotypiques. Les études d'immunofluorescence ont révélé une expression plus forte et plus distincte de ZO-1 dans les modèles Caco-2 par rapport aux modèles MDCK, en lien avec la différence de TEER observée entre les deux types cellulaires (Figure 71). Plus précisément, la protéine ZO-1 présentait une localisation membranaire, à la jonction entre les cellules.

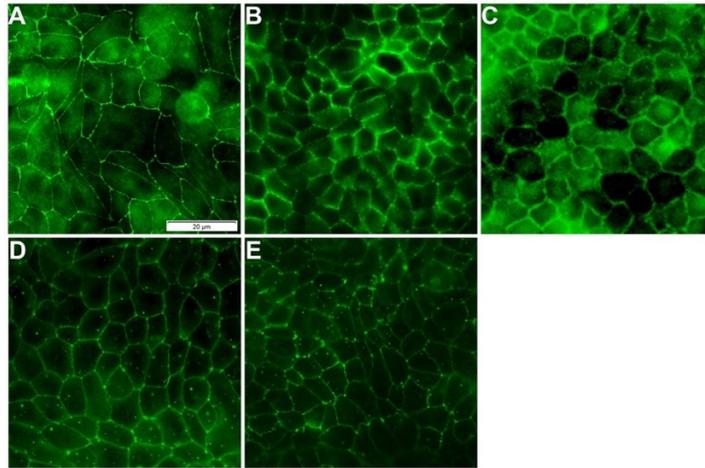


Figure 71. Expression de ZO-1 par microscopie à épifluorescence sur les cellules MDCK II (A), MDCK-MDR1 (B), MDCK-BCRP (C), Caco-2_{ATCC} (D) et Caco-2_{ECACC} (E).

L'analyse protéomique en spectrométrie de masse a permis d'évaluer l'expression relative des protéines de jonctions adhérentes cadhérine-1 et cadhérine-17 ainsi que des protéines de jonctions serrées occludine, ZO-1, ZO-2 et ZO-3 dans les cinq modèles cellulaires (Figure 72).

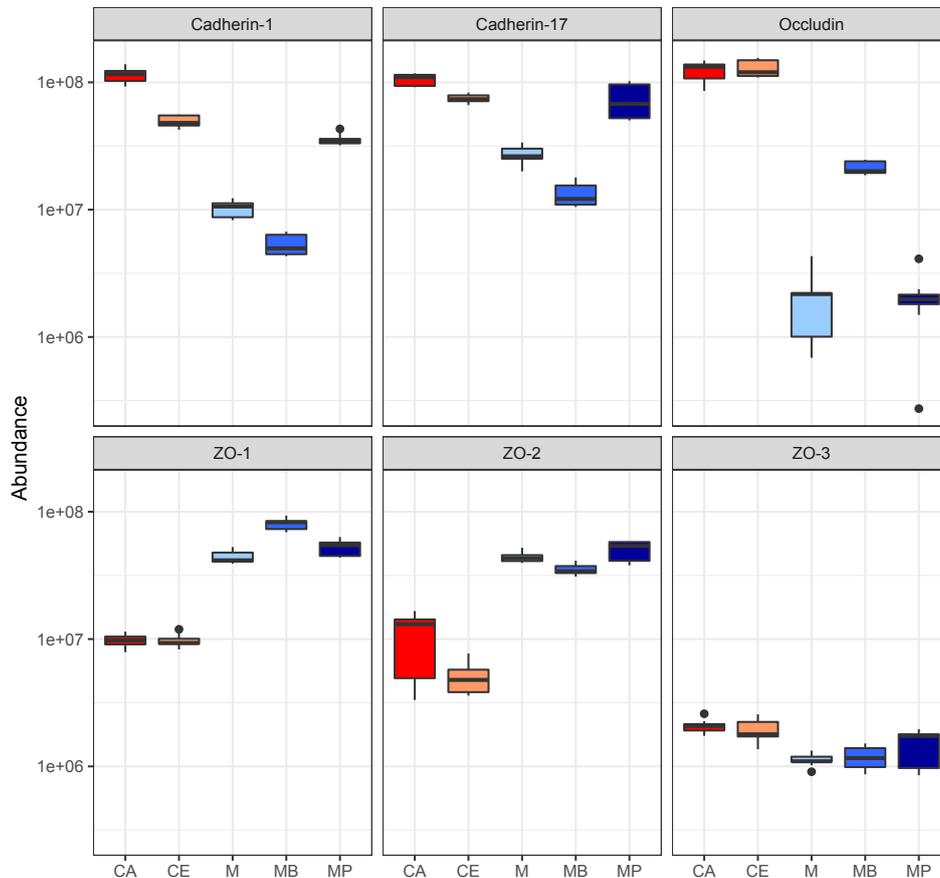


Figure 72. Quantification relative des protéines de jonction dans les modèles Caco-2_{ATCC} (CA), Caco-2_{ECACC} (CE), MDCK II (M), MDCK-BCRP (MB) et MDCK-MDR1 (MP) par spectrométrie de masse.

Les cadhérines 1 et 17 présentaient une abondance cinq à dix fois plus élevée dans les cellules Caco-2 que dans les cellules MDCK II et MDCK-BCRP, tandis que dans les cellules MDCK-MDR1 elles ont été détectées à un niveau légèrement inférieur à celui des Caco-2. L'occludine présentait une abondance dix à cent fois plus élevée dans les cellules Caco-2, en lien avec une TEER supérieure. Parmi les modèles MDCK, la plus forte abondance d'occludine a été observée dans les cellules MDCK-BCRP. L'abondance des protéines ZO-1 et ZO-2 était plus élevée dans les modèles MDCK que dans les modèles Caco-2, tandis que celle des protéines ZO-3 était très similaire dans tous les modèles.

Finalement, l'analyse protéomique des marqueurs phénotypiques a permis de valider l'approche de quantification relative en spectrométrie de masse. La dipeptidyl peptidase 4, un marqueur des cellules intestinales, a révélé une expression dix à cent fois plus importante dans les modèles Caco-2, en rapport avec son expression préférentielle dans la muqueuse intestinale (Figure 73). La pompe à protons dépendante de l'ATP (V-type proton ATPase), sélectionnée comme marqueur des cellules rénales du tubule distal, était plus abondante dans les trois modèles MDCK par rapport aux modèles Caco-2.

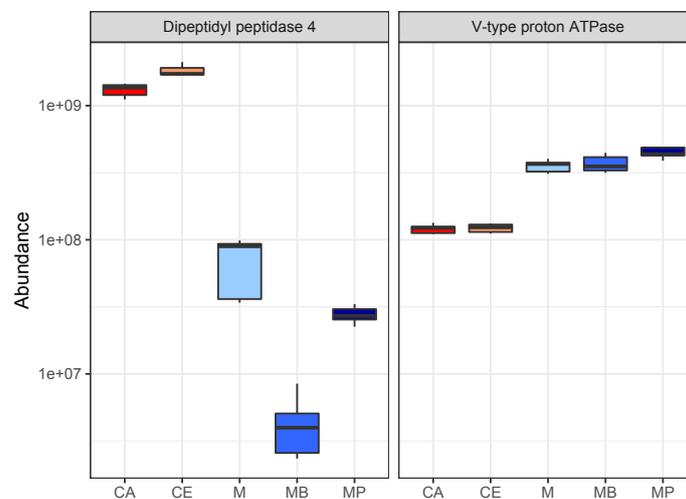


Figure 73. Quantification relative de deux marqueurs phénotypiques dans les modèles Caco-2_{ATCC} (CA), Caco-2_{ECACC} (CE), MDCK II (M), MDCK-BCRP (MB) et MDCK-MDR1 (MP) par spectrométrie de masse.

3.2. Évaluation de l'expression et quantification des transporteurs ABC

La seconde partie de ce travail était axée sur les transporteurs ABC dont l'expression a été évaluée initialement par spectrométrie de masse dans les modèles Caco-2_{ATCC}, Caco-2_{ECACC}, MDCK II, MDCK-BCRP et MDCK-MDR1 (Figure 74). P-gp présentait une faible abondance

dans les MDCK II et MDCK-BCRP, tandis qu'elle présentait une abondance dix fois plus importante dans les cellules MDCK-MDR1 par rapport aux cellules Caco-2. Il est intéressant de noter qu'une différence d'abondance de P-gp a été observée entre les deux modèles Caco-2, avec une plus grande abondance dans les cellules Caco-2_{ECACC}. BCRP présentait une abondance plus élevée dans le modèle MDCK-BCRP que dans les autres modèles et la plus faible abondance a été observée dans le modèle MDCK-MDR1. L'abondance de BCRP était similaire entre les deux modèles Caco-2 et le modèle MDCK II. MRP1 présentait une abondance plus faible dans les cellules MDCK II que dans les quatre autres modèles qui possédaient une abondance similaire. L'abondance de MRP2 était dix fois plus importante dans les modèles Caco-2 que dans les modèles MDCK, avec une plus grande abondance dans les Caco-2_{ECACC} comparé aux Caco-2_{ATCC}. A l'inverse, l'abondance des transporteurs MRP3 et MRP4 était dix fois plus élevée dans les modèles MDCK que dans les modèles Caco-2.

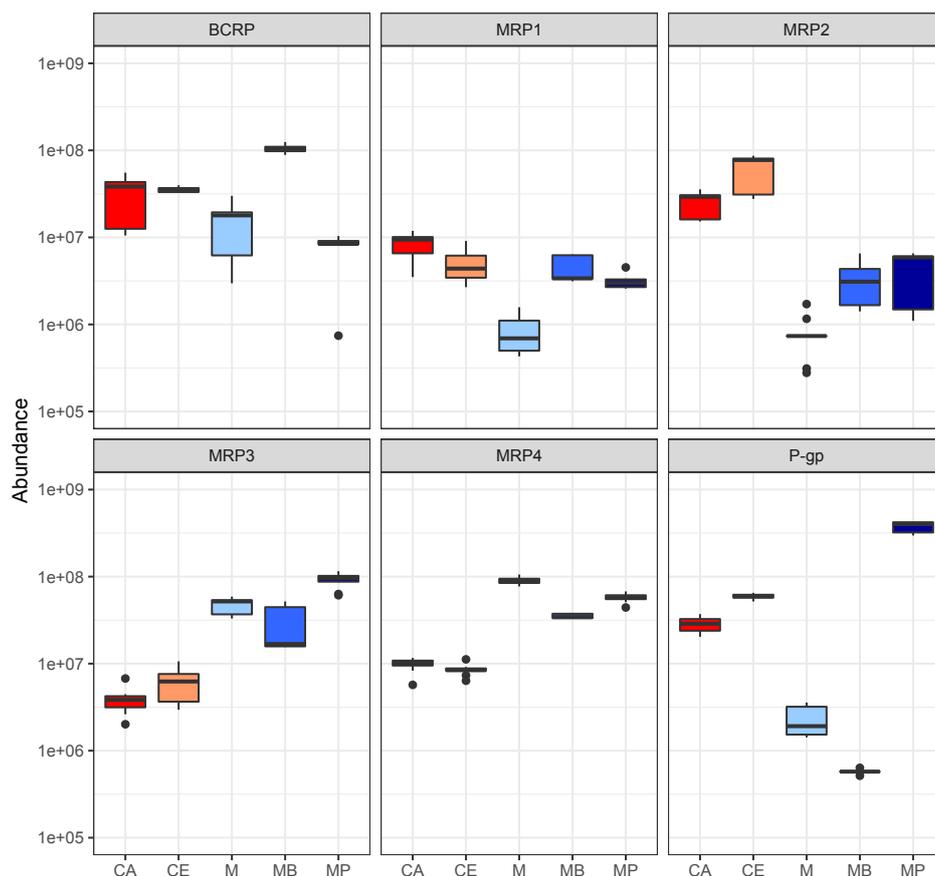


Figure 74. Quantification relative des transporteurs ABC dans les modèles Caco-2_{ATCC} (rouge), Caco-2_{ECACC} (orange), MDCK II (bleu clair), MDCK-BCRP (bleu) et MDCK-MDR1 (bleu foncé) par spectrométrie de masse.

L'imagerie par immunofluorescence a permis de confirmer l'expression des transporteurs P-gp et BCRP dans les différents modèles. L'expression de P-gp était définie par

un marquage membranaire clair et intense dans les modèles Caco-2 et MDCK-MDR1 (Figure 75). P-gp présentait une distribution apicale homogène caractérisée par de multiples punctuations recouvrant l'ensemble de la membrane cellulaire sur les MDCK-MDR1, tandis que sur les Caco-2 elle présentait une distribution apicale plus hétérogène, principalement caractérisée par un signal fin et continu localisé au niveau des jonctions intercellulaires. Aucun signal spécifique n'a été observé sur les cellules MDCK II et MDCK-BCRP.

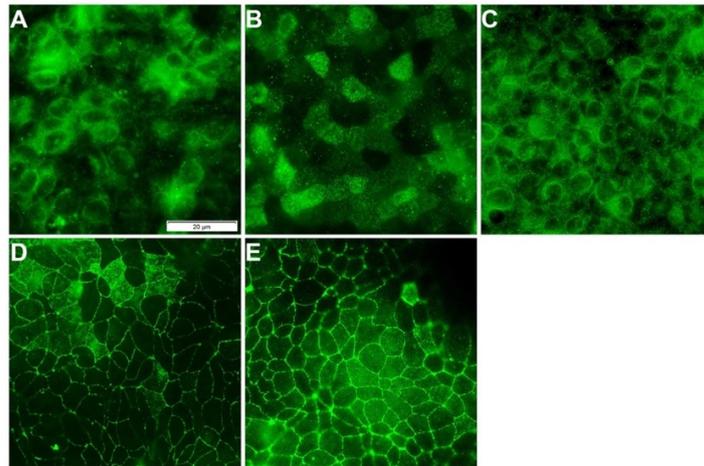


Figure 75. Expression de P-gp par microscopie à épifluorescence sur les cellules MDCK II (A), MDCK-MDR1 (B), MDCK-BCRP (C), Caco-2_{ATCC} (D) et Caco-2_{ECACC} (E).

L'immunofluorescence a également révélé une localisation membranaire de BCRP dans l'ensemble des modèles (Figure 76). La distribution de BCRP était homogène sur l'ensemble du tapis cellulaire et définie par un marquage apico-latéral fin et continu localisé au niveau des jonctions intercellulaires. Le signal était très faible et moins clair pour les MDCK II et il était très intense pour les MDCK-BCRP.

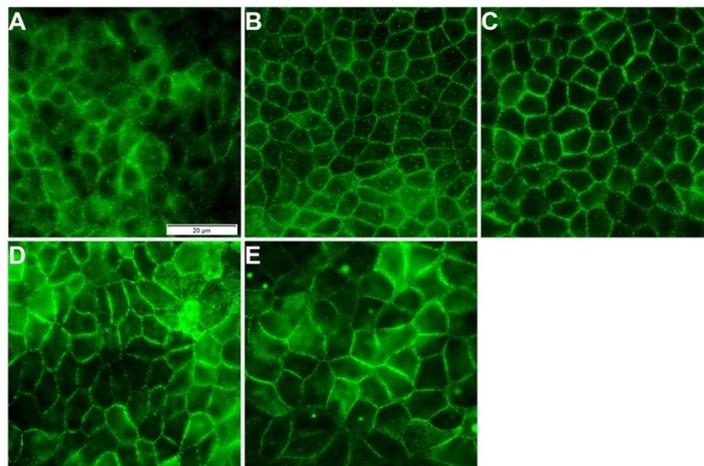


Figure 76. Expression de BCRP par microscopie à épifluorescence sur les cellules MDCK II (A), MDCK-MDR1 (B), MDCK-BCRP (C), Caco-2_{ATCC} (D) et Caco-2_{ECACC} (E).

Enfin, l'analyse protéomique par western blot a confirmé les profils d'expression de P-gp et BCRP précédemment observés en spectrométrie de masse, avec une expression plus importante dans les modèles MDCK transfectés respectifs (Figure 77).

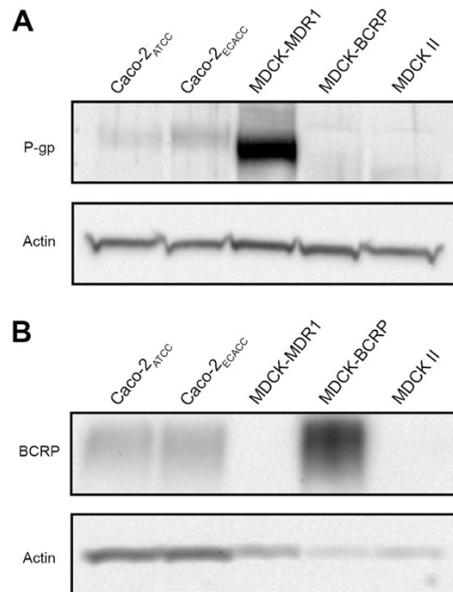


Figure 77. Expression de P-gp (A) et BCRP (B) par western blot.
Actine : protéine de contrôle.

Ensuite, une méthode de quantification absolue en spectrométrie de masse ciblant les transporteurs P-gp et BCRP a été développée et validée afin d'évaluer plus précisément la quantité de ces transporteurs dans les différents modèles étudiés. Concernant la méthode, deux peptides de quantification ont été retenus pour chaque protéine, avec à chaque fois un peptide spécifique de la protéine humaine et un peptide commun à la protéine humaine et canine. Lors de sa validation, toutes les courbes d'étalonnage présentaient un coefficient de détermination (R^2) supérieur à 0,98. Les peptides FYDPLAGK et VIQELGLDK avaient la limite de quantification (LLOQ) la plus basse (74,25 pM) et SLLDVLAAR la LLOQ la plus élevée (247,5 pM). La valeur de LLOQ pour FDTLVGER était de 148,5 pM. Comme attendu, les deux peptides spécifiques de la P-gp et BCRP humaine n'ont pas été observés dans les modèles MDCK, sauf dans les modèles transfectés MDCK-MDR1 et MDCK-BCRP, respectivement (Table 8). La quantification absolue a conduit à des résultats semblables à ceux de la quantification relative. Les cellules MDCK-MDR1 présentaient une quantité de P-gp environ cinq fois supérieure à celle des modèles Caco-2 et la quantité de P-gp était une fois et demie plus élevée dans les Caco-2_{ECACC} que dans les Caco-2_{ATCC}. De même, les cellules MDCK-BCRP présentaient une quantité de BCRP deux fois plus importante que les deux modèles

Caco-2 qui exprimaient une quantité similaire de BCRP. Le niveau d'expression de BCRP dans les cellules MDCK II et MDCK-MDR1 était inférieur à la LLOQ.

Table 8. Quantification absolue des transporteurs P-gp et BCRP dans les fractions membranaires des cellules Caco-2_{ATCC}, Caco-2_{ECACC}, MDCK II, MDCK-BCRP et MDCK-MDR1.

Protéine	Peptide	Concentrations (fmol/µg de protéine)				
		Caco-2 _{ATCC}	Caco-2 _{ECACC}	MDCK II	MDCK-BCRP	MDCK-MDR1
P-gp	FDTLVGER	0,340 ± 0,013	0,639 ± 0,019	0,321 ± 0,003	0,241 ± 0,019	2,847 ± 0,081
	FYDPLAGK*	0,359 ± 0,002	0,552 ± 0,009	< LLOQ	< LLOQ	2,394 ± 0,023
BCRP	SSLLDVLAAR	1,046 ± 0,020	1,082 ± 0,011	< LLOQ	2,302 ± 0,030	< LLOQ
	VIQELGLDK*	0,553 ± 0,036	0,604 ± 0,054	< LLOQ	1,317 ± 0,013	< LLOQ

*Peptide spécifique du transporteur humain

3.3. Évaluation de la fonctionnalité des transporteurs P-gp et BCRP dans l'efflux du rivaroxaban

La dernière partie de ce travail visait à évaluer la prise en charge du rivaroxaban par les transporteurs P-gp et BCRP sur les modèles Caco-2_{ATCC}, Caco-2_{ECACC}, MDCK-BCRP et MDCK-MDR1 à l'aide d'études de transport bidirectionnel menées avec deux inhibiteurs de référence de P-gp et BCRP (vérapamil et ko143, respectivement). Les ratios d'efflux du rivaroxaban en absence d'inhibiteur étaient de 3,13, 5,75, 11,5 et 7,22 dans les modèles Caco-2_{ATCC}, Caco-2_{ECACC}, MDCK-MDR1 et MDCK-BCRP respectivement. L'augmentation des concentrations d'inhibiteur a provoqué une diminution des $P_{app(A \rightarrow B)}$ et une augmentation parallèle des $P_{app(B \rightarrow A)}$, entraînant une diminution de l'efflux du rivaroxaban en présence de vérapamil (Figure 78) et de ko143 (Figure 79) dans les quatre modèles cellulaires. La modélisation des ratios d'efflux a permis d'estimer les valeurs d'IC₅₀ de l'efflux du rivaroxaban pour le vérapamil et le ko143 sur chaque modèle. Pour le vérapamil, l'IC₅₀ la plus faible a été obtenue dans le modèle MDCK-MDR1 (6,94 µM contre 21,2, 24,8 et 137,8 µM pour Caco-2_{ATCC}, Caco-2_{ECACC} et MDCK-BCRP, respectivement) (Figure 78). Les deux modèles Caco-2 présentaient des IC₅₀ similaires malgré un ratio d'efflux sans inhibiteur plus élevé dans les Caco-2_{ECACC}.

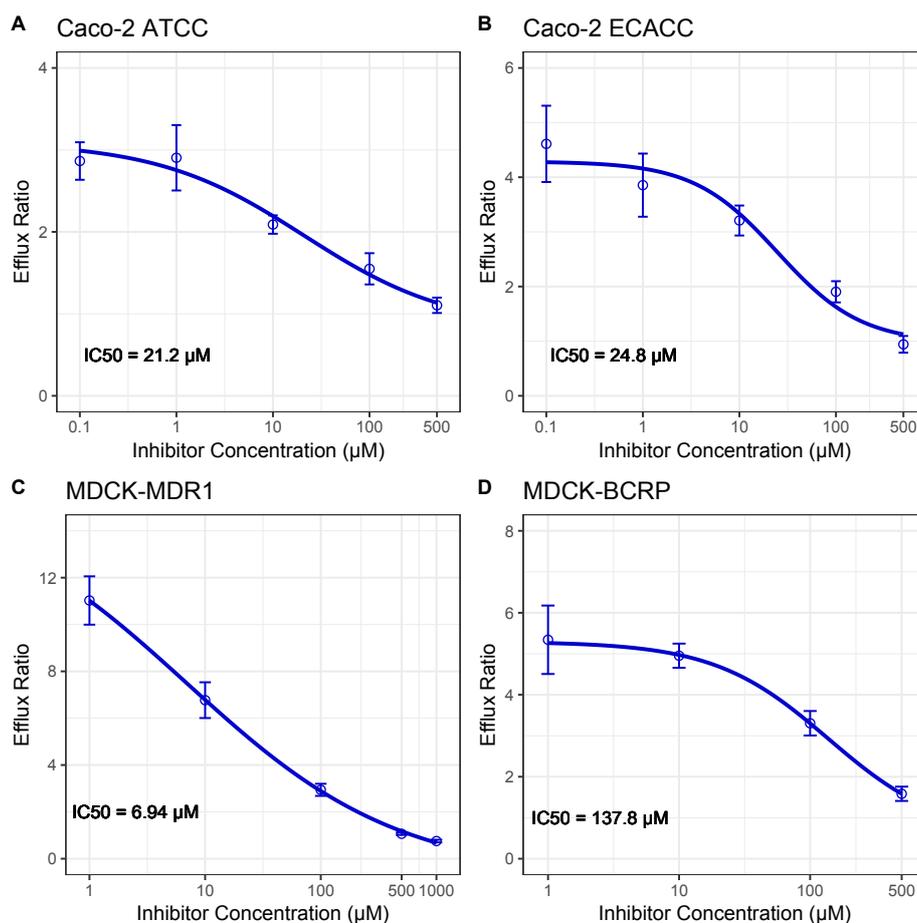


Figure 78. Ratios d'efflux du rivaroxaban ($10 \mu\text{M}$) dans les cellules Caco-2_{ATCC} (A), Caco-2_{ECACC} (B), MDCK-MDR1 (C) et MDCK-BCRP (D), en absence et en présence de concentrations croissantes de vérapamil (0,1, 1, 10, 100, 500 et 1000 μM).

Concernant le ko143, l'IC₅₀ la plus faible a été obtenue dans le modèle MDCK-BCRP (0,026 μM contre 0,52, 0,18 et 7,44 pour Caco-2_{ATCC}, Caco-2_{ECACC} et MDCK-MDR1, respectivement) (Figure 79). Aux plus fortes concentrations d'inhibiteur l'inhibition de l'efflux était complète, excepté pour le ko143 dans le modèle Caco-2_{ECACC}. Dans l'ensemble, les valeurs d'IC₅₀ étaient considérablement plus faibles pour le ko143 que pour le vérapamil, suggérant que le ko143 est un inhibiteur plus puissant des transporteurs P-gp et BCRP.

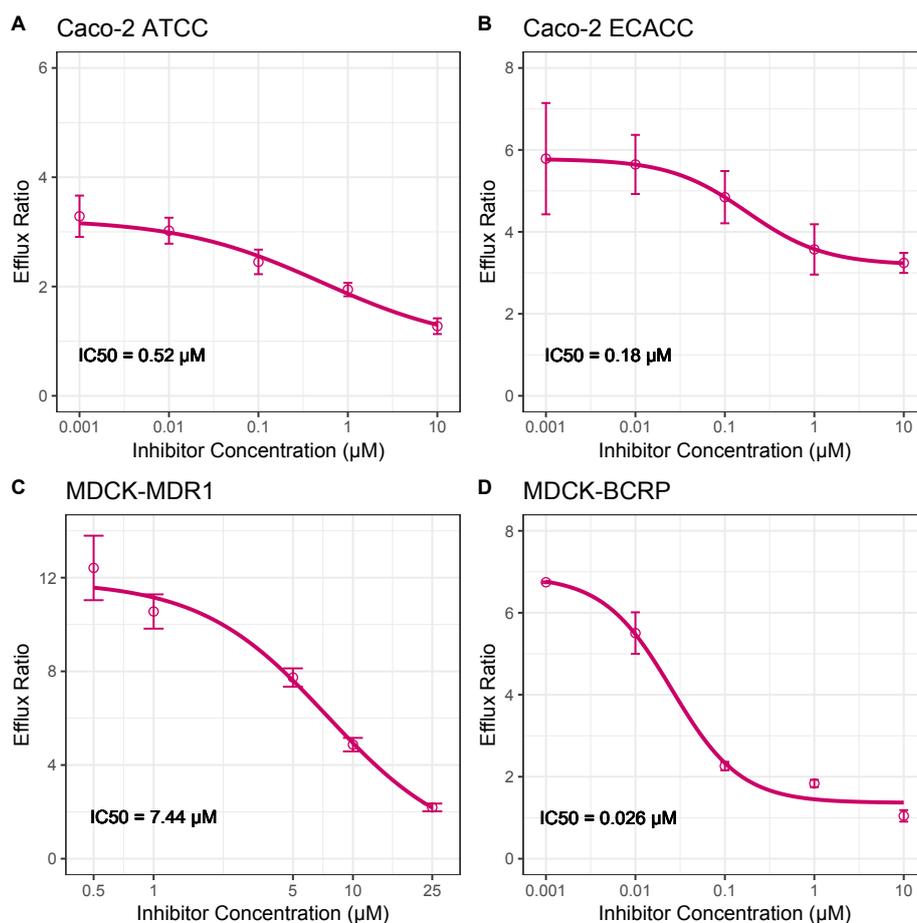


Figure 79. Ratios d'efflux du rivaroxaban (10 μM) dans les cellules Caco-2_{ATCC} (A), Caco-2_{ECACC} (B), MDCK-MDR1 (C) et MDCK-BCRP (D), en absence et en présence de concentrations croissantes de ko143 (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 25 μM).

En conclusion, cette étude a mis en évidence la relation entre l'expression des transporteurs ABC dans les modèles cellulaires et le transport d'efflux du rivaroxaban. Elle a permis de montrer que le choix du modèle a une réelle influence sur les valeurs d'IC₅₀ et donc sur l'interprétation des résultats. En effet, si l'on s'intéresse aux IAM liées au transport du rivaroxaban par P-gp, l'IC₅₀ sur le modèle MDCK-MDR1 suggère que des IAM cliniquement significatives sont possibles ce qui nécessite des études *in vivo*, ce qui n'est pas le cas pour les IC₅₀ estimées sur les modèles Caco-2. Cette variabilité des IC₅₀ est en partie due à une différence d'expression des transporteurs ABC dans ces modèles cellulaires. La spectrométrie de masse a permis de quantifier avec précision les transporteurs P-gp et BCRP et a révélé un niveau d'expression plus élevé dans les modèles

cellulaires qui présentaient un transport d'efflux du rivaroxaban plus important. Cette technique apparaît donc comme un outil intéressant pour interpréter plus précisément les IC50 obtenues sur différents modèles et améliorer la prédiction des modèles *in vitro* en ce qui concerne les risques d'IAM liées aux transporteurs d'efflux.

Manuscript Details

Manuscript number	EJPB_2019_1038
Title	Value of quantifying ABC transporters by mass spectrometry and impact on in vitro-to-in vivo prediction of transporter-mediated drug-drug interactions of rivaroxaban.
Article type	Research Paper

Abstract

ABC transporters, such as P-gp and BCRP, are highly involved in rivaroxaban pharmacokinetics and can lead to drug-drug interactions (DDIs). Transport of rivaroxaban and transporter-mediated DDIs are commonly assessed using in vitro models. However, interpretation of rivaroxaban efflux transport and DDI studies in cell models may be influenced by P-gp and BCRP transporter abundance. This study aimed to develop an LC-MS/MS quantification method for assessing the relationship between transporter expression and functionality in Caco-2ATCC, Caco-2ECACC, MDCK-MDR1, MDCK-BCRP cell models. First, the relative and absolute quantities of the transporters were determined by LC-MS/MS. P-gp and BCRP expression was then confirmed by western blotting and immunofluorescence staining. Finally, P-gp and BCRP functional activities and half-inhibitory concentrations (IC₅₀s) of two specific inhibitors (verapamil and ko143) were determined by bidirectional transport experiments. P-gp and BCRP protein expression was detected at the cell membrane and was greater in the respective transfected models. Efflux ratios were correlated with P-gp and BCRP quantities. The lowest IC₅₀s were obtained in the MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP models for verapamil and ko143, respectively. In conclusion, this study demonstrated that LC-MS/MS can accurately quantify P-gp and BCRP efflux transporters and thereby improve the interpretation of transport data and in vitro-in vivo correlations.

Keywords	ABC transporters; quantitative LC-MS/MS; P-glycoprotein; Breast Cancer Resistance Protein; Caco-2; MDCK; bidirectional transport
Taxonomy	Transporter Related Drug-Drug Interaction, Mass Spectrometry
Corresponding Author	Elodie Jacquerooux
Corresponding Author's Institution	Université Jean Monnet
Order of Authors	Elodie Jacquerooux, Sophie HODIN, sonia saib, Zhiguo He, Valérie Bin, Olivier Delézay, Xavier Delavenne
Suggested reviewers	Inna Gong, Mark-Jean Gnoth, Junichi Kamiie, Per Artursson, Donna Volpe

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

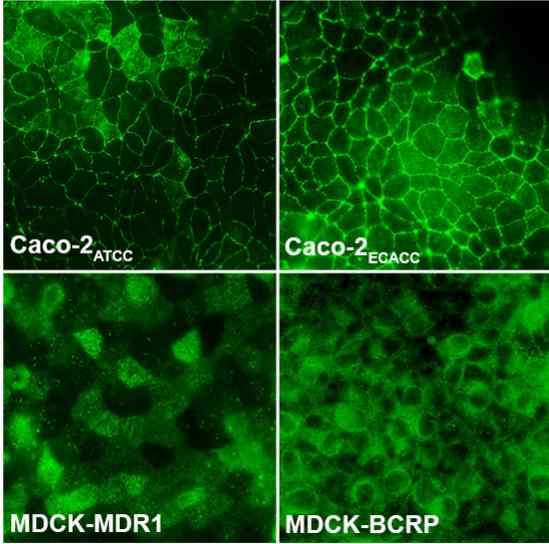
CoverLetter_E_Jacquerooux.docx [Cover Letter]

Graphical abstract_E_Jacquerooux.jpg [Graphical Abstract]

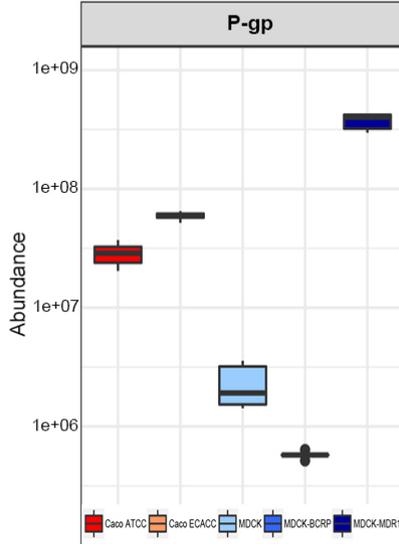
Article_E_Jacquerooux.docx [Manuscript File]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

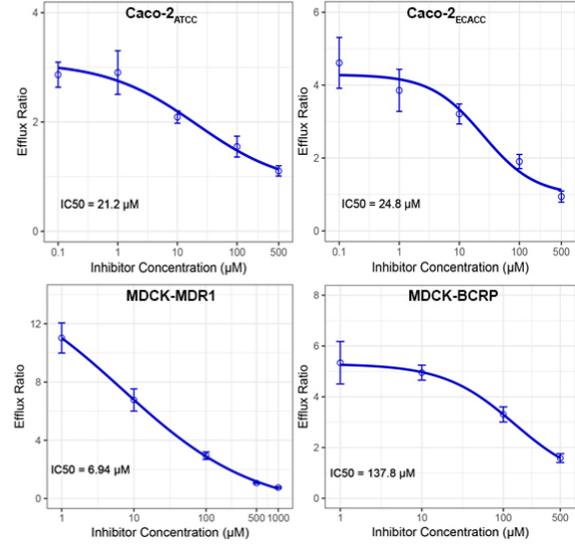
Immunofluorescence of P-gp



Mass spectrometry



Functionality of P-gp



1
2
3
4 1 **Title:** Value of quantifying ABC transporters by mass spectrometry and impact
5 2 on *in vitro*-to-*in vivo* prediction of transporter-mediated drug-drug interactions
6 3 of rivaroxaban.
7
8 4

9 5 Jacqueroux E.^{a,*}, Hodin S.^a, Saib S.^a, He Z.^b, Bin V.^a, Delézay O.^a, Delavenne X.^{a,c}
10
11 6
12 7

13
14
15 8 ^a INSERM U1059, Laboratoire Sainbiose, Equipe Dysfonctions Vasculaires et Hémostase,
16 9 Université de Lyon, Saint-Etienne, France

17
18 10 ^b Laboratoire de biologie, ingénierie et imagerie de la greffe de cornée, BiiGC, EA2521, Saint-
19 11 Etienne, France

20 12 ^c Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France
21
22 13
23 14

24
25 15 Elodie Jacqueroux*: elodie.jacqueroux@univ-st-etienne.fr
26
27 16

28 17 Sophie Hodin: sophie.hodin@univ-st-etienne.fr
29
30 18

31 19 Sonia Saib: soniasaib42@gmail.com
32
33 20

34 21 Valérie Bin: valerie.bin@univ-st-etienne.fr
35
36 22

37 23 Zhiguo He: zhiguo.he@univ-st-etienne.fr
38
39 24

40 25 Olivier Delézay: olivier.delezay@univ-st-etienne.fr
41
42 26

43 27 Xavier Delavenne: xavier.delavenne@univ-st-etienne.fr
44
45 28

46 29 *Corresponding author:
47 30

48 31 Dr. Elodie Jacqueroux
49
50 32

51 33 Address : Faculté de Médecine – 10 rue de la Marandière, 42270 Saint-Priest-en-Jarez, France
52
53 34

54 35 E-mail: elodie.jacqueroux@univ-st-etienne.fr
55
56 36

57 37 Phone: +33(0) 4 77 42 14 43
58
59 38
60 39

61
62
63 **1 Abstract**
64

65 2 ABC transporters, such as P-gp and BCRP, are highly involved in rivaroxaban
66
67 3 pharmacokinetics and can lead to drug-drug interactions (DDIs). Transport of rivaroxaban and
68
69 4 transporter-mediated DDIs are commonly assessed using *in vitro* models. However,
70
71 5 interpretation of rivaroxaban efflux transport and DDI studies in cell models may be influenced
72
73 6 by P-gp and BCRP transporter abundance. This study aimed to develop an LC-MS/MS
74
75 7 quantification method for assessing the relationship between transporter expression and
76
77 8 functionality in Caco-2_{ATCC}, Caco-2_{ECACC}, MDCK-MDR1, MDCK-BCRP cell models. First,
78
79 9 the relative and absolute quantities of the transporters were determined by LC-MS/MS. P-gp
80
81 10 and BCRP expression was then confirmed by western blotting and immunofluorescence
82
83 11 staining. Finally, P-gp and BCRP functional activities and half-inhibitory concentrations
84
85 12 (IC50s) of two specific inhibitors (verapamil and ko143) were determined by bidirectional
86
87 13 transport experiments. P-gp and BCRP protein expression was detected at the cell membrane
88
89 14 and was greater in the respective transfected models. Efflux ratios were correlated with P-gp
90
91 15 and BCRP quantities. The lowest IC50s were obtained in the MDCK-MDR1 and MDCK-
92
93 16 BCRP models for verapamil and ko143, respectively. In conclusion, this study demonstrated
94
95 17 that LC-MS/MS can accurately quantify P-gp and BCRP efflux transporters and thereby
96
97 18 improve the interpretation of transport data and *in vitro-in vivo* correlations.
98
99
100
101
102
103
104

105 21 **Keywords:** ABC transporters, quantitative LC-MS/MS, P-glycoprotein, Breast Cancer
106 22 Resistance Protein, Caco-2, MDCK, bidirectional transport
107
108
109

110 24 **1. Introduction**
111
112
113

114 26 Rivaroxaban, a direct oral anticoagulant (DOAC), is a well-known substrate of efflux
115
116 27 transporters, such as P-glycoprotein (P-gp) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) [1–
117
118
119
120

121
122
123 1 3], which are particularly involved in its intestinal absorption and biliary and renal elimination.
124
125 2 Significant *in vivo* pharmacokinetic DDIs have been reported when cytochromes P450 (CYP),
126
127 3 particularly CYP3A4, and efflux transporters are strongly inhibited by other drugs (such as
128
129 4 verapamil, ketoconazole or ritonavir), leading to increased exposure to rivaroxaban [4–6]. ATP-
130
131 5 Binding Cassette (ABC) transporters, such as P-gp and BCRP, are well known to be involved
132
133 6 in drug pharmacokinetics [7]. These proteins are located on the cell membrane at various tissue
134
135 7 interfaces, such as the intestinal, hepatic, renal, placental and brain barriers, and act as efflux
136
137 8 transporters, thereby limiting the intestinal absorption and promoting the urinary or biliary
138
139 9 elimination of many drugs [7]. Thus, co-administration of substrates and inhibitors or inducers
140
141 10 of these transporters may result in clinically relevant drug-drug interactions (DDIs) [8,9].
142
143
144

145 11 To study the involvement of the P-gp and BCRP transporters in drug pharmacokinetics,
146
147 12 the US Food and Drug Administration (FDA) recommends the use of various *in vitro* systems,
148
149 13 including cell models [10]. The Caco-2 cell model has been widely used as an *in vitro* model
150
151 14 of the human intestinal mucosa [11]. As the permeation of drugs across Caco-2 cell monolayers
152
153 15 correlates with their human intestinal permeation, this cell line has been used as a reference for
154
155 16 drug intestinal absorption studies. Use of the Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line has
156
157 17 also been reported in drug absorption studies. This cell line is increasingly employed as it grows
158
159 18 faster than the Caco-2 cell line, and MDCK and Caco-2 cells have been reported to share
160
161 19 common epithelial cell characteristics [12]. Modified MDCK cell lines, such as MDCK-MDR1
162
163 20 and MDCK-BCRP, have been generated by transfecting the human ABCB1 or ABCG2 gene
164
165 21 into MDCK cells. These transfected cell models, specifically overexpressing a single
166
167 22 transporter, facilitate the design of studies to elucidate the involvement of individual
168
169 23 transporters in drug disposition. However, the Caco-2 and MDCK models display different
170
171 24 barrier properties, as illustrated by their transepithelial electrical resistance (TEER) values:
172
173 25 about 600 ohm.cm² for Caco-2 cells compared to only 100 ohm.cm² for MDCK cells.
174
175
176
177
178
179
180

181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240

1 Moreover, these models have different characteristics in terms of protein expression [13,14].
2 Transfected-MDCK cells overexpress transporters compared to native and Caco-2 cells and the
3 expression and localization of transporters depend on the source of the cell lines used. Caco-2
4 cells can be obtained either from the American Type Culture Collection (ATCC) or from the
5 European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), and expression of the mRNA
6 of proteins such as ABC and SLC transporters differs depending on source selected [15]. An *in*
7 *vitro-in vivo* correlation (IVIVC) has been established for absorption studies using Caco-2 and
8 MDCK cells, particularly for passive drug absorption, but there is no well-established IVIVC
9 for predicting *in vivo* transporter-mediated DDIs from the results obtained in *in vitro* models
10 [16–18]. Further investigative analyses concerning the experimental protocols used in *in vitro*
11 assays are therefore needed to establish better IVIVCs for transporter-mediated DDIs.
12 According to FDA [10], the $[I_1]/IC_{50} > 0.1$ or $[I_2]/IC_{50} > 10$ ratio (based on IC_{50} s derived from
13 *in vitro* studies) can be used as a metric for establishing the IVIVC for DDIs. However, analysis
14 of published IC_{50} s for several P-gp inhibitors revealed large interlaboratory variations for the
15 same substrate that limit clear establishment of an IVIVC [19–21]. This could be partly
16 explained by a variability in the expression of membrane transporters depending on many
17 factors, such as culture conditions (composition of the medium, nature of the culture surface,
18 cell seeding density, etc.), culture time or passage number (the higher the number of passages,
19 the greater the expression of transporter) [22,23].

20 Accurate quantitative information on expression of ABC transporters in these cell
21 models would therefore be of value for correctly interpreting the experimental data generated
22 in drug permeability and drug-drug interaction studies. Several techniques can be used to
23 evaluate protein expression at the cell level. Recently, liquid chromatography coupled with
24 tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been increasingly used for the evaluation and
25 quantification of membrane transporters in various samples [24–26]. This technology is

241
242
243 1 becoming more and more accessible for laboratories and enables quantification of many
244
245 2 proteins on a routine basis.
246

247
248 3 The aim of this study was to assess the influence of P-gp and BCRP expression levels
249
250 4 on the capacity of *in vitro* cell models to predict rivaroxaban pharmacokinetics and transporter-
251
252 5 mediated DDIs, by developing and validating a reliable quantification method by LC-MS/MS
253
254 6 in accordance with FDA guidelines.
255
256

257 7 258 259 8 **2. Materials and Methods**

260 261 262 9 *2.1. Chemicals and reagents*

263
264
265 10 Methanol, water, acetonitrile (ACN), trifluoroacetic acid (TFA) and formic acid were
266
267 11 purchased from Carlo Erba Reagents (Milan, Italy). All solvents were LC-MS grade.
268
269 12 Rivaroxaban and [¹³C₆]-rivaroxaban were obtained from Alsachim (Illkirch, France). Bovine
270
271 13 serum albumin (BSA), AQUA peptides, Micro BCA assay kit, Mem-PER Plus membrane
272
273 14 protein extraction kit, Mass Spec sample prep kit and Pierce Peptide desalting spin column were
274
275 15 purchased from ThermoFisher Scientific (Massachusetts, USA). Crude heavy-labeled standard
276
277 16 peptides were obtained from JPT Peptides Technologies (Berlin, Germany). Dulbecco's
278
279 17 modified Eagle's medium (DMEM), Hank's balanced salt solution (HBSS), Dulbecco's
280
281 18 phosphate buffered saline without sodium and magnesium (DPBS), HEPES buffer, heat-
282
283 19 inactivated fetal bovine serum (FBS), trypsin, nonessential amino acids, penicillin,
284
285 20 amphotericin B, streptomycin, dimethyl sulfoxide (DMSO), verapamil, ko143 and cyclosporine
286
287 21 A were purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Eagle's Minimum Essential
288
289 22 Medium (EMEM) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC)
290
291 23 (Rockville, MD, USA).
292
293
294
295
296 24

2.2. Cell culture

MDCK II, MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cells were gifts from Prof. Piet Borst (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands). Caco-2_{ATCC} cells (HTB-37) were purchased from the ATCC (Rockville, MD, USA) and Caco-2_{ECACC} cells (ECACC 86010202) were purchased from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (Salisbury, UK). The cells were maintained in culture medium consisting of DMEM or EMEM for Caco-2_{ECACC}, supplemented with 10% FBS, 1% nonessential amino acids, 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin and 250 ng/mL amphotericin B at 37°C, 95% relative humidity and 5% CO₂. For the transport assays, cells were seeded onto insert filters (Falcon[®], translucent PET membrane, surface area of 0.3 cm², 0.4 µm pore size, high-density) in 24-well companion plates (Dominique Dutscher, Strasbourg, France). MDCK II, MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cells were seeded at a density of 1×10⁵ to 1.5×10⁵ cells/insert and cultured for 5 days. The culture medium was changed once every day. Caco-2 cells were seeded at a density of 1×10⁴ to 1.5×10⁴ cells/insert and cultured for 21 days. The culture medium was changed once every 2-3 days.

To confirm cell monolayer confluence, TEER was measured in each well before and after transport assay using an EVOM resistance meter (World Precision Instruments, Sarasota, USA). The permeability assay was performed only on inserts with TEER values above 150 ohm.cm² for Caco-2 cells and above 40 ohm.cm² for MDCK II, MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cells.

2.3. Expression and quantification of ABC transporters

2.3.1. Western blotting

Confluent cell monolayers were collected and lysed in freshly prepared RIPA lysis buffer. The total cell protein content was quantified using the BCA assay kit. Aliquots of 50 µg

361
362
363 1 of protein were size-fractionated in a 4-12% Tris glycine acrylamide gel in MOPS buffer.
364
365 2 Proteins were then transferred onto 0.45 μ m nitrocellulose membranes. The membranes were
366
367 3 incubated with primary antibodies diluted 1/100 for P-gp (monoclonal antibody sc-55510;
368
369 4 Santa Cruz Biotechnology), 1/250 for BCRP (monoclonal antibody BXP-21; Santa Cruz
370
371 5 Biotechnology) and 1/400 for β -actin (monoclonal antibody sc-47778; Santa Cruz
372
373 6 Biotechnology) in the blocking buffer overnight at 4°C, and then probed for 1.5 h with
374
375 7 horseradish peroxidase (HRP)- conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology)
376
377 8 diluted 1/5000 in the blocking buffer. Proteins were detected using the
378
379 9 electrochemiluminescence method according to the manufacturer's protocol.
380
381
382
383
384
385

386 11 *2.3.2. Immunofluorescence*

388
389 12 ZO-1, P-gp and BCRP were localized by immunofluorescence studies in all cell models.
390
391 13 Briefly, cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde (PAF) or methanol for 30 min and
392
393 14 permeabilized with 0.2% Triton-X100. Non-specific binding sites were blocked by incubating
394
395 15 the cells in complete medium containing 10% FBS for 30 min. The inserts membranes were
396
397 16 then cut up and incubated with the primary antibodies (sc-55510 for P-gp and BXP-21 for
398
399 17 BCRP) diluted 1/100 in the blocking buffer for 1 h. The secondary antibodies were diluted
400
401 18 1/200 in the blocking buffer and incubated for 1 h, the nuclei then being counterstained with
402
403 19 DAPI diluted 1/1000 in the blocking buffer. All biomarkers were imaged using an inverted
404
405 20 epifluorescence microscope IX81 (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with CellSens imaging
406
407 21 software (Olympus, Munster, Germany).
408
409
410
411

413 23 *2.3.3. Quantification by liquid chromatography – high resolution mass spectrometry*

416 24 *2.3.3.1. Sample preparation*

421
422
423 1 Samples were prepared as previously described [27]. Briefly, the membrane protein
424
425 2 fraction was extracted using the Mem-PER Plus membrane protein extraction kit according to
426
427 3 the manufacturer's protocol. Protein concentration was measured using the Micro BCA protein
428
429 4 assay kit. In-solution tryptic digestion was performed using the Pierce Mass Spec sample prep
430
431 5 kit. Briefly, 100 µg of membrane protein fraction were reduced with 10 mM dithiothreitol
432
433 6 (DTT) for 45 min at 50°C, then alkylated with 50 mM iodoacetamide (IAA) for 20 min at room
434
435 7 temperature. The proteins were digested with Lys-C (1:100) at 37°C for 2 h then with trypsin
436
437 8 (1:50) for 16 h at 37°C. Each sample was desalted using the Pierce Peptide desalting spin
438
439 9 column according to the manufacturer's protocol.
440
441
442
443 10

444 445 446 11 *2.3.3.2. Relative quantification*

447
448 12 Relative quantification was performed as previously described [27]. Briefly,
449
450 13 chromatography was performed on an Easy-spray C18 column 2 µm, 0.075 mm ID × 500 mm
451
452 14 (ThermoFisher Scientific, USA) with a 150 min gradient. Mobile phase A comprised water
453
454 15 with 0.1% formic acid, and mobile phase B was 80% acetonitrile with 0.08% formic acid.
455
456 16 Peptides were eluted by a gradient from 2.5% to 40% of mobile phase B over 123 min, followed
457
458 17 by a short wash in 90% mobile phase B before return to the starting conditions. A precursor
459
460 18 scan of intact peptides was recorded in the orbitrap by scanning from m/z 375-1500 (with a
461
462 19 resolution of 70,000) and the 10 most intense multi-charged precursors were selected for
463
464 20 higher-energy collision dissociation (HCD) analysis in the C-trap.
465
466
467
468
469
470

471 22 *2.3.3.3. Absolute quantification*

472
473
474 23 Chromatography was performed using an Ultimate U3000 liquid chromatography
475
476 24 system (Dionex, California, USA) at a flow rate of 300 nL/min. Peptides were first loaded onto
477
478
479
480

481
482
483 1 an Acclaim PepMap 100 C18 trap column (100 μm ×2 cm, C18, 5 μm , 100A) at 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ with
484
485 2 water containing 2% acetonitrile and 0.1% TFA. They were then separated on an Easy-spray
486
487 3 C18 column 2 μm , 0.075 mm ID x 150 mm (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA)
488
489 4 with a 45 min gradient. Mobile phase A comprised water with 0.1% formic acid (FA), and
490
491 5 mobile phase B was 80% acetonitrile with 0.08% FA. Peptides were eluted by the following
492
493 6 gradient: 0-30 min: linear from 5% to 45% B; 30-31 min: linear from 45% to 90% B; 31-38
494
495 7 min: 90% B; 38.5 min return to the initial conditions up to 45 min.

498
499 8 Peptides were quantified by parallel reaction monitoring (PRM)-based targeted mass
500
501 9 spectrometry in electrospray positive mode. For each peptide, the three most intense fragments
502
503 10 were retained. The acquisition method combined a full-scan method with a time-scheduled
504
505 11 multiplexed PRM method. The full-scan method was performed with a resolution of 17 500, an
506
507 12 AGC target value of 3×10^6 , a maximum injection time of 200 ms and a scan range from 400 to
508
509 13 1200 m/z . The PRM method parameters were: a resolution of 35 000 (at m/z 200), an AGC
510
511 14 target value of 2×10^5 , a maximum injection time of 200 ms and an isolation window of 0.7 m/z .
512
513 15 HCD fragmentation was performed with a normalized collision energy of 27.

514
515
516 16 The method was validated according to the FDA recommendations for bioanalytical
517
518 17 method validation [28]. For each protein, three proteotypic peptides were selected. The two
519
520 18 most intense were selected as quantification peptides, the third peptide serving as a
521
522 19 confirmation peptide. The quantification peptides for P-gp and BCRP were FDTLVGER
523
524 20 (shared by canine and human P-gp) and FYDPLAGK (specific to human P-gp), and
525
526 21 SLLDVLAAR (shared by canine and human BCRP) and VIQELGLDK (specific to human
527
528 22 BCRP), respectively. For each peptide, the three most intense fragments were selected and used
529
530 23 for quantification. Calibration standards and QC levels for each peptide are summarized in
531
532 24 Table 1. Additional information on method validation is available in the Supplementary
533
534 25 information.
535
536
537
538
539
540

2.4. Bidirectional transport assay

Four cell models were used to investigate the bidirectional permeabilities of rivaroxaban. The transport studies were performed on inserts consisting of two compartments (apical and basolateral), separated by a cell monolayer cultured on a porous filter, as described previously [1]. Bidirectional apparent permeabilities were computed according to the following equation:

$$P_{\text{app}} = \left(\frac{V}{[C_0] \times S} \right) \times \left(\frac{[C_2]}{t} \right) \quad (1)$$

where V is the volume of the receiver compartment, $[C_0]$ is the initial concentration of the compound, S is the area of the cell monolayer, $[C_2]$ is the final concentration of the compound in the receiver compartment, and t is the incubation time.

Efflux ratios ($ER = P_{\text{app}} (B \rightarrow A) / P_{\text{app}} (A \rightarrow B)$) were then computed to assess the activity of transporters on drug kinetics across the model, the standard deviation of the efflux ratio being calculated according to the formula proposed by Gnoth et al. [2]. According to FDA guidelines [29], an ER above 2 indicates that the drug is an efflux transporter substrate. All the available samples in the receiver compartments were analyzed by LC-MS/MS as previously described [1].

2.4.1. Determination of half-maximal inhibitory concentration

The half-maximal inhibitory concentration (IC50) is used as a measure of inhibitory drug potency. The IC50 was determined using concentrations ranging from 0.1 to 1000 μM and 0.001 to 25 μM for verapamil and ko143, respectively. The concentration of rivaroxaban was

1 10 μ M. To calculate IC50 values, curves were fitted to data by unweighted, nonlinear, least-
2 squares regression modelling of the Efflux Ratio with the nls() function in R software.
3 Calculation was performed by a sigmoid model using the following equation:

$$4 \quad ER = I_{max} + \frac{[I_0 - I_{max}]}{1 + \left(\frac{[I]}{IC50}\right)^h} \quad (2)$$

5 where ER is the observed efflux ratio, $[I]$ is the inhibitor concentration, h is the Hill coefficient
6 of the sigmoid model, I_0 is the initial effect without inhibitor and I_{max} is the maximal effect of
7 the model.

9 2.5. Data analysis

10 Data acquisition and analysis were performed using TraceFinder[®] Clinical software 4.1
11 (ThermoFisher Scientific) for precise quantification and ProteomeDiscoverer[®] 2.2
12 (ThermoFisher Scientific) software for relative quantification. R software was used for
13 statistical analysis and graphic outputs (R Foundation for Statistical Computing, Vienna,
14 Austria, URL <https://www.R-project.org/>).

16 3. Results

18 3.1. Expression of junction proteins and phenotypic markers

19 Expression of the tight junction protein zonula occludens 1 (ZO-1) was investigated by
20 immunofluorescence staining (Fig. 1) to check the tightness of the monolayer. A bright and
21 homogeneous signal of ZO-1 was localized at the cell membrane at the junction between cells
22 in all models. Protein mass spectrometry analysis was used to assess the relative expression of
23 six junction proteins (Fig. 2) in Caco-2_{ATCC}, Caco-2_{ECACC}, MDCK II, MDCK-MDR1 and

661
662
663 1 MDCK-BCRP cells. Occludin showed a 10 to 100-fold greater abundance in Caco-2 models
664
665 2 compared to MDCK cells, in relation to a higher TEER. The abundance of ZO-1 and ZO-2
666
667 3 proteins was higher in MDCK models than in Caco-2 cells while ZO-3 showed a closely similar
668
669 4 abundance in all models. Among MDCK models, the highest abundance for occludin was
670
671 5 observed in MDCK-BCRP cells. Cadherin-1 and 17 exhibited a 5 to 10-fold greater abundance
672
673 6 in Caco-2 cells compared to MDCK II and MDCK-BCRP cells, being detected to a slightly
674
675 7 lower extent in MDCK-MDR1 cells.
676
677

678
679 8 A phenotypic marker was used for each cell model. Dipeptidyl peptidase-4 was selected
680
681 9 as a specific intestinal marker for Caco-2 cells [30] and V-type proton ATPase was selected as
682
683 10 a specific renal marker for MDCK cells [31]. The abundance of dipeptidyl peptidase-4 was 10-
684
685 11 fold greater in Caco-2 models than in MDCK models while V-type proton ATPase showed a
686
687 12 higher abundance in MDCK cells (Fig. 3). These positive controls confirmed the relevance of
688
689 13 the label-free proteomic analysis used for relative quantification.
690
691

692 14 693 694 15 *3.2. Expression and quantification of P-gp and BCRP efflux transporters*

695
696 16 Expression of ABC transporters was first investigated by mass spectrometry. Absolute
697
698 17 quantification by LC-MS/MS was performed to assess the precise amount of P-gp and BCRP
699
700 18 in the five models, using two quantification peptides for each protein. For method validation,
701
702 19 linearity, accuracy and precision were proven by analysing calibration curves for each of the
703
704 20 four peptides (Fig. S1). All calibration curves gave R² values above 0.98. The FYDPLAGK
705
706 21 and VIQELGLDK peptides had the lowest LLOQ (74.25 pM), SLLDVLAAR having the
707
708 22 highest LLOQ (247.5 pM). The LLOQ value for FDTLVGER was 148.5 pM. Precision was
709
710 23 always better than 15% and accuracy was always \pm 15% of the nominal concentration (Table
711
712 24 S1). As expected, the two peptides specific to human P-gp and BCRP were not observed in
713
714 25 MDCK models, except in the transfected models MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP,
715
716
717
718
719
720

721
722
723 1 respectively (Table 2). Transfected MDCK-MDR1 cells showed a P-gp expression about 5-fold
724
725 2 higher than that observed in the Caco-2 models. The expression level of BCRP was under the
726
727 3 LLOQ for MDCK II and MDCK-MDR1 cells. Both Caco-2 models showed a 2-fold lower
728
729 4 amount of BCRP than that determined in transfected MDCK-BCRP cells. Interestingly, Caco-
730
731 5 2_{ECACC} cells exhibited a 1.5-fold greater amount of P-gp than that seen Caco-2_{ATCC} cells,
732
733 6 whereas the amount of BCRP was closely similar in the two Caco-2 models.
734
735

736
737 7 These results were confirmed by LC-MS/MS relative quantification. P-gp, BCRP,
738
739 8 MRP1, MRP2, MRP3 and MRP4 were detected in proteomic analyses with differing abundance
740
741 9 levels (Fig. 4). P-gp exhibited a 10-fold higher abundance in MDCK-MDR1 cells compared to
742
743 10 Caco-2 cells, whereas MDCK II and MDCK-BCRP cells showed a low abundance of P-gp. A
744
745 11 difference in the abundance of P-gp was also observed between the two Caco-2 models, with a
746
747 12 greater abundance in Caco-2_{ECACC} cells. BCRP showed a closely similar abundance in Caco-2
748
749 13 and MDCK II cells. The greatest BCRP abundance was observed in MDCK-BCRP cells, while
750
751 14 the lowest abundance was found in MDCK-MDR1 cells. The lowest abundance for MRP1 was
752
753 15 observed in MDCK II cells. MRP1 showed a similar abundance in Caco-2_{ECACC}, MDCK-
754
755 16 MDR1 and MDCK-BCRP models. MRP1 was detected to a slightly greater extent in Caco-
756
757 17 2_{ATCC} cells. The greatest abundance of MRP2 was detected in the two Caco-2 models (more
758
759 18 than 10-fold higher than in the MDCKs models). Caco-2_{ECACC} cells showed a greater abundance
760
761 19 of MRP2 than Caco-2_{ATCC} cells. The abundance of MRP3 and MRP4 was 10-fold higher in
762
763 20 MDCK models than in Caco-2 models.
764
765

766
767 21 The expression of P-gp and BCRP was then confirmed by western blotting (Fig. 5).
768
769 22 Regarding P-gp expression, the western blot data showed a more intense signal in MDCK-
770
771 23 MDR1 cells than in Caco-2 cells at a molecular weight of approximately 170 kDa (Fig. 5A).
772
773 24 No bands were detected in the MDCK-BCRP and MDCK II models. The band detected in
774
775 25 Caco-2_{ECACC} cells was slightly more intense than that seen in Caco-2_{ATCC} cells. BCRP
776
777
778
779
780

781
782
783 1 expression was observed on MDCK-BCRP and Caco-2 cells (Fig. 5B). The bands were detected
784
785 2 at a high molecular weight, suggesting that we detected the BCRP dimer as the assay was not
786
787 3 conducted under reducing conditions. The most intense signal was detected in the MDCK-
788
789 4 BCRP cells, whereas the signal intensity was similar in both Caco-2_{ATCC} and Caco-2_{ECACC} cells.
790

791
792 5 Finally, immunofluorescence staining showed a membrane localization for P-gp in the
793
794 6 two Caco-2 models and in the MDCK-MDR1 model (Fig. 6). In MDCK-MDR1 cells (Fig. 6B),
795
796 7 P-gp was stained strongly and homogeneously over the whole surface, with an expression
797
798 8 characterized by bright multiple fluorescent spots covering the whole apical membrane of most
799
800 9 cells. Caco-2 cells showed a more heterogeneous signal localized at the cell membrane at the
801
802 10 junction between cells and an apical expression characterized by bright multiple fluorescent
803
804 11 spots over some cells (Fig. 6D and 6E). No specific signal was observed at the cell membrane
805
806 12 of MDCK II and MDCK-BCRP cells (Fig. 6A and 6C). BCRP was also localized at the cell
807
808 13 membrane in all the cell models (Fig. 7). BCRP exhibited a homogeneous expression
809
810 14 characterized by thin and continuous apicolateral membrane staining, with a greater
811
812 15 immunofluorescence in the MDCK-BCRP model than in the other models.
813
814
815
816
817

818 17 *3.3. Functionality of P-gp and BCRP efflux transporters*

819
820

821 18 Bidirectional transport assays were performed to study the transport of rivaroxaban,
822
823 19 incubated at the apical or basolateral side of the cell monolayer at a constant concentration of
824
825 20 10 μ M, in the presence of increasing concentrations of two specific inhibitors of P-gp and
826
827 21 BCRP (verapamil and ko143, respectively). Permeability values of rivaroxaban across all cell
828
829 22 models are summarized in Table S2. Efflux ratios of rivaroxaban without an inhibitor were
830
831 23 3.13, 5.75, 11.5 and 7.22 across Caco-2_{ATCC}, Caco-2_{ECACC}, MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP
832
833 24 cells respectively (Fig. 8 and 9). Bidirectional permeability values of rivaroxaban were
834
835 25 significantly modified by increasing concentrations of verapamil or ko143 across all models.
836
837
838
839
840

841
842
843 1 Apparent apical-to-basolateral permeabilities started to decrease when apparent basolateral-to-
844
845 2 apical permeabilities began to increase, resulting in decreased efflux ratios (Fig. 8 and 9).
846
847

848 3 Modelling of efflux ratios was performed for determination of IC₅₀ values of verapamil
849
850 4 (Fig. 8) and ko143 (Fig. 9) for P-gp and BCRP-mediated transport of rivaroxaban respectively,
851
852 5 across the four cell models. For verapamil, the lowest IC₅₀ was obtained across the MDCK-
853
854 6 MDR1 model (6.94 μM for MDCK-MDR1 versus 21.2, 24.8 and 137.8 μM for Caco-2_{ATCC},
855
856 7 Caco-2_{ECACC} and MDCK-BCRP, respectively). The IC₅₀ values were similar in the two Caco-2
857
858 8 models despite the higher efflux ratio without inhibitor observed in Caco-2_{ECACC} cells. At the
859
860 9 highest concentrations of verapamil, the inhibition of efflux was complete across all models.
861
862 10 With regard to the ko143 inhibitor, the inhibition of efflux was complete at the highest
863
864 11 concentrations except in the Caco-2_{ECACC} model (Fig. 9). The lowest IC₅₀ was obtained in the
865
866 12 MDCK-BCRP cells (0.026 μM for MDCK-BCRP versus 0.52, 0.18 and 7.44 for Caco-2_{ATCC},
867
868 13 Caco-2_{ECACC} and MDCK-MDR1, respectively). Overall, the IC₅₀ values were considerably
869
870 14 lower for ko143 than verapamil, suggesting that ko143 is a more powerful inhibitor of the ABC
871
872 15 transporters P-gp and BCRP.
873
874
875
876
877

878 17 **4. Discussion**

880
881 18 The ABC transporters P-gp and BCRP are well known to be involved in the
882
883 19 pharmacokinetics of rivaroxaban [1–3]. Their inhibition results in increased absorption and
884
885 20 decreased elimination of rivaroxaban, exposing patients to a potential bioaccumulation and
886
887 21 consequently a higher risk of bleeding [32]. Several *in vitro* systems, including the Caco-2 and
888
889 22 MDCK cell models, have been widely used to assess the role of ABC transporters in the
890
891 23 pharmacokinetics of rivaroxaban [1,2,8]. However, these models display different
892
893 24 characteristics and the interpretation of the results of transport studies may vary depending on
894
895 25 the type of cells used. Our study focused on the impact of ABC transporter expression levels
896
897
898
899
900

901
902
903 1 on the assessment of *in vitro* rivaroxaban DDIs related to P-gp and BCRP in FDA-approved
904 2 cell models, such as Caco-2_{ECACC}, Caco-2_{ATCC}, MDCK II, MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP.
905
906
907 3 The originality of this work consists in the use of complementary techniques, such as proteomic
908 4 mass spectrometry for absolute and relative quantification, western blotting,
909 5 immunofluorescence staining and bidirectional transport experiments, to illustrate the value of
910 6 quantifying ABC transporters to explain the variability of *in vitro* study results. Previous studies
911 7 have evaluated the quantity of transporters in different cell models by mass spectrometry
912 8 [24,33,34], but no other study has investigated the correlation between the variability in
913 9 transporter expression and the variability in their functionality between cell models.

923 10 As rivaroxaban is a substrate for both P-gp and BCRP, we determined the IC₅₀s of
924 11 verapamil and ko143, P-gp and BCRP inhibitors respectively, on four cell models commonly
925 12 used for bidirectional transport studies. The efflux ratios of 10 μM rivaroxaban in MDCK-
926 13 MDR1 and MDCK-BCRP cells were higher than those determined in Caco-2 cells (11.5 μM
927 14 and 7.22 μM versus 3.13 μM and 5.75 μM, respectively). The IC₅₀ of verapamil was 20-fold
928 15 lower in MDCK-MDR1 cells than in MDCK-BCRP cells (6.94 μM vs 137.8 μM, respectively),
929 16 suggesting that verapamil predominantly inhibits P-gp at concentrations under 100 μM. The
930 17 IC₅₀s of verapamil in Caco-2 models were slightly higher than those determined in MDCK-
931 18 MDR1 cells (21.2 μM and 24.8 μM for Caco-2_{ATCC} and Caco-2_{ECACC}, respectively), partly
932 19 because Caco-2 cells express other ABC transporters involved in rivaroxaban disposition, such
933 20 as BCRP, which can take over from P-gp [1]. The IC₅₀ of ko143 was 286-fold lower in MDCK-
934 21 BCRP cells than in MDCK-MDR1 cells (0.026 μM vs 7.44 μM). As regards Caco-2 cells, the
935 22 IC₅₀s were respectively 7-fold and 20-fold higher in Caco-2_{ECACC} and Caco-2_{ATCC} cells than in
936 23 MDCK-BCRP cells. This low IC₅₀ value determined in MDCK-BCRP cells confirms that
937 24 ko143 is a highly potent BCRP inhibitor [35]. Furthermore, its IC₅₀ in MDCK-MDR1 cells
938 25 was comparable to that of verapamil, indicating that although ko143 effectively inhibits BCRP

961
962
963 1 at nanomolar concentrations, it also has an effect on P-gp at higher micromolar concentrations,
964
965 2 as reported in a few studies [36–38]. The adjustment of inhibitor concentrations based on the
966
967 3 cell model appears to be an important parameter when determining whether a drug is a substrate
968
969 4 of ABC transporters. Depending on the cell model used, the results of *in vitro* rivaroxaban DDI
970
971 5 studies related to ABC transporters could give rise to different interpretations and
972
973 6 extrapolations to the *in vivo* context.

974
975
976 7 To detect a potential clinically relevant DDI for orally administered drugs, such as
977
978 8 rivaroxaban, FDA recommends the use of a validated predictor, the $[I_2]/IC_{50}$ ratio (based on
979
980 9 the IC_{50} derived from *in vitro* studies) [29]. Fenner et al. [17] assessed the relevance of this
981
982 10 ratio by considering the case of digoxin. To avoid the bias of interlaboratory variations, 19
983
984 11 compounds that could modify the P-gp-mediated transport of digoxin were evaluated in Caco-
985
986 12 2 cells in the same laboratory. An $[I_2]/IC_{50}$ ratio < 10 seemed to be predictive of negative
987
988 13 clinical DDIs. However, the percentage of false-positives observed ($\sim 40\%$) was of concern and
989
990 14 limited the establishment of a good IVIVC [17]. Since IC_{50} s are derived from *in vitro* data, this
991
992 15 problem is of a particular concern when considering inter- and intralaboratory variability partly
993
994 16 due to differences in cell model characteristics. Regarding rivaroxaban, our study revealed very
995
996 17 different IC_{50} values for specific inhibitors, depending on the cell model used. For verapamil,
997
998 18 the $[I_2]/IC_{50}$ ratio was < 10 when IC_{50} was determined in Caco-2 models (8.7 and 7.4 in Caco-
999
1000 19 2_{ATCC} and Caco-2 $_{ECACC}$ cells respectively), suggesting no need for further *in vivo* studies,
1001
1002 20 whereas the $[I_2]/IC_{50}$ ratio was > 10 (26.5) in MDCK-MDR1 cells, suggesting that it would be
1003
1004 21 worth conducting clinical studies. These results illustrate the heterogeneity of the cell models
1005
1006 22 used in drug transport studies. This heterogeneity was expected since the cell lines were of
1007
1008 23 different origins (intestinal for Caco-2 and renal for MDCK) and displayed different
1009
1010 24 phenotypes, as illustrated by the relative quantification of the phenotypic markers. The barrier
1011
1012 25 properties of these models also differed. Expression of the tight junction protein occludin and
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020

1021
1022
1023 1 the adherens proteins cadherin-1 and cadherin-17 was respectively 10 to 100-fold lower and 5
1024
1025 2 to 10-fold lower in MDCK cells than in Caco-2 cells. The expression pattern of the junction
1026
1027 3 proteins was consistent with the lower TEER values observed for MDCK cells (approximately
1028
1029 4 80 ohm.cm² versus 600 ohm.cm² for Caco-2 cells). In addition to their different barrier
1030
1031 5 properties, these cell models are also characterized by differing expression of ABC transporters
1032
1033 6 which could interfere with determination of IC₅₀s. Ability to precisely quantify the expression
1034
1035 7 levels of transporters in each cell type is therefore essential.

1036
1037
1038 8 To this end, mass spectrometry could be used as a reference technique. A wide range of
1039
1040 9 new mass spectrometry-based analytical platforms and experimental strategies have emerged
1041
1042 10 in recent years and have made this technology increasingly accessible for routine protein
1043
1044 11 quantification. Mass spectrometry can simultaneously and accurately quantify several
1045
1046 12 transporters of interest in various biological samples, such as cells, membrane vesicles and
1047
1048 13 animal or human tissues [39–41]. First, we developed and validated a LC-MS/MS method for
1049
1050 14 absolute quantification of P-gp and BCRP, in accordance with FDA guidelines [28]. As
1051
1052 15 expected, P-gp and BCRP were more highly expressed in their respective transfected-MDCK
1053
1054 16 models than in the Caco-2 models. P-gp expression was up to 7.5-fold higher in MDCK-MDR1
1055
1056 17 cells and BCRP expression was ~2.3-fold higher in MDCK-BCRP cells, related to higher efflux
1057
1058 18 ratios of rivaroxaban in these models. Interestingly, a 1.7-fold higher expression of P-gp was
1059
1060 19 observed in Caco-2_{ECACC} compared to Caco-2_{ATCC} cells, perfectly correlated with a 1.8-fold
1061
1062 20 higher efflux ratio of rivaroxaban in Caco-2_{ECACC} cells than in Caco-2_{ATCC} cells. The P-gp level
1063
1064 21 determined in Caco-2_{ECACC} cells was 10-fold lower than that reported by Uchida et al.[24]. This
1065
1066 22 may be related to our use of two peptides to quantify the protein whereas Uchida et al. quantified
1067
1068 23 only one peptide, as reported in most studies [24,26,33]. As observed for BCRP in our study,
1069
1070 24 the concentrations of the different peptides of a protein are not equal. In particular, we detected
1071
1072 25 a 1.8-fold higher level of the SLLDVLAAR peptide compared to that of the VIQELGLDK
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080

1081
1082
1083 1 peptide. Conversely, we found a greater amount of P-gp than that reported by Zhang et al.[33]
1084
1085 2 in MDCK-MDR1 cells, with quantification of the same peptide as in the study by Uchida et al.
1086
1087 3 Differing selection of the quantification peptides is not sufficient to explain these differences
1088
1089 4 in quantification. Other parameters, such as cell culture conditions, different sample
1090
1091 5 preparations and mass spectrometry techniques may affect the quantification of transporters in
1092
1093 6 these cell models [42–44]. FDA provides guidance only on acceptance criteria for the
1094
1095 7 quantification of either small molecules by LC–MS/MS or proteins by ligand-binding assays
1096
1097 8 [28]. Currently, no official guidance is available for the quantification of proteins by LC–
1098
1099 9 MS/MS, but some good practice recommendations according to the type of analysis to be
1100
1101 10 performed have been proposed by Carr et al. [45]. However, these recommendations do not
1102
1103 11 specify the minimum conditions required to obtain a reliable protein quantification.
1104
1105
1106

1107 12 To confirm our results obtained by absolute quantification, we performed a relative
1108
1109 13 quantification of various ABC transporters by mass spectrometry. The results for P-gp and
1110
1111 14 BCRP were consistent with those of absolute quantification. The expression of MRP1 was
1112
1113 15 similar in all cell models, except for MDCK II which showed a 5 to 10-fold lower expression.
1114
1115 16 Caco-2 cells exhibited a 10-fold higher expression of MRP2 than MDCK cells. The expression
1116
1117 17 of MRP3 and MRP4 was 10-fold lower in Caco-2 cells than in MDCK cells. Our results
1118
1119 18 concerning the relative quantification of ABC transporters are consistent with those of Maubon
1120
1121 19 et al.[15]. These authors reported a 5-fold higher quantity of P-gp mRNA in Caco-2_{ECACC} cells
1122
1123 20 than in Caco-2_{ATCC} cells. They also reported a 4.5-fold higher amount of MRP2 mRNA in Caco-
1124
1125 21 2_{ECACC} cells and a similar expression of BCRP and MRP4 mRNA in both Caco-2 models. A
1126
1127 22 confirmation technique, specifically western blotting, highlighted the presence of P-gp and
1128
1129 23 BCRP in the two Caco-2 models and in MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cells, respectively.
1130
1131 24 Moreover, immunofluorescence staining revealed the expression and localization of a tight
1132
1133 25 junction protein ZO-1, and two ABC transporters, P-gp and BCRP. Concerning ABC
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140

1 transporters, BCRP was detected at the apicolateral side in all cell models as previously reported
2 [46], with a more intense signal in the Caco-2 and MDCK-BCRP models. P-gp was highly
3 expressed in MDCK-MDR1 and Caco-2 cells with an apical localization as previously reported
4 [47,48]. Taken together, all these results matched and clearly demonstrated a significant
5 variability in transporter expression between the different cell models.

6 7 **5. Conclusion** 8 9

10 This original work highlighted the relationship between the abundance of ABC
11 transporters in the cell models employed and the extent of rivaroxaban efflux transport. We
12 showed that the choice of cell model for conducting transport studies had an influence on the
13 IC50s values for well-known P-gp and BCRP inhibitors, and that this variability in IC50s was
14 partly due to a difference in the expression pattern of ABC transporters within these models.
15 Proteomic analysis by mass spectrometry provided accurate quantification of P-gp and BCRP
16 transporters, in accordance with FDA guidelines, and revealed that a higher level of ABC
17 transporter expression in the cell models was correlated with correspondingly greater
18 rivaroxaban efflux transport. These data on membrane transporter expression in *in vitro* cell
19 models should facilitate the interpretation of pharmacokinetic results and their extrapolation
20 from preclinical to clinical studies, and proteomic mass spectrometry therefore appears to be a
21 promising tool.
22

1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260

1 **Acknowledgments**

2 MDCK II, MDCK-MDR1 and MDCK-BCRP cells were a generous gift from Dr Piet
3 Borst (Netherland’s Cancer Institute, Netherlands).

4

5 **Funding**

6 This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public,
7 commercial, or not-for-profit sectors.

8

9 **Declaration of competing interest**

10 The authors declare no conflict of interest.

1261
1262
1263 1 **References**
1264
1265 2
1266
1267 3 [1] S. Hodin, T. Basset, E. Jacqueroux, O. Delezay, A. Clotagatide, N. Perek, P. Mismetti,
1268 4 X. Delavenne, In vitro comparison of the role of P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance
1269 5 Protein on direct oral anticoagulants disposition, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 43 (2018)
1270 6 183–191. doi:10.1007/s13318-017-0434-x.
1271
1272 7 [2] M.J. Gnoth, U. Buetehorn, U. Muenster, T. Schwarz, S. Sandmann, In vitro and in vivo
1273 8 P-glycoprotein transport characteristics of rivaroxaban, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338 (2011)
1274 9 372–380. doi:10.1124/jpet.111.180240.
1275
1276 10 [3] I.Y. Gong, S.E. Mansell, R.B. Kim, Absence of both MDR1 (ABCB1) and Breast
1277 11 Cancer Resistance Protein (ABCG2) transporters significantly alters rivaroxaban disposition
1278 12 and central nervous system entry, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 112 (2013) 164–170.
1279 13 doi:10.1111/bcpt.12005.
1280
1281 14 [4] W. Mueck, D. Kubitzka, M. Becka, Co-administration of rivaroxaban with drugs that
1282 15 share its elimination pathways: pharmacokinetic effects in healthy subjects: Drug interactions
1283 16 with rivaroxaban, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 76 (2013) 455–466. doi:10.1111/bcp.12075.
1284
1285 17 [5] A. Brings, M.-L. Lehmann, K.I. Foerster, J. Burhenne, J. Weiss, W.E. Haefeli, D.
1286 18 Czock, Perpetrator effects of ciclosporin (P-glycoprotein inhibitor) and its combination with
1287 19 fluconazole (CYP3A inhibitor) on the pharmacokinetics of rivaroxaban in healthy volunteers,
1288 20 *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2019). doi:10.1111/bcp.13934.
1289
1290 21 [6] I. Gouin-Thibault, X. Delavenne, A. Blanchard, V. Siguret, J.E. Salem, C. Narjoz, P.
1291 22 Gaussem, P. Beaune, C. Funck-Brentano, M. Azizi, P. Mismetti, M.A. Lorient, Interindividual
1292 23 variability in dabigatran and rivaroxaban exposure: contribution of ABCB1 genetic
1293 24 polymorphisms and interaction with clarithromycin, *J. Thromb. Haemost.* 15 (2017) 273–283.
1294 25 doi:10.1111/jth.13577.
1295
1296 26 [7] K.M. Giacomini, D.J. Tweedie, L.Z. Benet, K.L.R. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R.
1297 27 Evers, V. Fischer, K.M. Hillgren, K.A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R.B. Kim, C.A.
1298 28 Lee, M. Niemi, J.W. Polli, Y. Sugiyama, P.W. Swaan, J.A. Ware, S.H. Wright, S. Wah Yee,
1299 29 M.J. Zamek-Gliszczyński, L. Zhang, Membrane transporters in drug development, *Nat. Rev.*
1300 30 *Drug Discov.* 9 (2010) 215–236. doi:10.1038/nrd3028.
1301
1302 31 [8] V. Margelidon-Cozzolino, S. Hodin, E. Jacqueroux, O. Delézay, L. Bertoletti, X.
1303 32 Delavenne, In vitro assessment of pharmacokinetic drug-drug interactions of direct oral
1304 33 anticoagulants: Type 5-phosphodiesterase inhibitors are inhibitors of rivaroxaban and apixaban
1305 34 efflux by P-glycoprotein, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 365 (2018) 519–525.
1306 35 doi:10.1124/jpet.117.245993.
1307
1308 36 [9] A. Aszalos, Drug–drug interactions affected by the transporter protein, P-glycoprotein
1309 37 (ABCB1, MDR1), *Drug Discov. Today.* 12 (2007) 838–843. doi:10.1016/j.drudis.2007.07.021.
1310
1311 38 [10] Food and Drug Administration, In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-
1312 39 Drug Interaction Studies, Guidance for Industry, (2017).
1313
1314 40 [11] P. Artursson, K. Palm, K. Luthman, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical
1315
1316
1317
1318
1319
1320

1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380

1 predictions of drug transport, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 22 (1996) 67–84. doi:10.1016/S0169-
2 409X(96)00415-2.

3 [12] J.D. Irvine, L. Takahashi, K. Lockhart, J. Cheong, J.W. Tolan, H.E. Selick, J.R. Grove,
4 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: A tool for membrane permeability screening, *J.*
5 *Pharm. Sci.* 88 (1999) 28–33. doi:10.1021/js9803205.

6 [13] F. Tang, K. Horie, R.T. Borchardt, Are MDCK cells transfected with the human MDR1
7 gene a good model of the human intestinal mucosa?, *Pharm. Res.* 19 (2002) 765–772.
8 doi:10.1023/A:1016140429238.

9 [14] F. Tang, K. Horie, R.T. Borchardt, Are MDCK cells transfected with the human MRP2
10 gene a good model of the human intestinal mucosa?, *Pharm. Res.* 19 (2002) 773–779.
11 doi:10.1023/A:1016192413308.

12 [15] N. Maubon, M. Le Vee, L. Fossati, M. Audry, E. Le Ferrec, S. Bolze, O. Fardel,
13 Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR,
14 *Fundam. Clin. Pharmacol.* 21 (2007) 659–663. doi:10.1111/j.1472-8206.2007.00550.x.

15 [16] E.M. del Amo, A.T. Heikkinen, J. Mönkkönen, In vitro–in vivo correlation in p-
16 glycoprotein mediated transport in intestinal absorption, *Eur. J. Pharm. Sci.* 36 (2009) 200–211.
17 doi:10.1016/j.ejps.2008.11.005.

18 [17] K. Fenner, M. Troutman, S. Kempshall, J. Cook, J. Ware, D. Smith, C. Lee, Drug–drug
19 interactions mediated through P-glycoprotein: Clinical relevance and in vitro–in vivo
20 correlation using digoxin as a probe drug, *Clin. Pharmacol. Ther.* 85 (2009) 173–181.
21 doi:10.1038/clpt.2008.195.

22 [18] C. Wagner, P. Zhao, Y. Pan, V. Hsu, J. Grillo, S. Huang, V. Sinha, Application of
23 physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling to support dose selection: Report of
24 an FDA public workshop on PBPK: Physiologically based pharmacokinetic modeling to
25 support dose selection, *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* 4 (2015) 226–230.
26 doi:10.1002/psp4.33.

27 [19] M.E. Taub, L. Podila, D. Ely, I. Almeida, Functional assessment of multiple P-
28 glycoprotein (p-Gp) probe substrates: Influence of cell line and modulator concentration on P-
29 Gp activity, *Drug Metab. Dispos.* 33 (2005) 1679–1687. doi:10.1124/dmd.105.005421.

30 [20] J.P. Keogh, J.R. Kunta, Development, validation and utility of an in vitro technique for
31 assessment of potential clinical drug–drug interactions involving P-glycoprotein, *Eur. J. Pharm.*
32 *Sci.* 27 (2006) 543–554. doi:10.1016/j.ejps.2005.11.011.

33 [21] M.D. Perloff, E. Störmer, L.L. von Moltke, D.J. Greenblatt, Rapid assessment of P-
34 glycoprotein inhibition and induction in vitro, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1177–1183.
35 doi:10.1023/A:1025092829696.

36 [22] P. Anderle, E. Niederer, W. Rubas, C. Hilgendorf, H. Spahn-Langguth, H. Wunderli-
37 Allenspach, H.P. Merkle, P. Langguth, P-glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell
38 monolayers: The influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels,
39 *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 757–762. doi:10.1021/js970372e.

40 [23] S.M.D.K. Ganga Senarathna, A. Crowe, The influence of passage number for Caco2

1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440

- 1 cell models when evaluating P-gp mediated drug transport, *Pharmazie*. (2015) 798–803.
2 doi:10.1691/ph.2015.5106.
- 3 [24] Y. Uchida, S. Ohtsuki, J. Kamiie, K. Ohmine, R. Iwase, T. Terasaki, Quantitative
4 targeted absolute proteomics for 28 human transporters in plasma membrane of Caco-2 cell
5 monolayer cultured for 2, 3, and 4 weeks, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 30 (2015) 205–208.
6 doi:10.1016/j.dmpk.2014.11.002.
- 7 [25] D. Gomez-Zepeda, M. Taghi, M. Smirnova, P. Sergent, W.-Q. Liu, C. Chhuon, M.
8 Vidal, M. Picard, E. Thioulouse, I. Broutin, I.-C. Guerrero, J.-M. Scherrmann, Y. Parmentier,
9 X. Decleves, M.-C. Menet, LC–MS/MS-based quantification of efflux transporter proteins at
10 the BBB, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 164 (2019) 496–508. doi:10.1016/j.jpba.2018.11.013.
- 11 [26] C. Gröer, S. Brück, Y. Lai, A. Paulick, A. Busemann, C.D. Heidecke, W. Siegmund, S.
12 Oswald, LC–MS/MS-based quantification of clinically relevant intestinal uptake and efflux
13 transporter proteins, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 85 (2013) 253–261.
14 doi:10.1016/j.jpba.2013.07.031.
- 15 [27] C. Mercier, E. Jacqueroix, Z. He, S. Hodin, S. Constant, N. Perek, D. Boudard, X.
16 Delavenne, Pharmacological characterization of the 3D MucilAir™ nasal model, *Eur. J. Pharm.*
17 *Biopharm.* 139 (2019) 186–196. doi:10.1016/j.ejpb.2019.04.002.
- 18 [28] Food and Drug Administration, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry,
19 (2018).
- 20 [29] Food and Drug Administration, Drug Interaction Studies -- Study Design, Data
21 Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, (2012).
- 22 [30] J.A. Nicholson, T.J. Peters, The subcellular localization of peptidase activity in the
23 human jejunum, *Eur. J. Clin. Invest.* 9 (1979) 349–354. doi:10.1111/j.1365-
24 2362.1979.tb00895.x.
- 25 [31] J.C. Hennings, N. Picard, A.K. Huebner, T. Stauber, H. Maier, D. Brown, T.J. Jentsch,
26 R. Vargas-Poussou, D. Eladari, C.A. Hübner, A mouse model for distal renal tubular acidosis
27 reveals a previously unrecognized role of the V-ATPase a4 subunit in the proximal tubule,
28 *EMBO Mol. Med.* 4 (2012) 1057–1071. doi:10.1002/emmm.201201527.
- 29 [32] S.-H. Chang, I.-J. Chou, Y.-H. Yeh, M.-J. Chiou, M.-S. Wen, C.-T. Kuo, L.-C. See, C.-
30 F. Kuo, Association between use of non-vitamin K oral anticoagulants with and without
31 concurrent medications and risk of major bleeding in nonvalvular atrial fibrillation, *JAMA.* 318
32 (2017) 1250–1259. doi:10.1001/jama.2017.13883.
- 33 [33] Y. Zhang, N. Li, P.W. Brown, J.S. Ozer, Y. Lai, Liquid chromatography/tandem mass
34 spectrometry based targeted proteomics quantification of P-glycoprotein in various biological
35 samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 1715–1724. doi:10.1002/rcm.5026.
- 36 [34] M. Ölander, J.R. Wiśniewski, P. Matsson, P. Lundquist, P. Artursson, The proteome of
37 filter-grown Caco-2 cells with a focus on proteins involved in drug disposition, *J. Pharm. Sci.*
38 105 (2016) 817–827. doi:10.1016/j.xphs.2015.10.030.
- 39 [35] J.D. Allen, A. van Loevezijn, J.M. Lakhai, O. van Tellingen, G. Reid, J.H.M. Schellens,
40 G.-J. Koomen, A.H. Schinkel, Potent and specific inhibition of the Breast Cancer Resistance

- 1441
1442
1443 1 Protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of
1444 2 fumitremorgin C, *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 417–425.
- 1446 3 [36] P. Matsson, J.M. Pedersen, U. Norinder, C.A.S. Bergström, P. Artursson, Identification
1447 4 of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-Binding Cassette
1448 5 transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs, *Pharm. Res.* 26 (2009) 1816–
1450 6 1831. doi:10.1007/s11095-009-9896-0.
- 1451 7 [37] O. Szolomajer-Csikos, E. Beery, L. Kosa, Z. Rajnai, M. Jani, A. Hetenyi, K. Tauber
1452 8 Jakab, P. Krajcsi, G. K Toth, Synthesis and ABCG2 inhibitory activity of novel fumitremorgin
1454 9 C analogs – Specificity and structure activity correlations, *Med. Chem.* 9 (2013) 494–509.
1455 10 doi:10.2174/1573406411309040003.
- 1456 11 [38] L.D. Weidner, S.S. Zoghbi, S. Lu, S. Shukla, S.V. Ambudkar, V.W. Pike, J. Mulder,
1457 12 M.M. Gottesman, R.B. Innis, M.D. Hall, The inhibitor Ko143 is not specific for ABCG2, *J.*
1459 13 *Pharmacol. Exp. Ther.* 354 (2015) 384–393. doi:10.1124/jpet.115.225482.
- 1460 14 [39] S. Ohtsuki, C. Ikeda, Y. Uchida, Y. Sakamoto, F. Miller, F. Glacial, X. Decleves, J.-M.
1462 15 Scherrmann, P.-O. Couraud, Y. Kubo, M. Tachikawa, T. Terasaki, Quantitative targeted
1463 16 absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of
1464 17 human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood–brain barrier
1465 18 model, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 289–296. doi:10.1021/mp3004308.
- 1467 19 [40] A. Basit, Z. Radi, V.S. Vaidya, M. Karasu, B. Prasad, Kidney cortical transporter
1468 20 expression across species using quantitative proteomics, *Drug Metab. Dispos.* (2019)
1469 21 dmd.119.086579. doi:10.1124/dmd.119.086579.
- 1471 22 [41] S. Ohtsuki, O. Schaefer, H. Kawakami, T. Inoue, S. Liehner, A. Saito, N. Ishiguro, W.
1472 23 Kishimoto, E. Ludwig-Schwellinger, T. Ebner, T. Terasaki, Simultaneous absolute protein
1473 24 quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel
1474 25 approach for the characterization of individual human liver: Comparison with mRNA levels
1475 26 and activities, *Drug Metab. Dispos.* 40 (2012) 83–92. doi:10.1124/dmd.111.042259.
- 1477 27 [42] D.A. Volpe, Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays,
1478 28 *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 712–725. doi:10.1002/jps.21010.
- 1480 29 [43] Y. Sambuy, I. De Angelis, G. Ranaldi, M.L. Scarino, A. Stamatii, F. Zucco, The Caco-
1481 30 2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on
1482 31 Caco-2 cell functional characteristics, *Cell Biol. Toxicol.* 21 (2005) 1–26. doi:10.1007/s10565-
1484 32 005-0085-6.
- 1485 33 [44] C. Wegler, F.Z. Gaugaz, T.B. Andersson, J.R. Wiśniewski, D. Busch, C. Gröer, S.
1487 34 Oswald, A. Norén, F. Weiss, H.S. Hammer, T.O. Joos, O. Poetz, B. Achour, A. Rostami-
1488 35 Hodjegan, E. van de Steeg, H.M. Wortelboer, P. Artursson, Variability in mass spectrometry-
1489 36 based quantification of clinically relevant drug transporters and drug metabolizing enzymes,
1490 37 *Mol. Pharm.* 14 (2017) 3142–3151. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00364.
- 1492 38 [45] S.A. Carr, S.E. Abbatiello, B.L. Ackermann, C. Borchers, B. Domon, E.W. Deutsch,
1493 39 R.P. Grant, A.N. Hoofnagle, R. Hüttenhain, J.M. Koomen, D.C. Liebler, T. Liu, B. MacLean,
1494 40 D.R. Mani, E. Mansfield, H. Neubert, A.G. Paulovich, L. Reiter, O. Vitek, R. Aebbersold, L.
1495 41 Anderson, R. Bethem, J. Blonder, E. Boja, J. Botelho, M. Boyne, R.A. Bradshaw, A.L.

1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560

1 Burlingame, D. Chan, H. Keshishian, E. Kuhn, C. Kinsinger, J.S.H. Lee, S.-W. Lee, R. Moritz,
2 J. Oses-Prieto, N. Rifai, J. Ritchie, H. Rodriguez, P.R. Srinivas, R.R. Townsend, J.V. Eyk, G.
3 Whiteley, A. Wiita, S. Weintraub, Targeted peptide measurements in biology and medicine:
4 Best practices for mass spectrometry-based assay development using a Fit-for-Purpose
5 approach, *Mol. Cell. Proteomics*. 13 (2014) 907–917. doi:10.1074/mcp.M113.036095.

6 [46] C.Q. Xia, N. Liu, D. Yang, G. Miwa, L.L. Gan, Expression, localization and functional
7 characteristics of Breast Cancer Resistance Protein in Caco-2 cells, *Drug Metab. Dispos.*
8 (2005). doi:10.1124/dmd.104.003442.

9 [47] S.P. Hämmerle, B. Rothen-Rutishauser, S.D. Krämer, M. Günthert, H. Wunderli-
10 Allenspach, P-Glycoprotein in cell cultures: a combined approach to study expression,
11 localisation, and functionality in the confocal microscope, *Eur. J. Pharm. Sci.* 12 (2000) 69–77.
12 doi:10.1016/S0928-0987(00)00142-1.

13 [48] A. Belliard, B. Lacour, R. Farinotti, C. Leroy, Effect of tumor necrosis factor- α and
14 interferon- γ on intestinal P-glycoprotein expression, activity, and localization in Caco-2 cells,
15 *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 1524–1536. doi:10.1002/jps.20072.

1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620

1 **Table 1.** Calibration standards and QC levels for quantification of P-gp and BCRP.

	Peptide Concentrations (pM)			
	FYDPLAGK	FDTLVGER	VIQELGLDK	SSLLDVLAAR
Calibration standards				
Cal 1 (LLOQ)	74.25	148.5	74.25	247.5
Cal 2	148.5	247.5	148.5	371.3
Cal 3	247.5	495.0	247.5	495.0
Cal 4	495.0	742.6	495.0	742.6
Cal 5	990.0	990.0	990.0	990.0
Cal 6	2475.0	2475.0	2475.0	2475.0
QC samples				
QC 1 (LLOQ)	74.25	148.5	74.25	247.5
QC 2	222.8	445.5	222.8	445.5
QC 3	742.6	643.6	742.6	792.0
QC 4	1485.0	1485.0	1485.0	1485.0

2

1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680

1 **Table 2.** Absolute expression levels of P-gp and BCRP in plasma membrane fractions of Caco-
2 and MDCK cells. Absolute amounts (fmol) were calculated from the calibration curves for
each peptide. Protein expression levels (fmol/μg protein) were calculated by dividing the
absolute amounts of the targeted peptides by the total quantity of protein (in μg) in the
membrane protein fractions analyzed. Each value represents the mean ± standard deviation
(n=3).

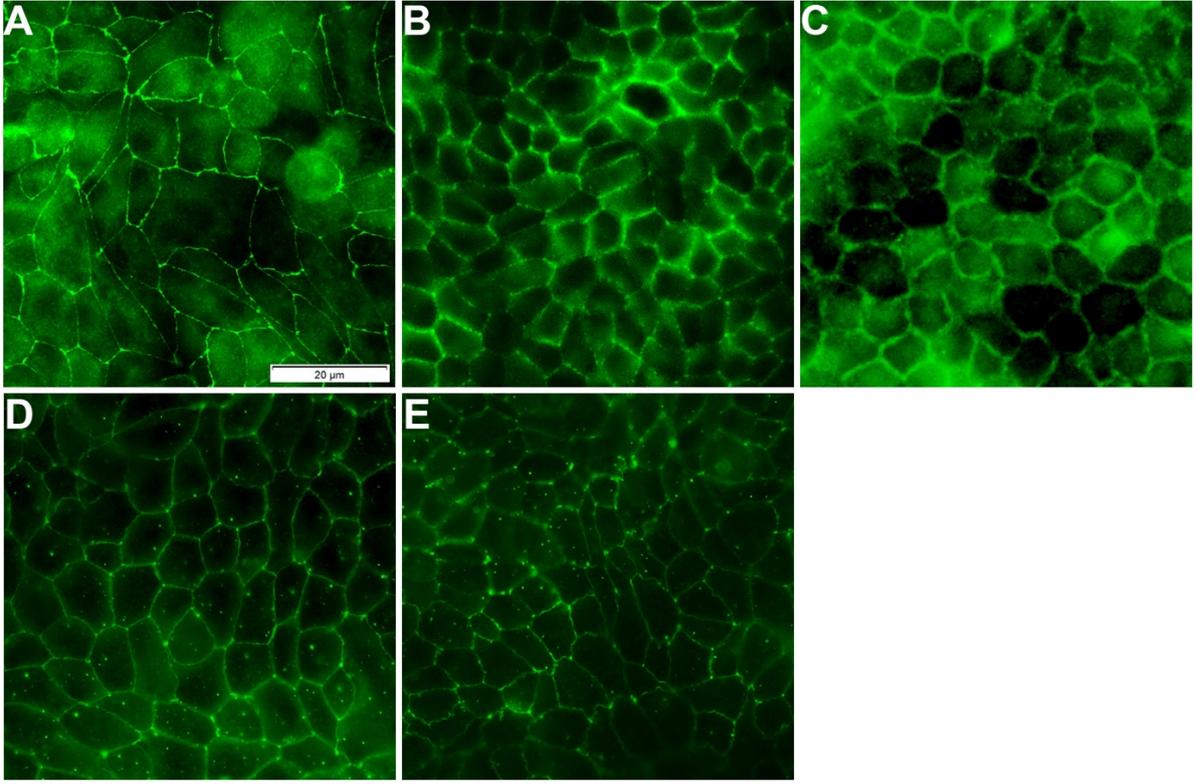
Protein	Peptide	Protein expression level (fmol/μg protein)				
		Caco-2 ATCC	Caco-2 ECACC	MDCK II	MDCK-BCRP	MDCK-MDR1
P-gp	FDTLVGER	0,340 ± 0,013	0,639 ± 0,019	0,321 ± 0,003	0,241 ± 0,019	2,847 ± 0,081
	FYDPLAGK	0,359 ± 0,002	0,552 ± 0,009	< LLOQ	< LLOQ	2,394 ± 0,023
BCRP	SSLLDVLAAR	1,046 ± 0,020	1,082 ± 0,011	< LLOQ	2,302 ± 0,030	< LLOQ
	VIQELGLDK	0,553 ± 0,036	0,604 ± 0,054	< LLOQ	1,317 ± 0,013	< LLOQ

8

1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740

1 **Figure 1.** Expression of ZO-1 by epifluorescence microscopy in MDCK II (A), MDCK-MDR1
2 (B), MDCK-BCRP (C), Caco-2_{ATCC} (D) and Caco-2_{ECACC} (E) cells. Scale bar=20µm.

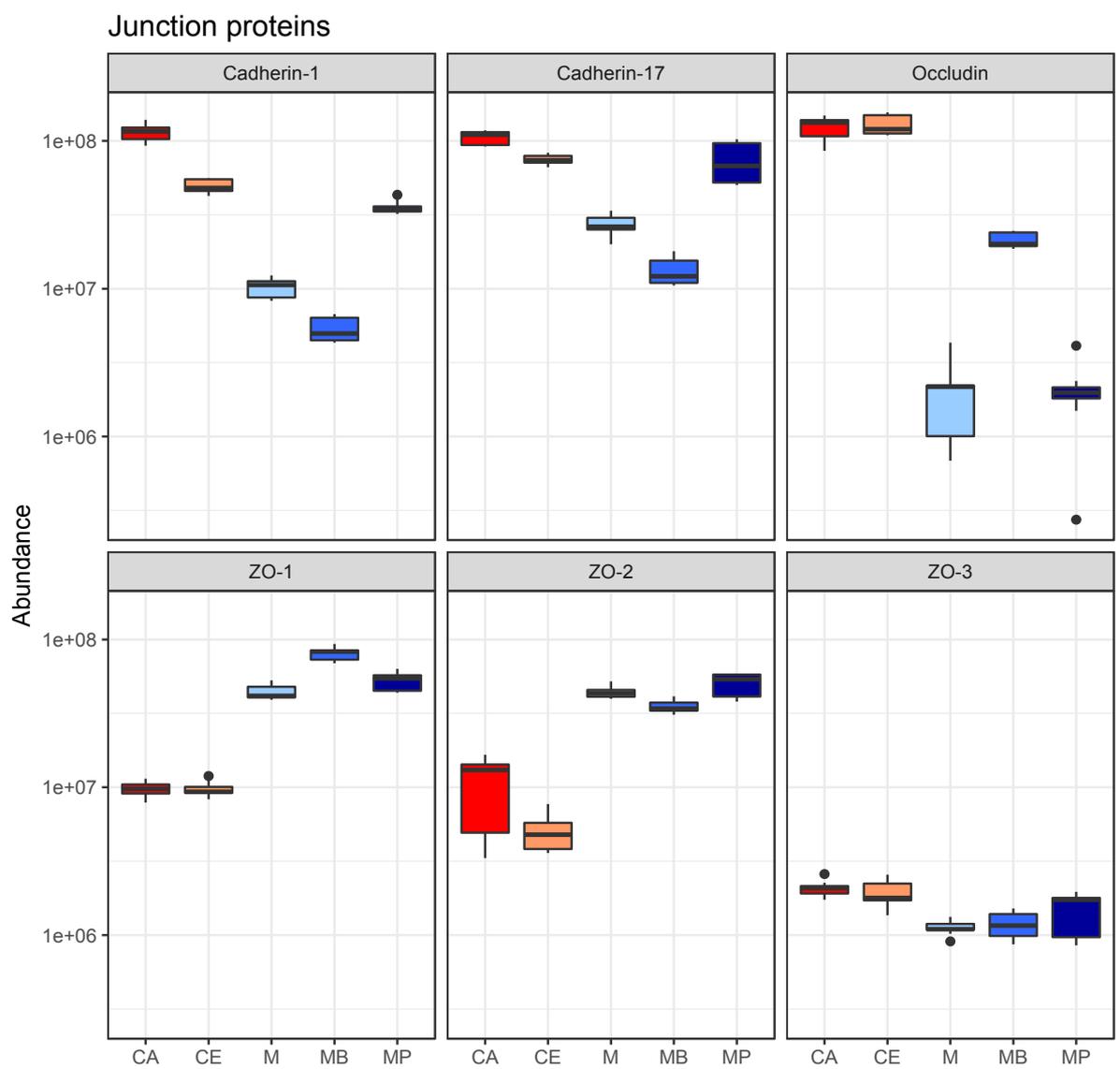
3



4

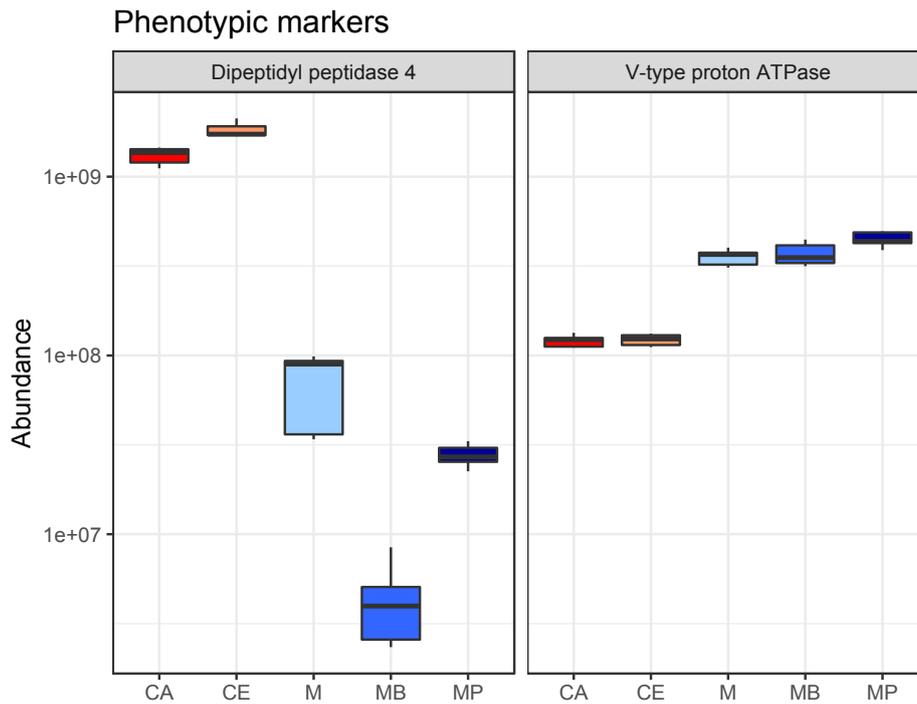
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800

1 **Figure 2.** Label-free relative quantification of junction proteins in the Caco-2_{ECACC} (CE), Caco-
2 _{ATCC} (CA), MDCK II (M), MDCK-BCRP (MB) and MDCK-MDR1 (MP) models. Whiskers
3 indicate the first and third quartiles of the data, the horizontal bar within each box indicating
4 the median value. Three biological replicates were examined for each model, each biological
5 replicate being analyzed three times.



6

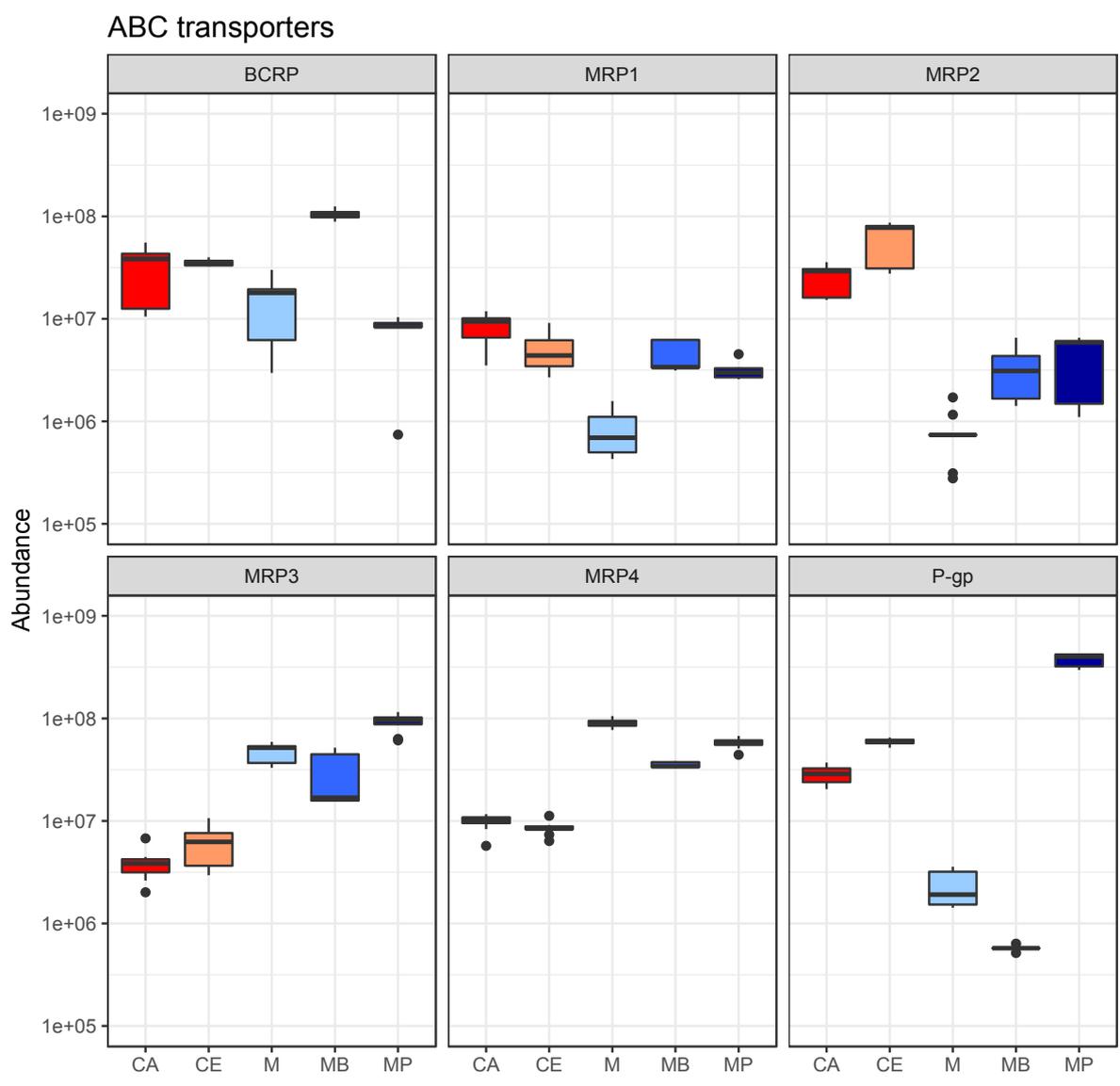
1801
1802
1803 **Figure 3.** Label-free relative quantification of phenotypic markers in the Caco-2_{ECACC} (CE),
1804
1805
1806 2 Caco-2_{ATCC} (CA), MDCK II (M), MDCK-BCRP (MB) and MDCK-MDR1 (MP) models.
1807
1808 3 Whiskers indicate the first and third quartiles of the data, the horizontal bar within each box
1809
1810 4 indicating the median value. Three biological replicates were examined for each model, each
1811
1812 5 biological replicate being analyzed three times.



1836 6

1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920

1 **Figure 4.** Label-free relative quantification of ABC transporters in the Caco-2_{ECACC} (CE),
2 Caco-2_{ATCC} (CA), MDCK II (M), MDCK-BCRP (MB) and MDCK-MDR1 (MP) models.
3 Whiskers indicate the first and third quartiles of the data, the horizontal bar within each box
4 indicating the median value. Three biological replicates were examined for each model, each
5 biological replicate being analyzed three times.

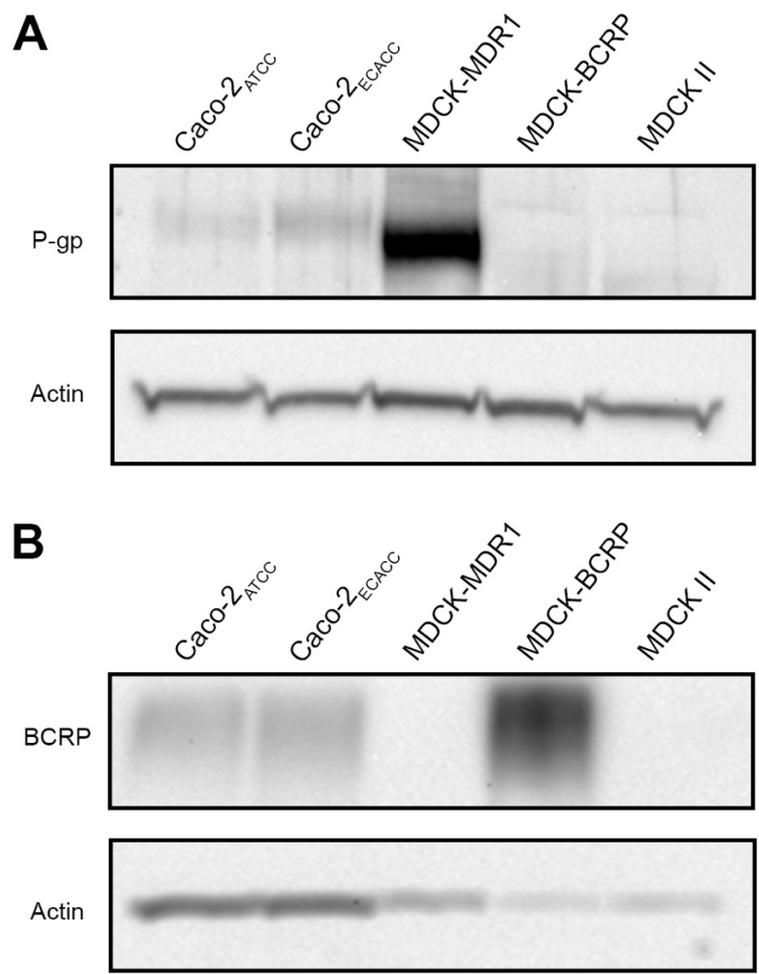


6

1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980

1 **Figure 5.** Expression of P-gp (A) and BCRP (B) by western blotting in the Caco-2_{ATCC}, Caco-
2 ₂_{ECACC}, MDCK-MDR1, MDCK-BCRP and MDCK II models.

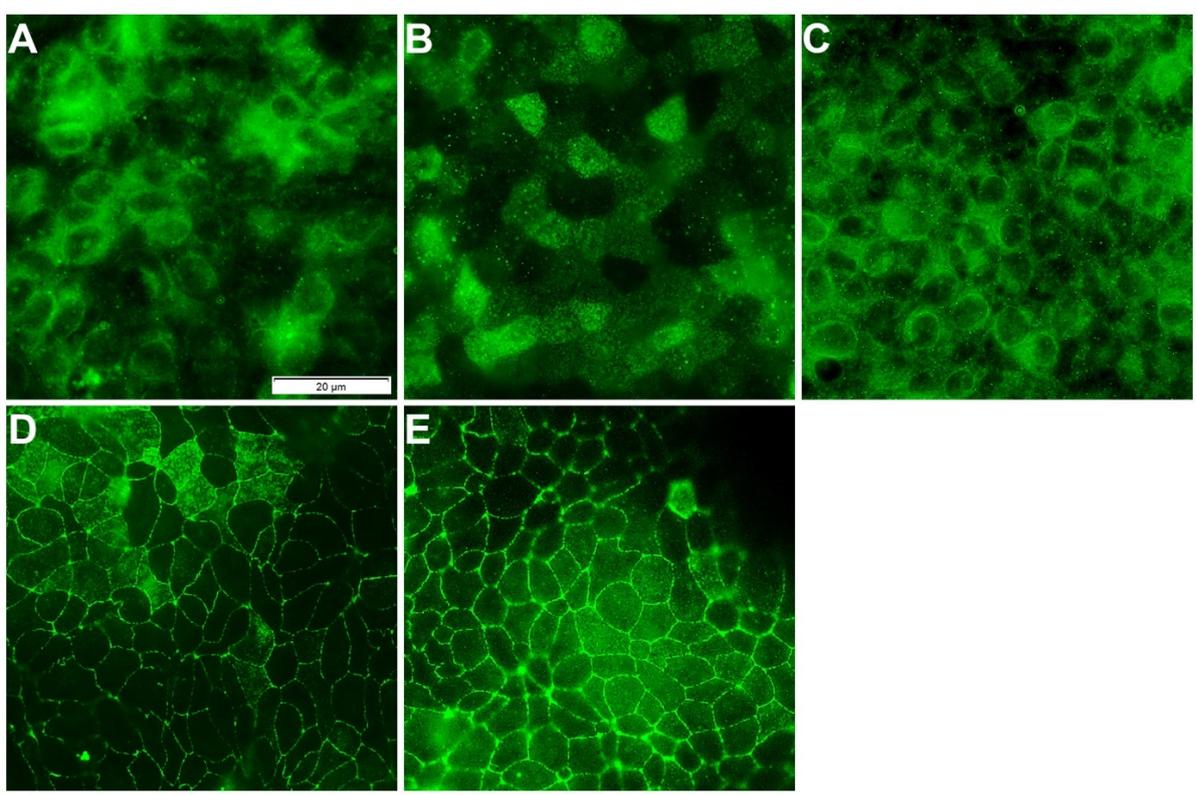
3



4

1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040

Figure 6. Expression of P-gp by epifluorescence microscopy in MDCK II (A), MDCK-MDR1 (B), MDCK-BCRP (C), Caco-2_{ATCC} (D) and Caco-2_{ECACC} (E) cells. Scale bar=20µm.



2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100

Figure 7. Expression of BCRP by epifluorescence microscopy in MDCK II (A), MDCK-MDR1 (B), MDCK-BCRP (C), Caco-2_{ATCC} (D) and Caco-2_{ECACC} (E) cells. Scale bar=20µm.

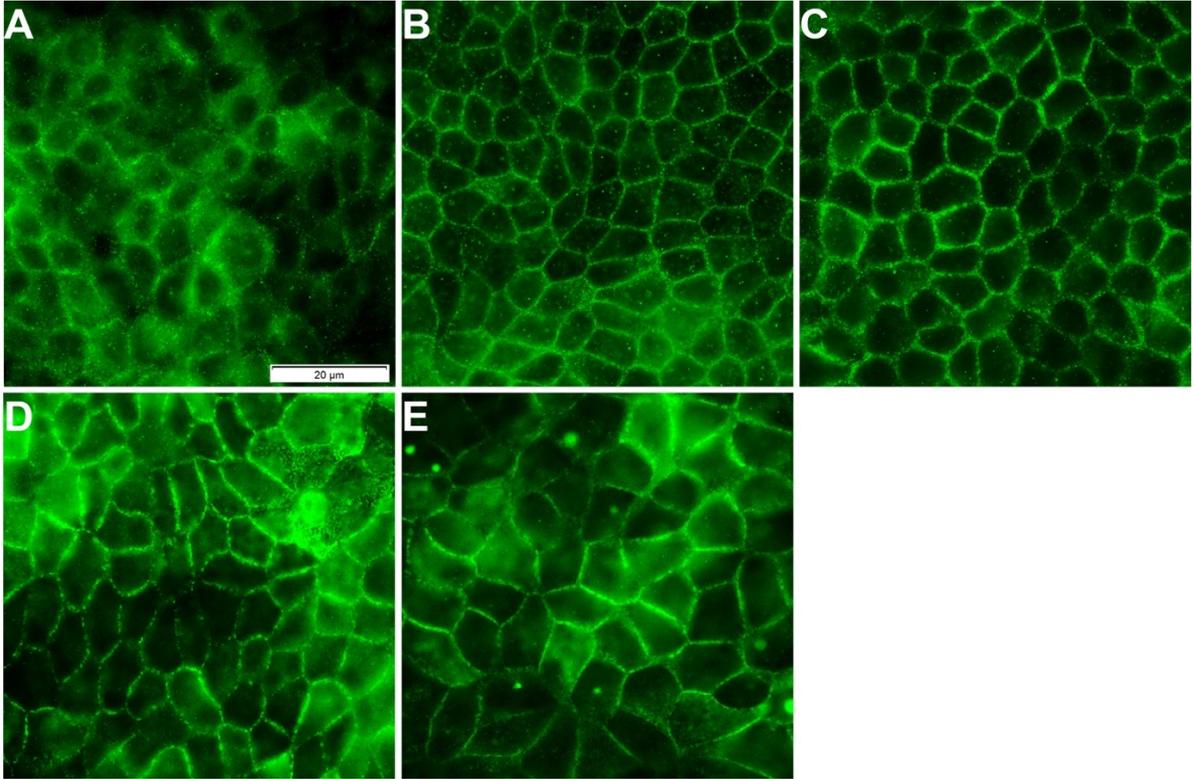


Figure 8. Efflux ratios of rivaroxaban (10 μM) across Caco-2_{ATCC} (A), Caco-2_{ECACC} (B), MDCK-MDR1 (C) and MDCK-BCRP (D) cells, without and with verapamil at increasing concentrations (0.1, 1, 10, 100, 500, 1000 μM) after 2 h incubation. Experimental data (n=3) are represented by circles indicating mean values with their standard deviations. Lines represent the corresponding sigmoid models obtained with an unweighted nonlinear least squares regression algorithm. IC50s are shown for each cell model.

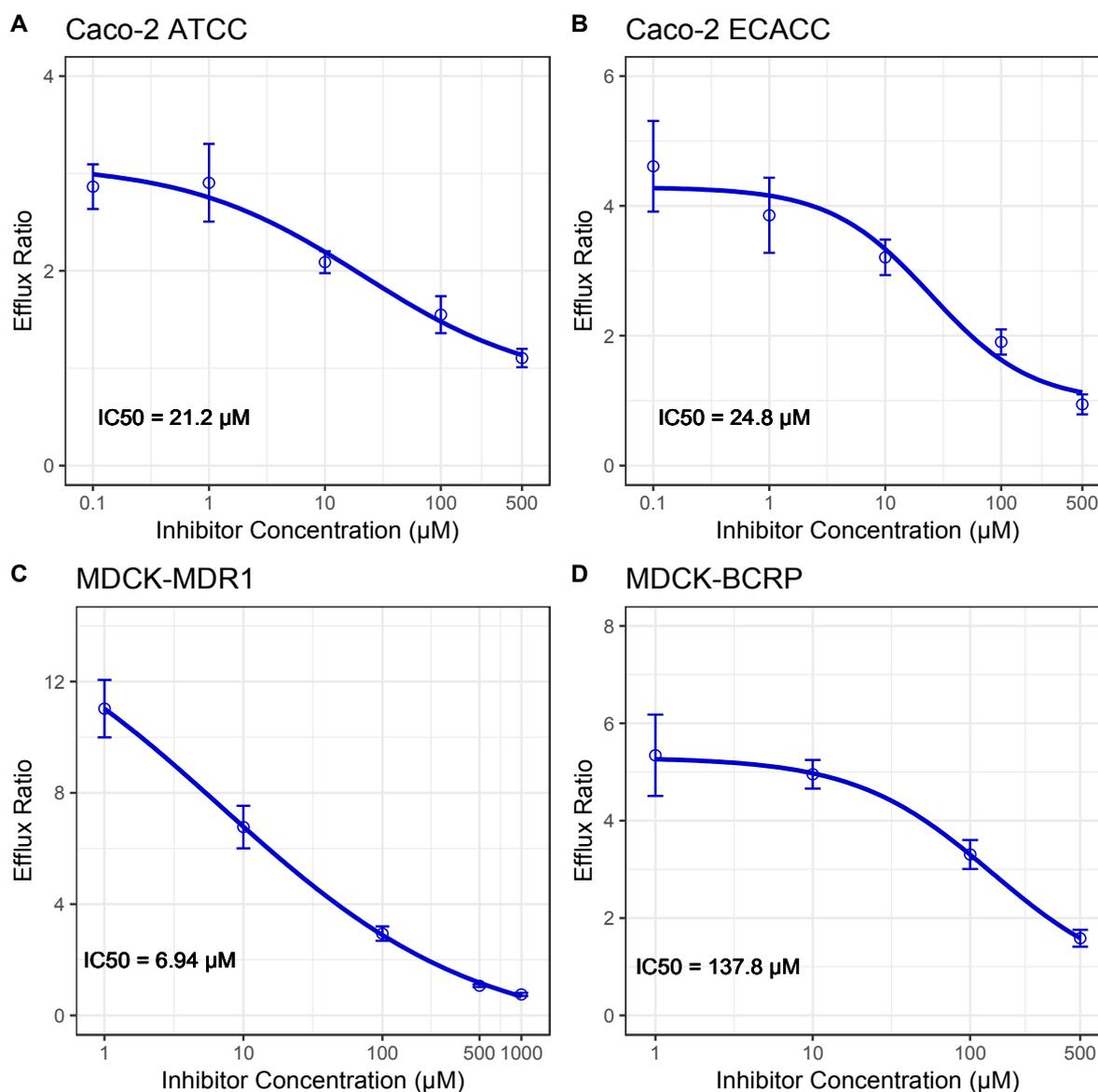
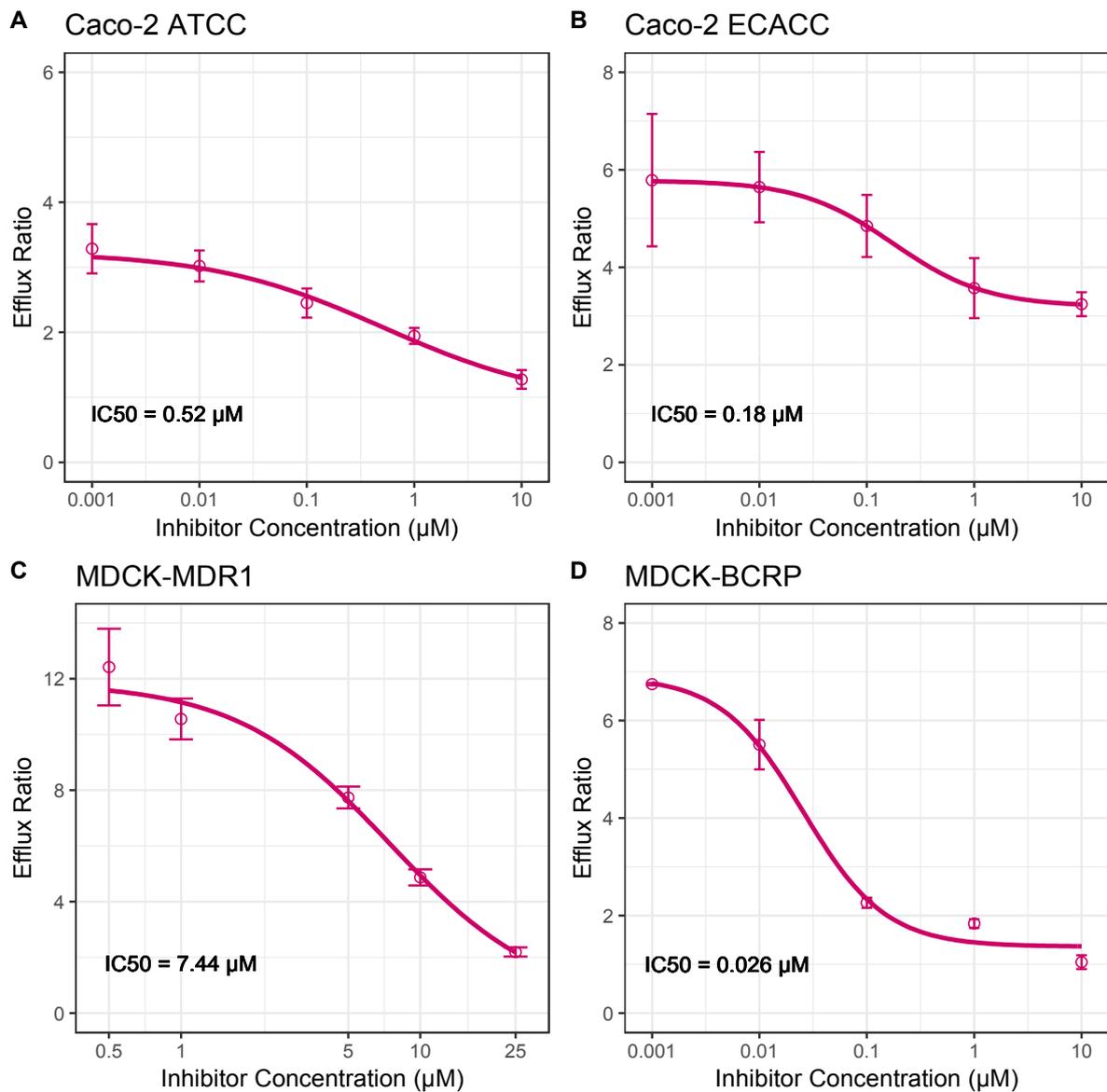


Figure 9. Efflux ratios of rivaroxaban (10 μM) across Caco-2_{ATCC} (A), Caco-2_{ECACC} (B), MDCK-MDR1 (C) and MDCK-BCRP (D) cells, without and with Ko143 at increasing concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 25 μM) after 2 h incubation. Experimental data (n=3) are represented by circles representing mean values with their standard deviations. Lines represent the corresponding sigmoid models obtained with an unweighted nonlinear least squares regression algorithm. IC50s are shown for each cell model.



Supplementary information

Title: Value of quantifying ABC transporters by mass spectrometry and impact on *in vitro*-to-*in vivo* prediction of transporter-mediated drug-drug interactions of rivaroxaban.

Jacquerox E.^{a,*}, Hodin S.^a, Saib S.^a, He Z.^b, Bin V.^a, Delézay O.^a, Delavenne X.^{a,c}

^a INSERM U1059, Laboratoire Sainbiose, Equipe Dysfonctions Vasculaires et Hémostase, Université de Lyon, Saint-Etienne, France

^b Laboratoire de biologie, ingénierie et imagerie de la greffe de cornée, BiiGC, EA2521, Saint-Etienne, France

^c Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

Supplementary Materials and Methods

1. Sample preparation for LC-MS/MS analysis

Samples were prepared as previously described [27]. The membrane protein fraction was extracted using the Mem-PER Plus membrane protein extraction kit according to the manufacturer's protocol. Briefly, cell pellets were washed in the cell wash solution and re-suspended in the permeabilization buffer. After 10 min incubation, the cell lysates were centrifuged for 15 min at 16,000 g. Supernatant containing cytosolic proteins was removed and cell pellets were re-suspended in the solubilization buffer. The homogenate was incubated for 30 min and then centrifuged for 15 min at 16,000 g. Supernatant containing the membrane protein fraction was collected. Protein concentration was measured using the Micro BCA protein assay kit. The in-solution tryptic digestion was performed using the Pierce Mass Spec sample prep kit. Briefly, 100 µg of membrane protein fraction were reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT) for 45 min at 50°C, then alkylated with 50 mM iodoacetamide (IAA)

2281
2282
2283 for 20 min at room temperature. Proteins were precipitated with acetone and re-suspended in digestion
2284
2285 buffer. Digestion was performed with Lys-C (1:100) at 37°C for 2 h, then with trypsin (1:50) for 16 h
2286
2287 at 37°C. Each sample was desalted using the Pierce Peptide desalting spin column according to the
2288
2289 manufacturer's protocol.
2290

2291 2292 2293 2294 *2. Method validation*

2295 2296 2297 *2.1 Calibration standards and quality control samples*

2300
2301
2302 Calibration curve standards and quality control (QC) samples were prepared in digested BSA.
2303
2304 Calibration and QC samples were prepared from separated working solutions. Crude heavy-labeled
2305
2306 peptides were used as internal standards (IS) and added at a final concentration of 500 pM in each
2307
2308 sample.
2309

2310 2311 2312 *2.2. Limit of detection and quantification*

2313
2314
2315
2316
2317 Lower limit of detection (LLOD) and lower limit of quantification (LLOQ) were determined by
2318
2319 injection of decreasing quantities of each peptide in digested BSA and were calculated as the
2320
2321 concentration giving a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. Regarding LLOQ, precision should
2322
2323 be better than 20% and accuracy should be $\pm 20\%$ of the nominal concentration.
2324
2325

2326 2327 2328 *2.3. Determination of linearity, accuracy and precision*

2329
2330
2331
2332
2333 Linearity, accuracy and precision were determined using calibration standards and QC levels.
2334
2335 The calibration curves were generated by plotting the sum of peak area ratios of the three fragments of
2336
2337
2338
2339
2340

2341
2342
2343 each peptide and IS versus the concentration of peptide. Accuracy and precision of the calibration curves
2344
2345 were determined by analysing in duplicate the six non-zero calibrator levels. Within-run accuracy and
2346
2347 precision were assessed by analysing five replicates of the four levels of QC samples. Between-run
2348
2349 accuracy and precision were assessed by analyzing three runs on three different days of calibration and
2350
2351 QC samples. Accuracy was calculated using the following formula:

2352
2353
$$\text{DEV}(\%) = ((\text{theoretical concentration} - \text{calculated concentration}) / \text{theoretical concentration}) * 100.$$

2354
2355
2356
2357

2358 *2.4. Carry over*

2359
2360
2361
2362
2363

2364 The impact of carry over on the accuracy was assessed by analyzing a blank sample injected
2365
2366 after calibration standards. The carry over value should not exceed 20% of LLOQ.
2367
2368
2369
2370
2371
2372
2373
2374
2375
2376
2377
2378
2379
2380
2381
2382
2383
2384
2385
2386
2387
2388
2389
2390
2391
2392
2393
2394
2395
2396
2397
2398
2399
2400

Supplementary data

Figure S1. Calibration curves for the two P-gp peptides FYDPLAGK and FDTLVGER and the two BCRP peptides VIQELGLDK and SLLDVLAAR. (n=2 for each calibration level)

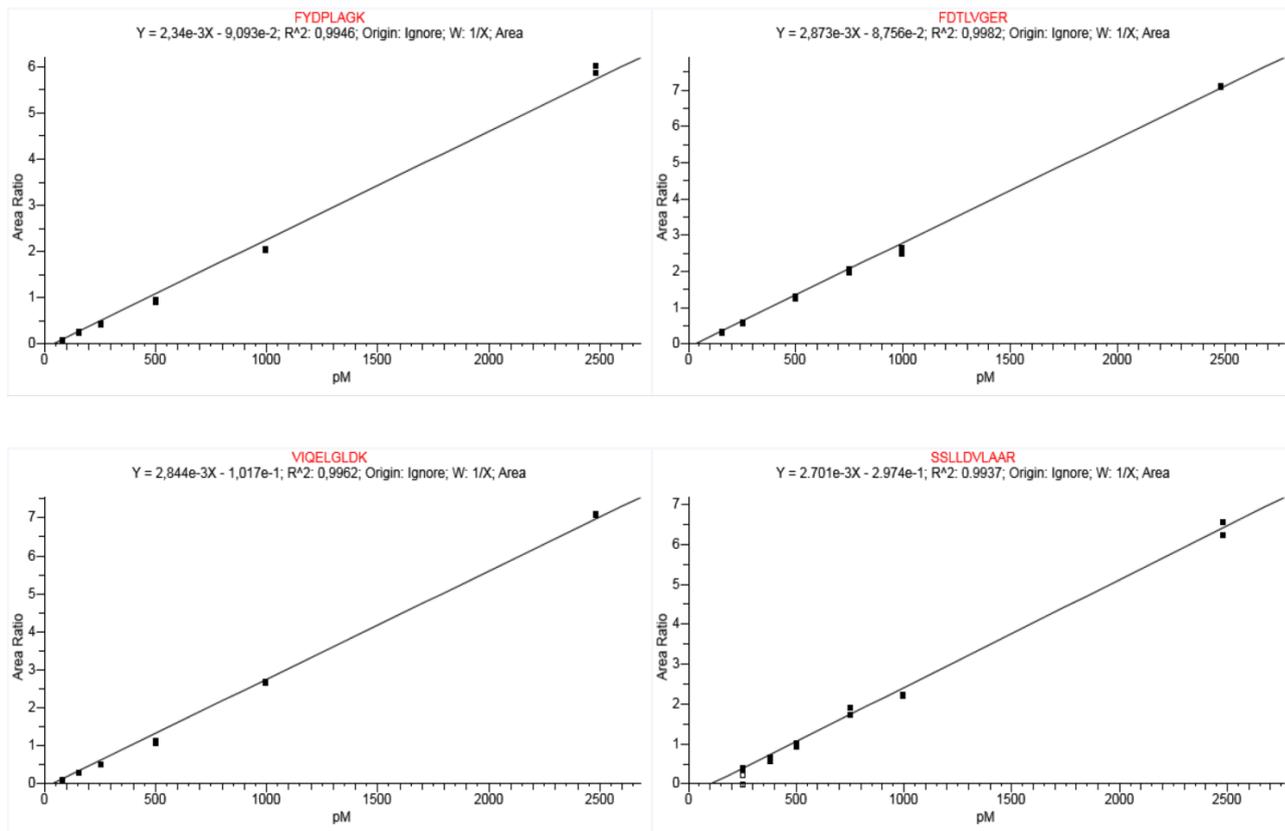


Table S1. Intra and inter-day validation of P-gp and BCRP quantification peptides (n=5 for each run).

		FDTLVGER				FYDPLAGK				VIQELGLDK				SSLLDVLAAR			
		CQ 1	CQ 2	CQ 3	CQ 4	CQ 1	CQ 2	CQ 3	CQ 4	CQ 1	CQ 2	CQ 3	CQ 4	CQ 1	CQ 2	CQ 3	CQ 4
2461																	
2462																	
2463																	
2464																	
2465																	
2466																	
2467																	
2468																	
2469																	
2470	Intra-day																
2471	validation	CQ 1	CQ 2	CQ 3	CQ 4	CQ 1	CQ 2	CQ 3	CQ 4	CQ 1	CQ 2	CQ 3	CQ 4	CQ 1	CQ 2	CQ 3	CQ 4
2472																	
2473																	
2474	Run 1	6.55	2.00	3.16	3.20	3.30	2.77	2.02	2.63	8.78	2.67	4.00	4.48	7.94	5.33	4.37	3.62
2475	Run 2	3.77	5.26	3.04	5.00	8.41	4.40	2.51	3.39	5.39	6.31	1.34	1.89	21.92	8.44	7.87	4.55
2476	Intra-day CV(%)	1.62	2.16	3.11	5.42	6.09	2.03	2.09	2.91	11.81	4.22	1.59	6.20	2.79	3.12	3.61	4.64
2477	Run 3	14.41	-5.84	-8.22	0.24	15.30	-11.19	1.97	-0.91	7.79	-3.80	-1.05	3.76	-6.25	-1.16	-8.06	-2.92
2478	Run 1	13.36	-6.11	-9.61	-0.46	10.73	-11.48	-3.20	-2.22	13.35	-4.08	-2.05	1.34	-11.88	5.33	-6.02	7.97
2479	Intra-day DEV(%)	6.14	-8.62	-3.22	1.88	4.40	-12.76	3.96	1.51	7.15	-3.12	-1.12	-1.04	7.99	0.00	-12.91	-6.40
2480	Run 2																
2481	Run 3																
2482																	
2483	Inter-day																
2484	validation																
2485																	
2486	Intra-day	3.98	3.14	3.10	4.54	5.93	3.07	2.21	2.98	8.66	4.40	2.31	4.19	10.88	5.63	5.28	4.27
2487	Inter-day CV(%)	11.30	-6.86	-7.02	0.55	10.14	-11.81	0.91	-0.54	9.43	-3.67	-1.41	1.35	-3.38	1.39	-9.00	0.45
2488	Run 1																
2489	Run 2																
2490	Run 3																
2491																	
2492																	
2493																	
2494																	
2495																	
2496																	
2497																	
2498																	
2499																	
2500																	
2501																	

2502
2503
2504
2505
2506
2507
2508
2509
2510
2511
2512
2513
2514
2515
2516
2517
2518
2519
2520
2521
2522
2523
2524
2525
2526
2527
2528
2529
2530
2531
2532
2533
2534
2535
2536
2537
2538
2539
2540
2541
2542
2543
2544
2545
2546
2547
2548
2549
2550
2551
2552
2553
2554
2555
2556
2557
2558
2559
2560
2561

1 **Table S2.** Rivaroxaban permeabilities across MDCK-MDR1, MDCK-BCRP, Caco-2_{ATCC} and Caco-
2 ₂_{ECACC} models. Each data is presented with the mean value ± standard deviation. Bidirectional
3 permeabilities of rivaroxaban (apical-to-basolateral: P_{app} A-B, basolateral-to-apical: P_{app} B-A, expressed
4 in cm/s, n=3) are presented without an inhibitor (DOAC concentration = 10μM) and with increasing
5 concentrations of verapamil (0.1, 1, 10, 100, 500,1000 μM) and ko143 (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 25 μM)
6 across MDCK-MDR1, MDCK-BCRP, Caco-2_{ATCC} and Caco-2_{ECACC} cells.

Test conditions	Papp A-B	Papp B-A
	10 ⁻⁶ cm/s	10 ⁻⁶ cm/s
MDCK-MDR1		
Rivaroxaban 10μM	4.89 ± 0.444	56.4 ± 3.32
Rivaroxaban 10μM + verapamil 1μM	5.13 ± 0.441	56.5 ± 2.08
Rivaroxaban 10μM + verapamil 10μM	6.28 ± 0.489	42.5 ± 3.47
Rivaroxaban 10μM + verapamil 100μM	10.9 ± 0.957	32.2 ± 0.291
Rivaroxaban 10μM + verapamil 500μM	19.2 ± 0.529	20.4 ± 0.749
Rivaroxaban 10μM + verapamil 1mM	23.4 ± 1.30	17.6 ± 0.919
Rivaroxaban 10μM + ko143 0.5μM	4.69 ± 0.478	58.2 ± 2.54
Rivaroxaban 10μM + ko143 1μM	4.82 ± 0.272	50.8 ± 2.05
Rivaroxaban 10μM + ko143 5μM	5.87 ± 0.160	45.4 ± 1.94
Rivaroxaban 10μM + ko143 10μM	7.81 ± 0.266	38.0 ± 1.84
Rivaroxaban 10μM + ko143 25μM	12.2 ± 0.847	26.7 ± 0.771
MDCK-BCRP		
Rivaroxaban 10μM	5.51 ± 0.437	39.8 ± 1.29
Rivaroxaban 10μM + verapamil 1μM	5.53 ± 0.806	29.5 ± 1.67
Rivaroxaban 10μM + verapamil 10μM	6.11 ± 0.287	30.3 ± 1.11
Rivaroxaban 10μM + verapamil 100μM	7.61 ± 0.350	25.1 ± 1.95
Rivaroxaban 10μM + verapamil 500μM	11.5 ± 1.19	18.1 ± 0.683
Rivaroxaban 10μM + ko143 0.001μM	6.61 ± 0.012	44.6 ± 0.128
Rivaroxaban 10μM + ko143 0.01μM	7.63 ± 0.680	41.9 ± 0.963

2562
 2563
 2564
 2565
 2566
 2567
 2568
 2569
 2570
 2571
 2572
 2573
 2574
 2575
 2576
 2577
 2578
 2579
 2580
 2581
 2582
 2583
 2584
 2585
 2586
 2587
 2588
 2589
 2590
 2591
 2592
 2593
 2594
 2595
 2596
 2597
 2598
 2599
 2600
 2601
 2602
 2603
 2604
 2605
 2606
 2607
 2608
 2609
 2610
 2611
 2612
 2613
 2614
 2615
 2616
 2617
 2618
 2619
 2620
 2621

Rivaroxaban 10μM + ko143 0.1μM	12.8 ± 0.284	29 ± 1.17
Rivaroxaban 10μM + ko143 1μM	11.4 ± 0.274	20.9 ± 0.877
Rivaroxaban 10μM + ko143 10μM	21.6 ± 0.588	22.5 ± 2.96
Caco-2_{ATCC}		
Rivaroxaban 10μM	14.4 ± 1.09	45 ± 3.70
Rivaroxaban 10μM + verapamil 0.1μM	16.8 ± 1.11	48.1 ± 2.14
Rivaroxaban 10μM + verapamil 1μM	14.9 ± 0.115	43.4 ± 5.95
Rivaroxaban 10μM + verapamil 10μM	17.6 ± 0.330	36.8 ± 1.86
Rivaroxaban 10μM + verapamil 100μM	18.6 ± 1.41	28.8 ± 2.78
Rivaroxaban 10μM + verapamil 500μM	19.9 ± 1.68	22 ± 0.253
Rivaroxaban 10μM + ko143 0.001μM	13 ± 1.19	42.8 ± 3.01
Rivaroxaban 10μM + ko143 0.01μM	15.6 ± 0.619	47.1 ± 3.20
Rivaroxaban 10μM + ko143 0.1μM	18.9 ± 0.569	46.3 ± 4.01
Rivaroxaban 10μM + ko143 1μM	20.5 ± 0.899	39.8 ± 1.79
Rivaroxaban 10μM + ko143 10μM	24.7 ± 1.92	31.5 ± 2.57
Caco-2_{ECACC}		
Rivaroxaban 10μM	10.0 ± 0.173	57.5 ± 3.55
Rivaroxaban 10μM + verapamil 0.1μM	9.79 ± 0.510	45.1 ± 6.41
Rivaroxaban 10μM + verapamil 1μM	9.17 ± 0.883	35.4 ± 4.06
Rivaroxaban 10μM + verapamil 10μM	11.7 ± 0.968	37.6 ± 0.831
Rivaroxaban 10μM + verapamil 100μM	15.6 ± 1.57	29.6 ± 0.360
Rivaroxaban 10μM + verapamil 500μM	2.22 ± 1.04	20.9 ± 3.25
Rivaroxaban 10μM + ko143 0.001μM	6.50 ± 1.36	37.6 ± 4.02
Rivaroxaban 10μM + ko143 0.01μM	7.10 ± 0.902	40.1 ± 0.585
Rivaroxaban 10μM + ko143 0.1μM	9.37 ± 0.771	45.4 ± 4.65
Rivaroxaban 10μM + ko143 1μM	11.6 ± 1.07	41.5 ± 6.03
Rivaroxaban 10μM + ko143 10μM	12.1 ± 0.294	39.2 ± 2.80

1

2

Chapitre 3 : Mise en place d'un modèle cellulaire pour étudier le transport du rivaroxaban au niveau hépatique

1. Contexte et objectifs de l'étude

Le foie est un organe indispensable jouant un rôle clé dans la pharmacocinétique d'une grande majorité de médicaments, car il est impliqué à la fois dans le métabolisme et/ou l'élimination biliaire de ces médicaments. C'est particulièrement le cas pour le rivaroxaban, un AOD, dont les deux tiers de la dose absorbée sont éliminés par voie hépatique, avec une métabolisation principalement par les CYP3A4 et CYP2J2 (Weinz et al., 2009 ; Lang et al., 2009). Le rivaroxaban est également connu pour être un substrat à part égale de deux transporteurs d'efflux, P-gp et BCRP (Gnoth et al., 2011 ; Hodin et al., 2018). Au niveau hépatocytaire, ces transporteurs sont exprimés au pôle canaliculaire afin de faciliter l'excrétion biliaire et participent donc certainement à l'élimination biliaire du rivaroxaban (Giacomini et al., 2010). Les CYP et les transporteurs tels que P-gp et BCRP partagent de nombreux inhibiteurs/inducteurs, et des interactions synergiques au niveau des CYP et des transporteurs d'efflux hépatiques peuvent affecter la pharmacocinétique du rivaroxaban. Il est donc essentiel de pouvoir étudier *in vitro* la prise en charge hépatique des médicaments par les transporteurs membranaires et les interactions médicamenteuses qui y sont liées.

De nombreux systèmes *in vitro* ont été développés et validés pour prédire le métabolisme hépatique des médicaments et étudier les potentielles interactions médicamenteuses liées aux CYP450. C'est le cas des microsomes, des cultures primaires d'hépatocytes humains ou animaux, et des lignées HepG2 et HepaRG. A l'exception des microsomes, ces modèles cellulaires permettent aussi d'étudier le transport hépatocytaire et l'efflux biliaire des médicaments. C'est particulièrement vrai pour le modèle HepaRG, dont l'expression des transporteurs SLC et ABC a été mise en évidence par différentes techniques comme l'immunofluorescence ou la RT-PCR (Bachour-El Azzi et al., 2015 ; Le Vee et al., 2006 ; Le Vee et al., 2013). De plus, les cellules HepaRG semblent posséder un profil d'expression des transporteurs d'influx et d'efflux similaire aux hépatocytes *in vivo* (Le Vee et al., 2006), ce qui en fait un outil très intéressant pour l'étude du transport des médicaments au niveau hépatique. Cependant, à notre connaissance, la quantité de transporteur n'a jamais été

évaluée précisément, notamment par spectrométrie de masse et le transport du rivaroxaban n'a jamais été étudié sur ce modèle cellulaire hépatique.

Cette étude était centrée sur deux objectifs :

- Quantifier l'expression des transporteurs ABC canaliculaires dans le modèle HepaRG pour l'étude de l'excrétion biliaire des médicaments
- Étudier la fonctionnalité de ces transporteurs ABC dans l'efflux de substrats spécifiques, notamment le rivaroxaban.

2. Méthodes

2.1. Culture cellulaire

Les cellules HepaRG ont été cultivées pendant deux semaines dans du milieu Williams'E supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 5 µg/ml d'insuline, 2 mM de L-glutamine et 50 µM d'hydrocortisone hémisuccinate. Afin d'obtenir une différenciation hépatocytaire complète, les cellules ont été cultivées pendant deux semaines supplémentaires avec le même milieu complété par 2% de DMSO. Pour les études d'accumulation intracellulaire, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits, avec une densité d'ensemencement de 45000 cellules par puits. Le milieu a été changé tous les 2-3 jours pendant 4 semaines.

2.2. Expression et quantification des transporteurs ABC par spectrométrie de masse

Une analyse protéomique en spectrométrie de masse a été réalisée afin d'évaluer l'expression et l'abondance relative des transporteurs ABC présents dans le modèle HepaRG. Les lignées Caco-2_{ATCC} et Caco-2_{ECACC} ont servi de contrôle positif d'expression des transporteurs. L'extraction des membranes et la préparation des échantillons a été effectuée comme décrit précédemment (Mercier et al., 2019). L'analyse en spectrométrie de masse a été effectuée selon le mode DDA. Brièvement, la chromatographie a été réalisée sur une colonne Easy-spray C18 (2 µm, 0,075 mm de diamètre interne x 500 mm) avec un gradient de 150 minutes. La phase mobile A était de l'eau avec 0,1 % d'acide formique et la phase mobile B comprenait 80% d'acétonitrile et 0,08% d'acide formique. Les peptides ont été élués par un gradient de 150 min allant de 2,5 % à 40 % de phase B en 123 min et comprenant un court lavage à 90% de phase B avant de revenir aux conditions de départ. Une analyse des ions précurseurs a été réalisées dans l'Orbitrap® avec une plage de balayage de 375 à 1500 m/z (avec

une résolution de 70 000) et les 10 précurseurs multichargés les plus intenses ont été sélectionnés pour une fragmentation.

Pour la quantification absolue de P-gp et BCRP, la chromatographie a été réalisée à l'aide d'un système de chromatographie liquide Ultimate U3000 (à un débit de 300 nl/min). Les peptides ont d'abord été chargés dans une colonne de pré-concentration Acclaim PepMap 100 C18 (100µm×2cm, 5µm, 100Å) à 20µL/min avec de l'eau contenant 2% d'acétonitrile et 0,1% de TFA. La séparation a ensuite été effectuée sur une colonne Easy-spray C18 (2 µm, 0,075 mm de diamètre interne x 150 mm) avec un gradient de 45 minutes. La quantification des peptides a été réalisée par spectrométrie de masse ciblée en mode PRM. Pour chaque peptide, les 3 fragments les plus intenses ont été retenus. La méthode d'acquisition combinait un full scan et une méthode PRM multiplexée. Le full scan a été réalisé avec une résolution de 17 500 et une plage de balayage de 400 à 1200 m/z. Les paramètres de la méthode PRM étaient : une résolution de 35 000, une fenêtre d'isolation de 0,7 m/z et une énergie de collision normalisée de 27 pour la fragmentation. La méthode a été validée conformément aux recommandations de la FDA pour la validation des méthodes bioanalytiques (FDA, 2018). Pour chaque protéine, 3 peptides protéotypiques ont été sélectionnés. Les deux plus intenses ont été retenus comme peptides de quantification et le troisième peptide a servi de peptide de confirmation. Les peptides de quantification étaient FDTLVGER et FYDPLAGK pour P-gp et SLLDVLAAAR et VIQELGLDK pour BCRP. Pour chaque peptide, les 3 fragments les plus intenses ont été sélectionnés et utilisés pour la quantification. Les peptides de confirmation étaient TVIAFGGQK pour P-gp et ENLQFSAALR pour BCRP.

2.3. Fonctionnalité des transporteurs ABC

2.3.1. Étude fonctionnelle par immunofluorescence

La fonctionnalité du transporteur canaliculaire MRP2 a été évaluée par imagerie fonctionnelle à l'aide de la sonde 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDFDA). Celle-ci est clivée par des estérases hépatocytaires, produisant ainsi le métabolite CDF fluorescent qui est un substrat de MRP2. Les cellules ont été pré-incubées pendant 30 min à 37°C en présence ou en absence de ciclosporine (50µM), un inhibiteur à large spectre des transporteurs ABC. Puis les cellules ont été rincées avec du tampon PBS à 4°C avant d'être incubées avec la solution de CDFDA (3 µM) pendant 30 min à 37°C. Les noyaux cellulaires ont été marqués à l'aide d'une solution d'Hoescht à 5µg/ml. Enfin, les cellules ont été rincées

avec du PBS à 4°C. Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope à épifluorescence, avec contraste de phase.

2.3.2. Études d'accumulation intracellulaire

La fonctionnalité des transporteurs P-gp et BCRP a été évaluée par des études d'accumulation intracellulaire à l'aide de trois substrats tels que la rhodamine 123 (10 µM), le docétaxel (1 µM) et le rivaroxaban (10 µM). Les cellules ont d'abord été prétraitées pendant 30 min à 37°C avec les solutions d'inhibiteurs comprenant le vérapamil (100 µM), le ko143 (10µM), la ciclosporine (50µM), l'itraconazole (2,1 µM) et le dipyridamole (10 µM). Les cellules ont ensuite été rincées par du tampon PBS à 4°C, puis incubées pendant 30 min (pour la rhodamine 123) ou 1h à 37°C avec les solutions de substrat préparées dans le tampon HBSS comprenant 10mM d'Hepes. Enfin, les cellules ont été lysées à température ambiante pendant 15 min dans une solution de triton X-100 à 0,2% (pour la rhodamine 123) ou pendant 45 min dans une solution d'acide formique à 2%. La quantité de rhodamine 123 accumulée à l'intérieur des cellules a été déterminée par spectrofluorimétrie à une longueur d'onde d'excitation de 435 mn et une longueur d'onde d'émission de 538 nm. Les quantités de docétaxel et de rivaroxaban ont été déterminées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. L'accumulation de chaque substrat a été exprimée en pourcentage de cellules non traitées et les données ont été normalisées par la teneur en protéines des cellules pour chaque puits.

3. Résultats

3.1. Expression et quantification des transporteurs ABC

L'analyse protéomique en spectrométrie de masse a permis d'évaluer l'expression relative des transporteurs ABC dans le modèle HepaRG, et de la comparer à celle retrouvée dans les modèles Caco-2_{ATCC} et Caco-2_{ECACC} (Figure 80). Le transporteur le plus abondant dans les cellules HepaRG est la P-gp, qui présente une abondance similaire à celle retrouvée dans les modèles Caco-2. Le niveau d'expression de BCRP est inférieur au niveau d'expression des autres transporteurs ABC (environ vingt-cinq fois plus faible que celui de P-gp). Comparé au modèle Caco-2, les cellules HepaRG présentent une abondance de BCRP vingt fois plus faible. Les abondances des transporteurs MRP1, MRP2 et MRP3 sont semblables au sein du modèle HepaRG. L'expression de MRP1 et MRP3 est légèrement supérieure à celle observée dans les

modèles Caco-2, tandis que l'expression de MRP2 est environ cinq fois inférieure à celle des cellules Caco-2.

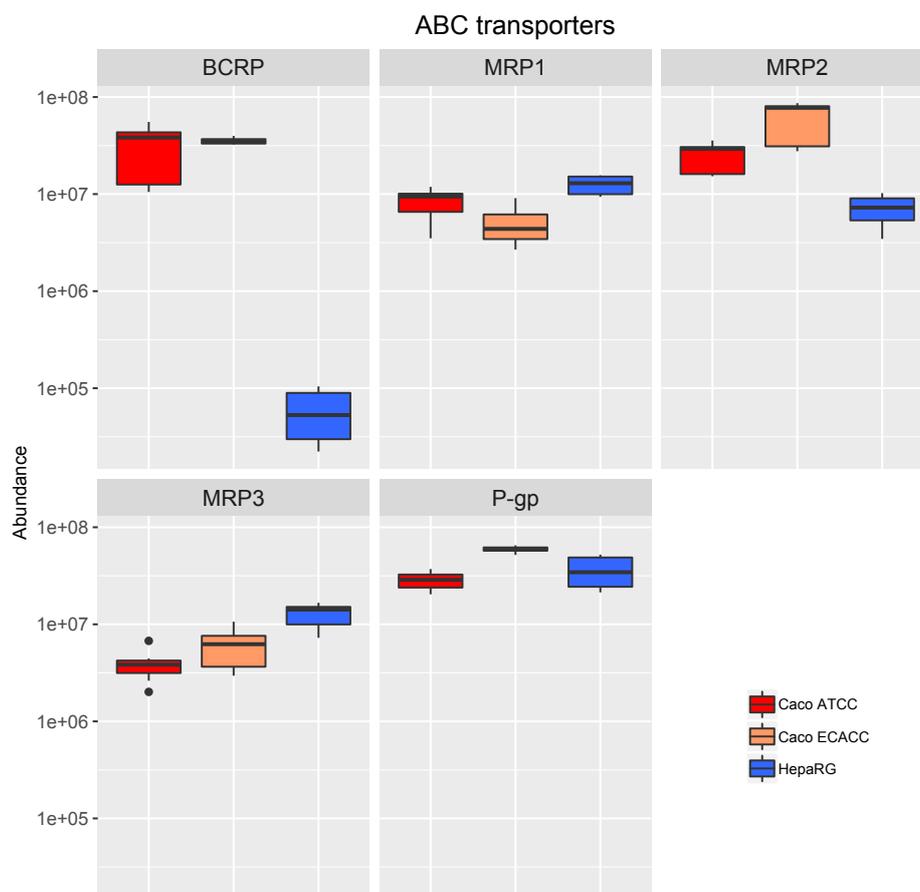


Figure 80. Quantification relative des transporteurs ABC dans les modèles HepaRG, Caco-2_{ATCC} et Caco-2_{ECACC}.

Ensuite, une méthode de quantification absolue en spectrométrie de masse a permis d'évaluer précisément la quantité des transporteurs P-gp et BCRP au sein des membranes des cellules HepaRG. Comme observé lors de la quantification relative, la quantité de P-gp est supérieure à celle de BCRP (Figure 81). La quantité de P-gp est en moyenne de 0,456 fmol/ μ g de protéine, avec une concentration de 0,536 fmol/ μ g pour le peptide FDTLVGER et 0,376 fmol/ μ g pour le peptide FYDPLAGK. Concernant BCRP, seul le peptide VIQELGLDK a pu être quantifié, avec une concentration de 0,175 fmol/ μ g de protéine. Le peptide SSLLDVLAAR n'a pas été détecté. Les ions de confirmation TVIAFGGQK pour P-gp et ENLQFSAALR pour BCRP ont bien été détectés, confirmant la présence de ces deux transporteurs.

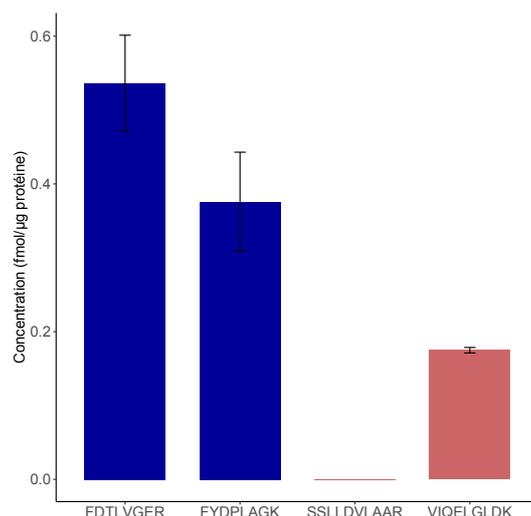


Figure 81. Quantification absolue de P-gp (bleus) et BCRP (rose) dans la fraction membranaire des cellules HepaRG.

3.2. Fonctionnalité des transporteurs ABC

La fonctionnalité du transporteur MRP2 a été évaluée par imagerie fonctionnelle à l'aide de la sonde CDFDA, en l'absence et en présence de ciclosporine, un inhibiteur de MRP2 (Figure 82). Après une incubation de 30 minutes avec la sonde CDFDA, le composé CDF fluorescent a été localisé uniquement dans les canalicules biliaires des cellules HepaRG, confirmant une expression fonctionnelle du transporteur MRP2 au pôle canaliculaire des cellules hépatocytaires. Au contraire, une fluorescence diffuse localisée au niveau des hépatocytes a été observée lors de l'incubation en présence de ciclosporine. Cette absence de marquage canaliculaire bien défini en présence de ciclosporine confirme l'inhibition du transport canaliculaire du CDF par MRP2.

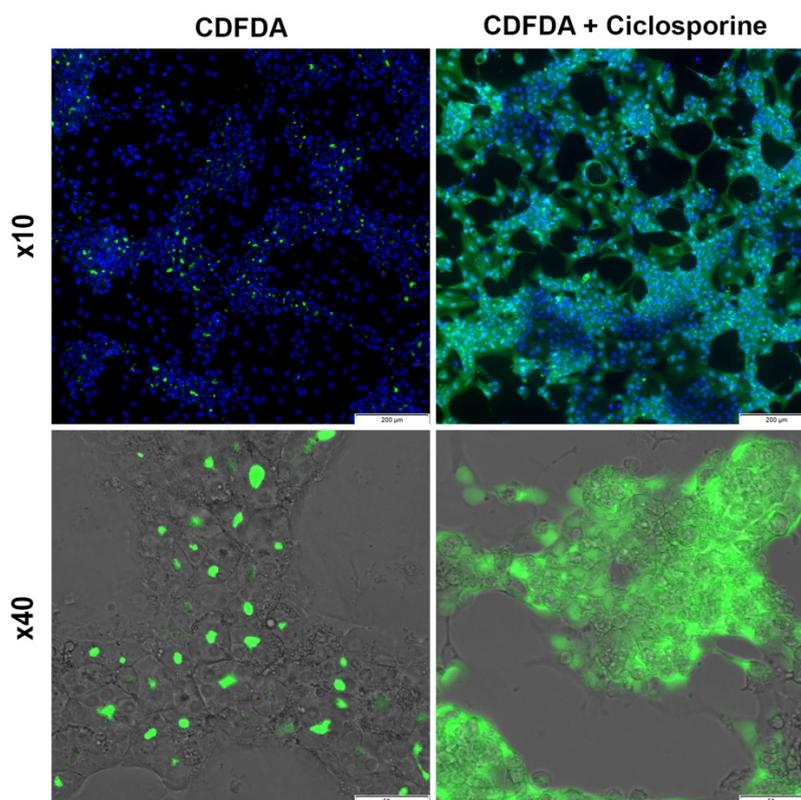


Figure 82. Imagerie fonctionnelle du transporteur MRP2 à l'aide de la sonde CDFDA avec ou sans inhibiteur (ciclosporine) en microscopie à épifluorescence.

Ensuite, la fonctionnalité des transporteurs P-gp et BCRP a été évaluée par des études d'accumulation intracellulaire à l'aide de trois substrats (rhodamine 123, docétaxel et rivaroxaban) et d'inhibiteurs spécifiques (Figure 83). La rhodamine 123, un substrat de P-gp, a montré une augmentation de 38% de son accumulation intracellulaire en présence de ciclosporine 50µM (Figure 83A). L'accumulation intracellulaire du docétaxel, un autre substrat de P-gp, a augmentée de 52% et 84% en présence d'itraconazole (2µM) et de dipyridamole (10µM) respectivement, deux inhibiteurs de P-gp (Figure 83B). L'association de ces deux inhibiteurs a conduit à une accumulation plus de quatre fois supérieure à celle observée sans inhibiteur. Enfin le rivaroxaban, un substrat de P-gp et BCRP, présentait une accumulation intracellulaire augmentée de 15% en présence de ko143 (10µM) (Figure 83C). Le traitement des cellules par le vérapamil (100µM) a augmenté de 59% son accumulation intracellulaire. La modification plus importante de l'accumulation du rivaroxaban en présence de l'inhibiteur spécifique de P-gp qu'en présence de l'inhibiteur de BCRP est en lien avec une expression supérieure de P-gp dans le modèle. L'ensemble de ces résultats démontre la fonctionnalité des transporteurs P-gp et BCRP dans les cellules HepaRG.

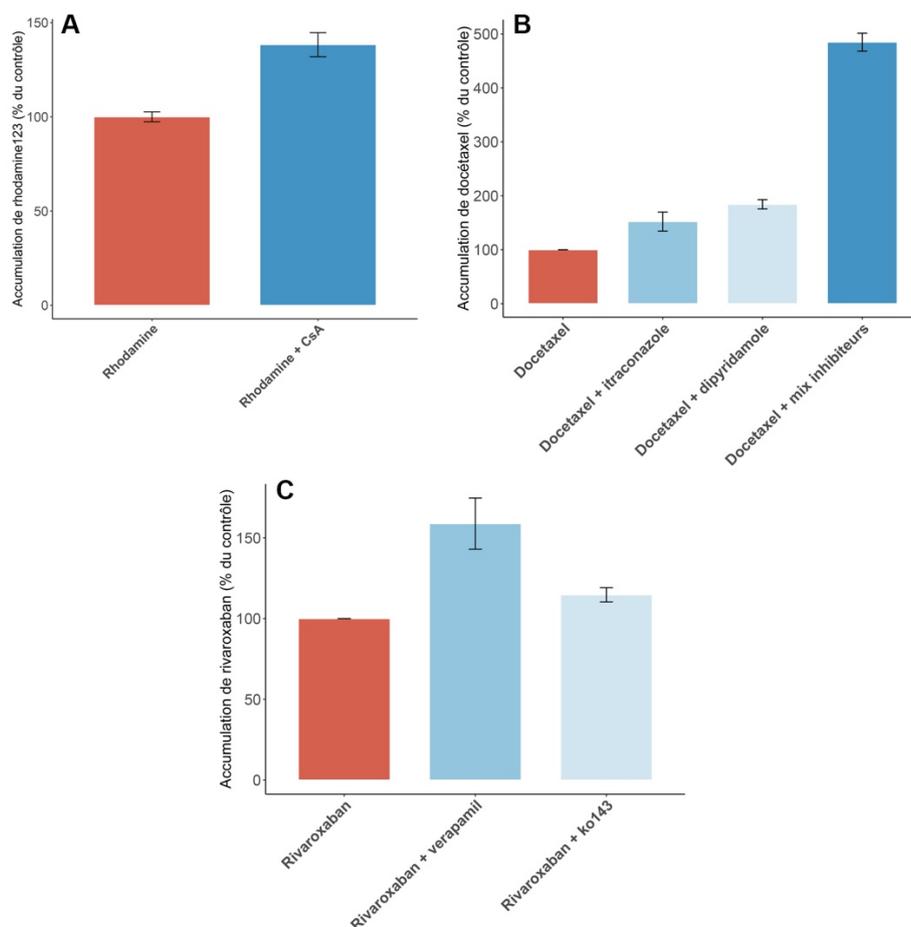


Figure 83. Taux d'accumulation intracellulaire de rhodamine 123 (A), docétaxel (B) et rivaroxaban (C) en présence de différents inhibiteurs sur les cellules HepaRG. Les résultats ont été normalisés par la quantité de protéines.

4. Discussion

Le rivaroxaban est un substrat connu des transporteurs d'efflux, particulièrement P-gp et BCRP (Gnoth et al., 2011 ; Hodin et al., 2018). Les transporteurs ABC sont impliqués dans toutes les étapes ADME, telles que l'absorption intestinale et l'élimination rénale et biliaire. Or, près de 65% de la dose administrée de rivaroxaban est éliminée par voie biliaire, sous forme inchangée ou métabolisée (Weinz et al., 2009 ; Galgani et al., 2018). Il est donc important de pouvoir évaluer *in vitro* la prise en charge du rivaroxaban par les transporteurs ABC hépatiques, afin de prédire les IAM qui pourraient perturber son élimination. A notre connaissance, cette étude est la première à évaluer *in vitro* l'excrétion biliaire du rivaroxaban dans le modèle cellulaire HepaRG.

L'analyse protéomique en spectrométrie de masse a permis de confirmer l'expression des principaux transporteurs canaliculaires impliqués dans l'excrétion biliaire des

médicaments, tels que P-gp, BCRP et MRP2. Deux transporteurs ABC situés au pôle sinusoidal des hépatocytes, MRP1 et MRP3, ont également été détectés. P-gp possède la plus forte abondance, suivi par MRP1 et MRP3, puis MRP2 et enfin BCRP qui possède l'abondance la plus faible. Ce profil d'abondance des transporteurs est cohérent avec les niveaux d'expression d'ARNm reportés par Le Vee et al. (Le Vee et al., 2006). Habituellement, l'expression des transporteurs dans les cellules HepaRG est comparé à celle des hépatocytes fraîchement isolés ou cryopréservés (Le Vee et al., 2006 ; Le Vee et al., 2013 ; Bachour-El Azzi et al., 2015). Ici, les cellules Caco-2 ont été choisies comme contrôle positif de l'expression des transporteurs car il s'agit du modèle de référence pour les études de transport (FDA, 2017). Le niveau d'expression de P-gp dans les cellules HepaRG est similaire à celui des cellules Caco-2, avec une concentration de 0,456 fmol/ μ g de protéine contre une concentration respectivement de 0,350 fmol/ μ g et 0,595 fmol/ μ g pour les Caco-2_{ATCC} et les Caco-2_{ECACC}. Les cellules HepaRG présentent une expression plus faible de MRP2 et beaucoup plus faible de BCRP. L'efflux du rivaroxaban dans les cellules HepaRG sera donc majoritairement dû à l'activité de la P-gp. Cependant, le problème de détection d'un des peptides de quantification de BCRP est probablement à l'origine d'une sous-estimation de l'expression de BCRP dans ce modèle.

Les études d'immunofluorescence et d'accumulation intracellulaire ont démontré la fonctionnalité des transporteurs canaliculaires. La sonde CDFDA s'accumule dans les structures canaliculaires, excepté en présence de ciclosporine, un inhibiteur large des transporteurs ABC, qui empêche l'excrétion de la sonde dans les canalicules et la retient dans les hépatocytes. Ces résultats sont similaires à ceux reportés précédemment (Le Vee et al., 2013 ; Bachour-El Azzi et al., 2015), confirmant la fonctionnalité du transporteur MRP2 dans notre modèle HepaRG. L'augmentation de l'accumulation intracellulaire de plusieurs substrats de P-gp et BCRP en présence d'inhibiteurs a confirmé la fonctionnalité des transporteurs ABC exprimés au pôle canaliculaire. Les études d'accumulation intracellulaire du rivaroxaban ont mis en évidence son excrétion biliaire par les transporteurs ABC. La présence de ko143 a conduit à une légère augmentation de l'accumulation intracellulaire du rivaroxaban, tandis que l'inhibition spécifique de P-gp par le vérapamil a augmenté de presque 60% son accumulation, confirmant l'implication de P-gp dans l'excrétion biliaire du rivaroxaban. L'accumulation intracellulaire plus importante du rivaroxaban avec le vérapamil est probablement liée à une expression plus importante de la P-gp et à la très faible expression de BCRP.

Contrairement à d'autres études d'accumulation intracellulaire réalisée avec le même substrat, par exemple la rhodamine 123, les pourcentages d'accumulation en présence d'inhibiteurs sont plus faibles que ceux reportés précédemment dans d'autres lignées cellulaires

(Mercier et al., 2018 ; Puech et al., 2018). Ceci peut s'expliquer par la faible proportion et la faible surface des structures canaliculaires présentes sur l'ensemble du tapis cellulaire, engendrant une variation plus faible de l'accumulation intracellulaire.

Le modèle HepaRG est un modèle plus complexe que les modèles habituellement utilisés dans les études de transport, tels que Caco-2 ou MDCK, car il associe métabolisme et transport. En effet, les cellules HepaRG possèdent un profil d'expression des CYP similaire à celui des hépatocytes humains et sont un outil pertinent pour l'étude du métabolisme (Guillouzo et al., 2007 ; Kanebratt et Andersson, 2008 ; Zanelli et al., 2012). Il faut donc tenir compte de la part du métabolisme lors des études d'accumulation. Afin de compléter cette étude, il serait intéressant d'étudier également la prise en charge des métabolites principaux du rivaroxaban par les différents transporteurs présents au pôle canaliculaire des hépatocytes. Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de P-gp et d'un inhibiteur mixte de P-gp et du CYP3A4 permettrait d'étudier, lors d'une IAM, la part liée au métabolisme et celle liée à l'excrétion biliaire par les transporteurs.

En conclusion, cette étude a mis en évidence l'expression et la fonctionnalité de plusieurs transporteurs ABC dans le modèle cellulaire HepaRG. Les principaux transporteurs canaliculaires présents *in vivo*, comme P-gp, BCRP et MRP2 ont été retrouvés dans ce modèle. Les études d'accumulation intracellulaire ont démontré la capacité du modèle à étudier l'efflux biliaire de substrats des transporteurs ABC et ont mis en évidence pour la première fois le rôle de P-gp dans l'excrétion biliaire du rivaroxaban. Des études complémentaires comme la détermination des IC50 d'inhibiteurs spécifiques de ces transporteurs sont nécessaires afin de déterminer si le modèle HepaRG est également un bon outil pour prédire les IAM au niveau hépatique.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Depuis la mise sur le marché des AOD en 2008, leur prescription ne cesse d'augmenter en remplacement des AVK. Aujourd'hui, seulement dix ans après leur commercialisation, l'utilisation clinique des AOD rejoint celle des AVK et devrait la dépasser dans les prochaines années pour devenir l'anticoagulation majoritaire par voie orale. Ce tournant devrait améliorer la prise en charge de la maladie thromboembolique car, à l'inverse des AVK qui possèdent une forte variabilité pharmacocinétique et nécessitent un suivi biologique contraignant, les AOD ont l'avantage de présenter une variabilité intra- et interindividuelle plus faible, un meilleur rapport bénéfice/risque et une utilisation simplifiée. Il devient donc nécessaire de maîtriser la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de ces molécules relativement récentes, particulièrement en identifiant les potentiels facteurs de variabilité pharmacocinétique dont certains peuvent être communs aux AVK, tels que l'âge, le sexe, l'ethnie, l'alimentation, l'existence de polymorphismes génétiques ou d'interactions médicamenteuses. Contrairement aux AVK, les AOD sont des substrats des protéines d'efflux telles que la P-glycoprotéine (Gschwind et al., 2013) et BCRP, et l'implication de ces transporteurs membranaires dans la pharmacocinétique des AOD représente donc une source de variabilité à prendre en compte. Ce travail a permis d'étudier *in vitro* l'implication des transporteurs ABC tels que P-gp et BCRP dans la variabilité pharmacocinétique des AOD, plus particulièrement du rivaroxaban.

Dans ce travail, nous avons évalué les conséquences de la prise en charge des AOD par les transporteurs ABC, en montrant *in vitro* l'existence potentielle d'une IAM liée aux transporteurs P-gp et BCRP entre le riociguat, un vasodilatateur utilisé dans le traitement de l'HTAP et de l'HTP-TEC, et deux AOD, l'apixaban et le rivaroxaban, qui possèdent des profils différents de prise en charge par les transporteurs ABC (Hodin et al., 2018). Le riociguat a inhibé plus fortement l'efflux du rivaroxaban que de l'apixaban, particulièrement par BCRP, suggérant une probabilité d'interaction plus importante avec le rivaroxaban. La valeur du rapport $[I_{\text{gut}}]/IC_{50}$ étant inférieure à 10, il semble peu probable d'observer cette interaction *in vivo* en l'absence d'autres facteurs de risque de bioaccumulation. Cependant, il faut garder à l'esprit que les patients atteints d'HTP-TEC présentent souvent plusieurs facteurs de risque de bioaccumulation (Gabriel et al., 2016), pouvant potentialiser la survenue de cette IAM liée aux transporteurs ABC. Cette étude a montré que les modèles cellulaires *in vitro* MDCK transfectés

sont de bons outils pour déterminer quels sont les transporteurs impliqués dans la prise en charge d'un médicament et évaluer les IAM liées à ces transporteurs, mais la surexpression d'un seul transporteur limite l'intérêt de ces modèles dans l'extrapolation des données de *l'in vitro* à *l'in vivo*. Effectivement, les modèles cellulaires utilisés sont extrêmement simplifiés et donc différents de l'histologie de la muqueuse *in vivo*. Les barrières physiologiques *in vivo* représentent des systèmes hétérogènes, constitués par exemple de plusieurs types cellulaires interagissant entre eux, tandis que les modèles recommandés pour les études de transport sont des systèmes plutôt homogènes, constitués généralement d'un seul type cellulaire. De plus, les modèles transfectés avec le gène humain d'un transporteur sont des modèles biaisés car ils surexpriment un seul transporteur. En effet, dans notre première étude les modèles MDCK transfectés ont permis d'évaluer uniquement l'effet du riociguat sur l'efflux des AOD par P-gp et BCRP séparément, alors que le transport complet de médicaments *in vivo* est plus complexe et peut impliquer d'autres transporteurs membranaires. Enfin, les modèles cellulaires possèdent une grande variabilité interlaboratoire, liée en partie à une expression des protéines dépendante de très nombreux facteurs parmi lesquels on retrouve, par exemple, les conditions de culture (composition du milieu, nombre de passages, surface de culture, ...).

Nous nous sommes donc intéressés, dans un second temps, aux paramètres cellulaires qui pouvaient influencer les résultats des études de transport *in vitro* du rivaroxaban. Notre intérêt s'est porté en particulier sur l'expression des transporteurs ABC dans les différents modèles recommandés par la FDA (Caco-2, MDCK, MDCK-MDR1 et MDCK-BCRP). Une méthode de quantification absolue fiable et robuste de P-gp et BCRP en spectrométrie de masse a été développée et validée selon les recommandations de la FDA (FDA, 2018), et a permis de quantifier les transporteurs ABC exprimés sur les cellules. La différence d'expression des transporteurs observée entre les différents modèles cellulaires était en lien direct avec la fonctionnalité. La prise en charge du rivaroxaban était plus importante dans les modèles exprimant davantage de transporteurs, conduisant pour un même inhibiteur à des IC50 variables selon le modèle cellulaire. Or, le rapport $[I_{\text{gut}}]/IC_{50}$ étant dépendant des valeurs d'IC50 déterminées *in vitro*, les conclusions sur l'importance clinique des IAM mises en évidence *in vitro* pour le rivaroxaban peuvent dépendre, par conséquent, du choix du modèle cellulaire. Le rivaroxaban étant principalement éliminé par voie biliaire, il semble peu adapté de prédire sa pharmacocinétique d'élimination avec un modèle d'absorption tel que le modèle Caco-2.

Après avoir montré l'influence de la quantité des transporteurs, nous avons évalué la variabilité inter-modèle. Pour compléter l'étude du transport du rivaroxaban au niveau intestinal (Caco-2) et rénal (MDCK), nous avons, pour la première fois, étudié *in vitro* le rôle des transporteurs P-gp et BCRP dans l'excrétion biliaire du rivaroxaban grâce au modèle cellulaire hépatique HepaRG. Ce modèle a surtout été développé pour l'étude du métabolisme hépatique des médicaments, et est très peu caractérisé pour des études pharmacologiques de transport des médicaments. La spectrométrie de masse a, de nouveau, permis de quantifier l'expression des transporteurs ABC qui a été comparée à celle retrouvée dans les cellules Caco-2, modèle de référence des études de transport (FDA, 2017). Les cellules HepaRG expriment autant de P-gp, moins de MRP2 et BCRP, et un peu plus de MRP1 et MRP3 que les cellules Caco-2. L'expression de BCRP étant faible dans les cellules HepaRG, l'efflux du rivaroxaban est donc majoritairement le reflet de l'activité de P-gp. L'augmentation de l'accumulation intracellulaire des substrats des transporteurs ABC, dont le rivaroxaban, en présence d'inhibiteurs de référence, démontre la bonne localisation et la fonctionnalité de ces transporteurs d'efflux dans le modèle HepaRG. Cette étude a mis en évidence le rôle de P-gp dans l'élimination biliaire du rivaroxaban, et a également confirmé l'existence d'une variabilité entre les différents modèles, notamment une variabilité de l'expression des transporteurs ABC.

Ce travail a également montré que l'extrapolation des données des études de transport *in vitro* à *in vivo* présentait certaines limites. Le calcul du rapport $[I_{\text{gut}}]/IC_{50}$ pour déterminer l'impact clinique d'une IAM détectée *in vitro* est une méthode simplifiée et $[I_{\text{gut}}]$ est une estimation très approximative de la concentration du médicament dans le liquide intestinal. D'autres approches plus complexes, comme les modèles pharmacologiques physiologiques (PBPK) intégratifs, peuvent être utilisées pour faire de telles prédictions. Ceci est d'autant plus vrai que les phénomènes qui se produisent *in vivo*, comme la liaison aux protéines ou le métabolisme ne sont pas considérés dans ces modèles. Il serait également intéressant d'intégrer la quantité de transporteurs présents sur les cellules dans ces modèles prédictifs. En effet, nous avons démontré grâce à la spectrométrie de masse que la variabilité de l'expression des transporteurs *in vitro* est corrélée à la variabilité de leur fonction entre les différents modèles cellulaires, et que cette expression est également variable au sein des modèles. De ce fait, on peut également supposer qu'une variation de la quantité de transporteurs exprimée *in vivo* par les tissus soit en partie à l'origine de variabilités pharmacocinétiques. Il est connu que l'expression des transporteurs peut être modulée par un traitement médicamenteux, par exemple la rifampicine, ou un état pathologique comme par exemple une inflammation (Greiner et al.,

1999 ; Adibi, 2003 ; Hartmann et al., 2001 ; Mosaffa et al., 2012), ce qui peut expliquer certaines variabilités intra- et interindividuelles. En outre, l'intégration de ce paramètre permettrait également de pouvoir utiliser des données provenant de différents laboratoires et limiter ainsi les variations interlaboratoires. Le niveau d'expression des transporteurs apparaît donc comme un paramètre important à prendre en compte dans l'évaluation *in vitro*, mais également *in vivo*, des IAM liées aux transporteurs et permettrait d'améliorer la corrélation *in vitro-in vivo*.

Pour conclure, ce travail a permis de mettre en évidence une prise en charge des AOD par les transporteurs ABC, particulièrement P-gp et BCRP, ainsi que l'existence d'IAM liées à ces transporteurs à l'échelle *in vitro*. Aujourd'hui, les modèles *in vitro* souffrent d'un manque de prédictibilité quant à l'implication clinique de ces IAM observées *in vitro* avec les AOD. Une des pistes d'amélioration envisagée lors de ce travail est l'intégration de la quantité de transporteurs exprimée par les modèles cellulaires. La spectrométrie de masse est une technique innovante qui apporte de nombreux avantages tels qu'une quantification relative et surtout absolue des transporteurs, ainsi que la détection de très faibles quantités (de l'ordre de l'attomole). Bien qu'onéreuse, cette technologie est de plus en plus accessible aux laboratoires de recherche et participera certainement à l'établissement d'une meilleure corrélation *in vitro - in vivo* pour l'étude des interactions pharmacocinétiques liées aux transporteurs ABC.

RÉFÉRENCES

Adibi SA. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 2003;285(5):779–88.

Aitken A, Learmonth M. Carboxymethylation of cysteine using iodoacetamide/iodoacetic acid. *The protein protocols handbook*, Humana Press, 2002, 455-6.

Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'graggen K, et al. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem Pharmacol* 2005;70(6):949–58.

Allen JD, Van Loevezijn A, Lakhai JM, et al. Potent and Specific Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Multidrug Transporter in vitro and in Mouse Intestine by a Novel Analogue of Fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* 2002;1(6):417-25.

Altena R, van Roon E, Folkeringa R, de Wit H, Hoogendoorn M. Clinical challenges related to novel oral anticoagulants: drug-drug interactions and monitoring. *Haematologica* 2014;99(2):e26–7.

Anderle P, Niederer E, Rubas W, et al. P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. *J Pharm Sci* 1998;87(6):757-62.

Anderle P. Genetic Variants of the Human Dipeptide Transporter PEPT1. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316(2):636–46.

Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175(3):880–5.

Arya M, Shergill IS, Williamson M, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005;5(2):209–19.

Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 2015;72:4–15.

Bachour-El Azzi P, Sharaneq A, Burbani A, et al. Comparative localization and functional activity of the main hepatobiliary transporters in HepaRG cells and primary human hepatocytes. *Toxicol Sci* 2015;145(1):157-68.

Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 2007;389(4):1017–31.

Basit A, Radi Z, Vaidya VS, et al. Kidney cortical transporter expression across species using quantitative proteomics. *Drug Metab Dispos* 2019;47(9):dmd-119.

Bathala MS, Masumoto H, Oguma T, et al. Pharmacokinetics, Biotransformation, and Mass Balance of Edoxaban, a Selective, Direct Factor Xa Inhibitor, in Humans. *Drug Metab Dispos* 2012;40(12):2250–5.

Becker C, Frey R, Unger S, et al. Pharmacokinetic interaction of riociguat with ketoconazole, clarithromycin, and midazolam. *Pulm Circ* 2016;6:S49-57.

Behrens I, Kissel T. Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers?. *Eur J Pharm Sci* 2003;19(5):433-42.

Belliard AM, Lacour B, Farinotti R, et al. Effect of tumor necrosis factor- α and interferon- γ on intestinal P-glycoprotein expression, activity, and localization in Caco-2 cells. *J Pharm Sci* 2004;93(6):1524-36.

Berlioz F, Maoret J-J, Paris H, et al. α 2-Adrenergic Receptors Stimulate Oligopeptide Transport in a Human Intestinal Cell Line. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294(2):466–72.

Bertoletti L, Ollier E, Duvillard C, et al. Direct oral anticoagulants: Current indications and unmet needs in the treatment of venous thromboembolism. *Pharmacol Res* 2017;118:33–42.

Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ, et al. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* 1984;136(1):175–9.

Bleasby K. Functional Consequences of Single Nucleotide Polymorphisms in the Human Organic Anion Transporter hOAT1 (SLC22A6). *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314(2):923–31.

Bleasby K, Castle JC, Roberts CJ, et al. Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica* 2006;36(10-11):963-88.

Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E, et al. The Metabolism and Disposition of the Oral Direct Thrombin Inhibitor, Dabigatran, in Humans. *Drug Metab Dispos* 2008;36(2):386–99.

Bolt MW, Mahoney PA. High-Efficiency Blotting of Proteins of Diverse Sizes Following Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal Biochem* 1997;247(2):185–92.

Borst P, Evers R, Kool M, et al. A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2000;92(16):1295–302

Borst P, de Wolf C, van de Wetering K. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 2007;453(5):661–73.

- Brodin B, Steffansen B, Nielsen C. Passive diffusion of drug substances: the concepts of flux and permeability. *Molecular Biopharmaceutics*, CU, Eds, 2010,135-52.
- Brönstrup M. Absolute quantification strategies in proteomics based on mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics* 2004;1(4):503–12.
- Bruhn O, Cascorbi I. Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014;10(10):1337–54.
- Bundgaard C, Jensen CJN, Garmer M. Species Comparison of In Vivo P-Glycoprotein-Mediated Brain Efflux Using *mdr1a*-Deficient Rats and Mice. *Drug Metab Dispos* 2012;40(3):461–6.
- Burger H, van Tol H, Boersma AW, et al. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* 2004;104(9):2940–2.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25(2):169–93.
- Canaparo R, Finnström N, Serpe L, et al. Expression of CYP3A isoforms and P-Glycoprotein in human stomach, jejunum and ileum. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34(11):1138-44.
- Chan LMS, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004;21(1):25–51.
- Chang M, Yu Z, Shenker A, et al. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of apixaban. *J Clin Pharmacol* 2016;56(5):637-45.
- Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, et al. Nonreceptor Tyrosine Kinase c-Yes Interacts with Occludin during Tight Junction Formation in Canine Kidney Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(4):1227–37.
- Chen Y, Teranishi K, Li S, et al. Genetic variants in multidrug and toxic compound extrusion-1, hMATE1, alter transport function. *Pharmacogenomics J* 2009;9(2):127–36.
- Cheng YC, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973;22(23):3099-108.
- Chiba H, Osanai M, Murata M, et al. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778(3):588–600.
- Chu XY, Strauss JR, Mariano MA, et al. Characterization of Mice Lacking the Multidrug Resistance Protein Mrp2 (*Abcc2*). *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317(2):579–89.

Chu X, Bleasby K, Evers R. Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2013;9(3):237-52.

Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, et al. Cisplatin Nephrotoxicity Is Critically Mediated via the Human Organic Cation Transporter 2. *Am J Pathol* 2005;167(6):1477-84.

Clarke H, Soler AP, Mullin JM. Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets. *J Cell Sci* 2000;113(18):3187-96.

Cole SPC, Deeley RG. Multidrug resistance II: MRP and related proteins. J.R. Bertino (Ed.), *Encyclopedia of Cancer*, Elsevier Science, USA, 2002, 255-67.

Cummins CL, Salphati L, Reid MJ, et al. In Vivo Modulation of Intestinal CYP3A Metabolism by P-Glycoprotein: Studies Using the Rat Single-Pass Intestinal Perfusion Model. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305(1):306-14.

Dahan A, Amidon GL. MRP2 mediated drug-drug interaction: Indomethacin increases sulfasalazine absorption in the small intestine, potentially decreasing its colonic targeting. *Int J Pharm* 2010;386(1-2):216-20.

Damme K, Nies AT, Schaeffeler E, et al. Mammalian MATE (SLC47A) transport proteins: impact on efflux of endogenous substrates and xenobiotics. *Drug Metab Rev* 2011;43(4):499-523.

Declèves X, Legrand O. Transport des anticancéreux par les transporteurs ABC et implications en hématologie – Transport of anticancer drugs by ABC transporters: involvement in hematology. *Lett Pharmacol* 2008;22(2):67-73.

Deeley RG, Westlake C, Cole SP. Transmembrane transport of endo-and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* 2006;86(3) :849-899.

Del Amo EM, Heikkinen AT, Mönkkönen J. In vitro–in vivo correlation in P-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption. *Eur J Pharm Sci* 2009;36(2-3):200-11.

Delavenne X, Ollier E, Basset T, et al. A semi-mechanistic absorption model to evaluate drug-drug interaction with dabigatran: application with clarithromycin. *Br J Clin Pharmacol* 2013;76:107-13.

Dessilly G, Elens L, Panin N, et al. ABCB1 1199G>A Genetic Polymorphism (Rs2229109) Influences the Intracellular Accumulation of Tacrolimus in HEK293 and K562 Recombinant Cell Lines. *PLoS One* 2014;9(3):e91555.

Dimatteo C, D'Andrea G, Vecchione G, et al. Pharmacogenetics of dabigatran etexilate interindividual variability. *Thromb Res* 2016;144:1-5.

- Ding R, Tayrouz Y, Riedel KD, et al. Substantial pharmacokinetic interaction between digoxin and ritonavir in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76(1):73-84.
- Dittmer A, Dittmer J. β -Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* 2006;27(14):2844-5.
- Doering W. Quinidine-digoxin interaction: Pharmacokinetics, underlying mechanism and clinical implications. *N Engl J Med* 1979;301(8):400-4.
- Doran A, Obach RS, Smith BJ, et al. The Impact of P-Glycoprotein on the Disposition of Drugs Targeted for Indications of the Central Nervous System: Evaluation Using the Mdr1a/1b Knockout Mouse Model. *Drug Metab Dispos* 2004;33(1):165-74.
- Doyle L, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003;22(47):7340-58.
- Dukes JD, Whitley P, Chalmers AD. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol* 2011;12(1):43.
- Eikelboom JW, Weitz JI. New Anticoagulants. *Circulation* 2010;121(13):1523-32.
- Elsby R, Smith V, Fox L, et al. Validation of membrane vesicle-based breast cancer resistance protein and multidrug resistance protein 2 assays to assess drug transport and the potential for drug-drug interaction to support regulatory submissions. *Xenobiotica* 2011;41(9):764-83.
- El-Sheikh AAK, van den Heuvel JJMW, Koenderink JB, et al. Interaction of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs with Multidrug Resistance Protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-Mediated Methotrexate Transport. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320(1):229-35.
- Emami Riedmaier A, Nies AT, Schaeffeler E, et al. Organic Anion Transporters and Their Implications in Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2012;64(3):421-49.
- Endter S, Francombe D, Ehrhardt C, et al. RT-PCR analysis of ABC, SLC and SLCO drug transporters in human lung epithelial cell models. *J Pharm Pharmacol* 2009;61(5):583-91.
- Englund G, Rorsman F, Rönnblom A, et al. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 2006;29(3-4):269-77.
- Erdman AR, Mangravite LM, Urban TJ, et al. The human organic anion transporter 3 (OAT3; SLC22A8): genetic variation and functional genomics. *Am J Physiol-Ren Physiol* 2006;290(4):905-12.
- Escaffit F, Perreault N, Jean D, et al. Repressed E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance. *Exp Cell Res* 2005;302(2):206-20.

European Medicines Agency. Eliquis - Summary of product characteristics (Consulté le 3 juillet 2019) Disponible: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/eliquis>

European Medicines Agency. Lixiana - Summary of product characteristics (Consulté le 3 juillet 2019) Disponible: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lixiana>

European Medicines Agency. Pradaxa - Summary of product characteristics (Consulté le 3 juillet 2019) Disponible: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/pradaxa>

European Medicines Agency. Xarelto - Summary of product characteristics (Consulté le 3 juillet 2019) Disponible: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xarelto>

Fahrmayr C, Fromm MF, König J. Hepatic OATP and OCT uptake transporters: their role for drug-drug interactions and pharmacogenetic aspects. *Drug Metab Rev* 2010;42(3):380–401.

Fenner KS, Troutman MD, Kempshall S, et al. Drug–drug interactions mediated through P-glycoprotein: clinical relevance and in vitro–in vivo correlation using digoxin as a probe drug. *Clin Pharmacol Ther* 2009;85(2):173-81.

Flanagan SD, Cummins CL, Susanto M, et al. Comparison of Furosemide and Vinblastine Secretion from Cell Lines Overexpressing Multidrug Resistance Protein (P-Glycoprotein) and Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP1 and MRP2). *Pharmacology* 2002;64(3):126–34.

Food and Drug Administration. Guidance for Industry – Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, 2012.

Food and Drug Administration. Guidance for Industry – In vitro Metabolism- and Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction Studies, 2017.

Frost CE, Byon W, Song Y, et al. Effect of ketoconazole and diltiazem on the pharmacokinetics of apixaban, an oral direct factor Xa inhibitor: Effect of CYP3A4 inhibitors on apixaban pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol* 2015;79(5):838–46.

Fujita T, Brown C, Carlson EJ, et al. Functional analysis of polymorphisms in the organic anion transporter, SLC22A6 (OAT1): *Pharmacogenet Genomics* 2005;15(4):201–9.

Fuksa L, Brackova E, Kolouchova G, et al. Dexamethasone reduces methotrexate biliary elimination and potentiates its hepatotoxicity in rats. *Toxicology* 2010;267(1-3):165-71.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, et al. Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *J Cell Biol* 1998;141(7):1539–50.

Furuse M, Furuse K, Sasaki H, et al. Conversion of *Zonulae Occludentes* from Tight to Leaky Strand Type by Introducing Claudin-2 into Madin-Darby Canine Kidney I Cells. *J Cell Biol* 2001;153(2):263–72.

Gabriel L, Delavenne X, Bedouch P, et al. Risk of direct oral anticoagulant bioaccumulation in patients with pulmonary hypertension. *Respiration* 2016;91(4):307-15.

Galgani A, Palleria C, Iannone LF, et al. Pharmacokinetic Interactions of Clinical Interest Between Direct Oral Anticoagulants and Antiepileptic Drugs. *Front Neurol* 2018;9:1067.

Gallien S, Duriez E, Crone C, et al. Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol Cell Proteomics* 2012;11(12):1709–23.

Gan SD, Patel KR. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Invest Dermatol* 2013;133(9):1–3.

Ganga Senarathna SMDK, Crowe A. The influence of passage number for Caco2 cell models when evaluating P-gp mediated drug transport. *Pharmazie* 2015;70(12):798-803.

Gerber SA, Rush J, Stemman O, et al. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(12):6940–5.

Gershoni JM, Palade GE. Protein blotting: Principles and applications. *Anal Biochem* 1983;131(1):1–15.

Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:215–36.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6(10):995–1001.

Glaeser H, Fromm MF. Animal models and intestinal drug transport. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4(4):347–61.

Glavinas H, Méhn D, Jani M, et al. Utilization of membrane vesicle preparations to study drug–ABC transporter interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4(6):721–32.

Gnoth MJ, Buethorn U, Muenster U, et al. In vitro and In Vivo P-Glycoprotein Transport Characteristics of Rivaroxaban. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;338(1):372–80.

Goh L-B, Spears KJ, Yao D, et al. Endogenous drug transporters in in vitro and in vivo models for the prediction of drug disposition in man. *Biochem Pharmacol* 2002;64(11):1569–78.

Gómez-Outes A, Suárez-Gea ML, Lecumberri R, et al. Direct-acting oral anticoagulants: pharmacology, indications, management, and future perspectives. *Eur J Haematol* 2015;95:389–404.

- Gomez-Zepeda D, Taghi M, Smirnova M, et al. LC–MS/MS-based quantification of efflux transporter proteins at the BBB. *J Pharm Biomed Anal* 2019;164:496–508.
- Gong IY, Mansell SE, Kim RB. Absence of both MDR1 (ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Transporters Significantly Alters Rivaroxaban Disposition and Central Nervous System Entry. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2013;112:164–70.
- Goriacko P, Veltri KT. Safety of direct oral anticoagulants vs warfarin in patients with chronic liver disease and atrial fibrillation. *Eur J Haematol* 2018;100(5):488-93.
- Gouin-Thibault I, Delavenne X, Blanchard A, et al. Interindividual variability in dabigatran and rivaroxaban exposure: contribution of ABCB 1 genetic polymorphisms and interaction with clarithromycin. *J Thromb Haemost* 2017;15(2):273-83.
- Goutelle S, Maurin M, Rougier F, et al. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam Clin Pharmacol* 2008;22(6):633-48.
- Granvogl B, Plösch M, Eichacker LA. Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2007;389(4):991-1002.
- Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, et al. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* 1999;104(2):147-53.
- Gröer C, Brück S, Lai Y, et al. LC–MS/MS-based quantification of clinically relevant intestinal uptake and efflux transporter proteins. *J Pharm Biomed Anal* 2013;85:253–61.
- Groneberg DA, Nickolaus M, Springer J, et al. Localization of the Peptide Transporter PEPT2 in the Lung. *Am J Pathol* 2001;158(2):707–14.
- Gschwind L, Rollason V, Daali Y, et al. Role of P-glycoprotein in the uptake/efflux transport of oral vitamin K antagonists and rivaroxaban through the Caco-2 cell model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2013;113(4):259-65.
- Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, et al. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 2007;168(1):66-73.
- Gundry RL, White MY, Murray CI, et al. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr Protoc Mol Biol* 2010;90(1):10-25.
- Gutmann H, Fricker G, Török M, et al. Evidence for Different ABC-Transporters in Caco-2 Cells Modulating Drug Uptake. *Pharm Res* 1999;16(3):402–7.

- Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflug Arch Eur J Physiol* 2004;447(5):653–65.
- Hamman MA, Bruce MA, Haehner-Daniels BD, et al. The effect of rifampin administration on the disposition of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69(3):114-21.
- Hämmerle SP, Rothen-Rutishauser B, Krämer SD, et al. P-Glycoprotein in cell cultures: a combined approach to study expression, localisation, and functionality in the confocal microscope. *Eur J Pharm Sci* 2000;12(1):69-77.
- Hartmann G, Kim H, Piquette-Miller M. Regulation of the hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory cytokines in mice. *Int Immunopharmacol* 2001;1(2):189-99.
- Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778(3):660–9.
- Härtter S, Koenen-Bergmann M, Sharma A, et al. Decrease in the oral bioavailability of dabigatran etexilate after co-medication with rifampicin. *Br J Clin Pharmacol* 2012;74(3):490–500.
- Härtter S, Sennewald R, Nehmiz G, et al. Oral bioavailability of dabigatran etexilate (Pradaxa®) after co-medication with verapamil in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2013;75(4):1053–62.
- Hediger MA, Cléménçon B, Burrier RE, et al. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Mol Aspects Med* 2013;34(2–3):95–107.
- Hedman M, Neuvonen PJ, Neuvonen M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin in pediatric and adolescent cardiac transplant recipients on a regimen of triple immunosuppression. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75(1):101–9.
- Hemauer SJ, Patrikeeva SL, Nanovskaya TN, et al. Opiates inhibit paclitaxel uptake by P-glycoprotein in preparations of human placental inside-out vesicles. *Biochem Pharmacol* 2010;78(9):1272–8.
- Hodin S, Basset T, Jacqueroux E, et al. In vitro Comparison of the Role of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein on Direct Oral Anticoagulants Disposition. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2018;43:183-91.
- Hoffmeyer S, Burk O, Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97(7):3473–8.

Hu A, Noble WS, Wolf-Yadlin A. Technical advances in proteomics: new developments in data-independent acquisition. *F1000Research* 2006;5(F1000 Faculty Rev):419.

Hue-Roye K, Vege S. Principles of PCR-based assays. *Immunohematology* 2008;24(4):170–175.

Hull RN, Cherry WR, Weaver GW. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK1. *In vitro* 1976;12(10):670–7.

Huls M, Brown CDA, Windass AS, et al. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney Int* 2008;73(2):220–5.

Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 2004;351:1425–36.

Ieiri I. Functional Significance of Genetic Polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab Pharmacokinet* 2012;27(1):85–105.

Imai Y, Nakane M, Kage K, et al. C421A Polymorphism in the Human Breast Cancer Resistance Protein Gene Is Associated with Low Expression of Q141K Protein and Low-Level Drug Resistance. *Mol Cancer Ther* 2002;1(8):611-16.

Inai T, Kobayashi J, Shibata Y. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol* 1999;78(12):849–55.

Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, et al. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *J Pharm Sci* 1999;88(1):28–33.

Ishiguro N, Kishimoto W, Volz A, et al. Impact of Endogenous Esterase Activity on In vitro P-Glycoprotein Profiling of Dabigatran Etxilate in Caco-2 Monolayers. *Drug Metab Dispos* 2013;42(2):250–6.

Ito S, Kusuhara H, Yokochi M, et al. Competitive Inhibition of the Luminal Efflux by Multidrug and Toxin Extrusions, but Not Basolateral Uptake by Organic Cation Transporter 2, Is the Likely Mechanism Underlying the Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions Caused by Cimetidine in the Kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;340(2):393–403.

Jemnitz K, Veres Z, Tugyi R, et al. Biliary efflux transporters involved in the clearance of rosvastatin in sandwich culture of primary rat hepatocytes. *Toxicol In vitro* 2010;24(2):605–10.

Jeong DE, Lee Y, Lee SJV. Western Blot Analysis of *C. elegans* Proteins. In: *Hypoxia, Humana Press, New York, 2018, 213-225.*

- Jiang ZP, Wang YR, Xu P, et al. Meta-analysis of the effect of MDR1 C3435T polymorphism on cyclosporine pharmacokinetics. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;103(5):433-44.
- Johnson, B. M., Zhang, P., Schuetz, J. D., et al. Characterization of transport protein expression in multidrug resistance-associated protein (Mrp) 2-deficient rats. *Drug Metab Dispos* 2006;34(4):556-62.
- Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, et al. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99(24):15649-54.
- Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455(1):152-62.
- Kajiwara M, Terada T, Ogasawara K, et al. Identification of multidrug and toxin extrusion (MATE1 and MATE2-K) variants with complete loss of transport activity. *J Hum Genet* 2009;54(1):40-6.
- Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 2009;158(3):693-705.
- Kanebratt KP, Andersson TB. Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos* 2008;36(7):1444-52.
- Kanuri SH, Kreutz RP. Pharmacogenomics of Novel Direct Oral Anticoagulants: Newly Identified Genes and Genetic Variants. *J Pers Med* 2019;9(1):7.
- Karas M, Bachmann D, Bahr U, et al. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 1987;78:53-68.
- Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2000;35(7):804-17.
- Keskitalo JE, Zolk O, Fromm MF, et al. ABCG2 Polymorphism Markedly Affects the Pharmacokinetics of Atorvastatin and Rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86(2):197-203.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70(2):189-99.
- Kim WJ, Lee JH, Yi J, et al. A nonsynonymous variation in MRP2/ABCC2 is associated with neurological adverse drug reactions of carbamazepine in patients with epilepsy. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20(4):249.
- Kim M, Son H, Noh K, et al. Effects of Verapamil and Diltiazem on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Rivaroxaban. *Pharmaceutics* 2019;11(3):133-42.

- Kimura N, Okuda M, Inui K. Metformin Transport by Renal Basolateral Organic Cation Transporter hOCT2. *Pharm Res* 2005;22(2):255–9.
- Kivistö KT, Niemi M, Fromm MF. Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18(6):621–6.
- Klein I, Sarkadi B, Váradi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1999;1461(2):237–62.
- Koch S, Nusrat A. Dynamic Regulation of Epithelial Cell Fate and Barrier Function by Intercellular Junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165(1):220–7
- Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharm Res* 2007;24(7):1227–51.
- König J, Müller F, Fromm MF. Transporters and Drug-Drug Interactions: Important Determinants of Drug Disposition and Effects. *Pharmacol Rev* 2013;65(3):944–66.
- Kruijtzter CMF, Beijnen JH, Rosing H, et al. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J Clin Oncol* 2002;20(13):2943–50.
- Kryukov AV, Sychev DA, Andreev DA, et al. Influence of ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms on pharmacokinetics of apixaban in patients with atrial fibrillation and acute stroke. *Pharmgenomics Pers Med* 2018;11:43–9.
- Kubitza D, Becka M, Mueck W, et al. Effects of renal impairment on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of rivaroxaban, an oral, direct Factor Xa inhibitor. *Br J Clin Pharmacol* 2010;70(5): 703–12.
- Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, et al. Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72(2):209–19.
- Kurien B, Scofield R. Western blotting. *Methods* 2006;38(4):283–93.
- Kusuhara H, Ito S, Kumagai Y, et al. Effects of a MATE Protein Inhibitor, Pyrimethamine, on the Renal Elimination of Metformin at Oral Microdose and at Therapeutic Dose in Healthy Subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(6):837–44.
- Kuteykin-Teplyakov K, Luna-Tortós C, Ambroziak K, et al. Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport: Transfection alters expression of endogenous Mdr1. *Br J Pharmacol* 2010;160(6):1453–63.

Lacarelle B, Rahmani R, De Sousa G, et al. Metabolism of digoxin, digoxigenin digitoxosides and digoxigenin in human hepatocytes and liver microsomes. *Fundam Clin Pharmacol* 1991;5(7):567-82.

Lacombe O, Woodley J, Solleux C, et al. Localisation of drug permeability along the rat small intestine, using markers of the paracellular, transcellular and some transporter routes. *Eur J Pharm Sci* 2004;23(4-5):385-91.

Lakatos B, Stoeckle M, Elzi L, et al. Gastrointestinal bleeding associated with rivaroxaban administration in a treated patient infected with human immunodeficiency virus. *Swiss medical weekly* 2014;144(0304).

Lang D, Freudenberger C, Weinz C. In vitro Metabolism of Rivaroxaban, an Oral, Direct Factor Xa Inhibitor, in Liver Microsomes and Hepatocytes of Rats, Dogs, and Humans. *Drug Metab Dispos* 2009;37(5):1046-55.

Lau YY, Huang Y, Frassetto L, et al. Effect of OATP1B Transporter Inhibition on the Pharmacokinetics of Atorvastatin in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81(2):194-204.

Le Guellec C, Benz I. Rôle des transporteurs dans l'élimination des médicaments et leurs effets indésirables. *La Lettre du pharmacologue* 2011;25(4):130-7.

Le Vee M, Jigorel E, Glaise D, et al. Functional expression of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporters in the differentiated human hepatoma HepaRG cell line. *Eur J Pharm Sci* 2006;28(1-2):109-17.

Le Vee M, Noel G, Jouan E, et al. Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol in vitro* 2013;27(6):1979-86.

Lennernäs H, Palm K, Fagerholm U, et al. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int J Pharm* 1996;127(1):103-7.

León IR, Schwämmle V, Jensen ON, et al. Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(10):2992-3005.

Lévesque E, Benoit-Biancamano MO, Delage R, et al. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil and its glucuronide metabolites in healthy volunteers. *Pharmacogenomics* 2008;9(7):869-79.

Li N, Nemirovskiy OV, Zhang Y, et al. Absolute quantification of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2) using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2008;380(2):211-22.

Lin L, Yee SW, Kim RB, et al. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14(8):543–60.

Lipschutz JH, Li S, Arisco A, et al. Extracellular Signal-regulated Kinases 1/2 Control Claudin-2 Expression in Madin-Darby Canine Kidney Strain I and II Cells. *J Biol Chem* 2005;280(5):3780–8.

Liu W, Liang R, Ramamoorthy S, et al. Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim Biophys Acta* 1995;1235(2):461–6.

Liu Z, Gurlo T, von Grafenstein H. Cell-ELISA using β -galactosidase conjugated antibodies. *J Immunol Methods* 2000;234(1):153–67.

Loo SY, Dell’Aniello S, Huiart L, et al. Trends in the prescription of novel oral anticoagulants in UK primary care: Novel oral anticoagulant prescription trends. *Br J Clin Pharmacol* 2017;83:2096–106.

Luo FR, Paranjpe PV, Guo A, et al. Intestinal transport of irinotecan in Caco-2 cells and MDCK II cells overexpressing efflux transporters Pgp, cMOAT, and MRP1. *Drug Metab Dispos* 2002;30(7):763-70.

Maliapaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, et al. Subcellular Localization and Distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues. *Cancer Res* 2001;61(8):3458-64.

Manolaridis I, Jackson SM, Taylor NM, et al. Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states. *Nature* 2018;563(7731):426.

Mao Q, Unadkat JD. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *AAPS J* 2015;17(1):65–82.

Margelidon-Cozzolino V, Hodin S, Jacqueroux E, et al. In vitro assessment of pharmacokinetic drug-drug interactions of direct oral anticoagulants: type 5-phosphodiesterase inhibitors are inhibitors of rivaroxaban and apixaban efflux by P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* 2018;365:519-25.

Masuda S, Terada T, Yonezawa A, et al. Identification and Functional Characterization of a New Human Kidney-Specific H⁺/Organic Cation Antiporter, Kidney-Specific Multidrug and Toxin Extrusion 2. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(8):2127–35.

Mathias NR, Timoszyk J, Stetsko PI, et al. Permeability Characteristics of Calu-3 Human Bronchial Epithelial Cells: In vitro - In Vivo Correlation to Predict Lung Absorption in Rats. *J Drug Target* 2002;10(1):31–40.

Maubon N, Le Vee M, Fossati L, et al. Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundam Clin Pharmacol* 2007;21(6):659–63.

Mekaj YH, Mekaj AY, Duci SB, et al. New oral anticoagulants: their advantages and disadvantages compared with vitamin K antagonists in the prevention and treatment of patients with thromboembolic events. *Ther Clin Risk Manag* 2015;11:967-77.

Mendell J, Zahir H, Matsushima N, et al. Drug-Drug Interaction Studies of Cardiovascular Drugs Involving P-Glycoprotein, an Efflux Transporter, on the Pharmacokinetics of Edoxaban, an Oral Factor Xa Inhibitor. *Am J Cardiovasc Drugs* 2013;13(5):331–42.

Mendell J, Chen S, He L, et al. The Effect of Rifampin on the Pharmacokinetics of Edoxaban in Healthy Adults. *Clin Drug Investig* 2015;35(7):447–53.

Mercier C, Hodin S, He Z, et al. Pharmacological Characterization of the RPMI 2650 Model as a Relevant Tool for Assessing the Permeability of Intranasal Drugs. *Mol Pharm* 2018;15(6):2246–56.

Mercier C, Jacqueroix E, He Z, et al. Pharmacological characterization of the 3D MucilAir™ nasal model. *Eur J Pharm Biopharm* 2019;139:186–96.

Mikkaichi T, Yoshigae Y, Masumoto H, et al. Edoxaban Transport via P-Glycoprotein Is a Key Factor for the Drug's Disposition. *Drug Metab Dispos* 2014;42(4):520–8.

Miller PE, Denton MB. The quadrupole mass filter: basic operating concepts. *J Chem Educ* 1986;63(7):617.

Minematsu T, Giacomini KM. Interactions of Tyrosine Kinase Inhibitors with Organic Cation Transporters and Multidrug and Toxic Compound Extrusion Proteins. *Mol Cancer Ther* 2011;10(3):531–9.

Mitomo H, Kato R, Ito A, et al. A functional study on polymorphism of the ATP-binding cassette transporter ABCG2: critical role of arginine-482 in methotrexate transport. *Biochem J* 2003;373(3):767–74.

Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, et al. Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;419(2):238–43.

Mosaffa F, Kalalinia F, Lage H, et al. Pro-inflammatory cytokines interleukin-1 beta, interleukin 6, and tumor necrosis factor-alpha alter the expression and function of ABCG2 in cervix and gastric cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2012;363(1-2):385-93.

Motohashi H, Katsura T, Saito H, et al. Effects of Tacrolimus and Cyclosporin A on Peptide Transporter PEPT1 in Caco-2 Cells. *Pharm Res* 2001;18(5):713–7.

Mozdzanowski J, Hembach P, Speicher DW. High yield electroblotting onto polyvinylidene difluoride membranes from polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1992;13(1):59-64.

Mueck W, Kubitzka D, Becka M. Co-administration of rivaroxaban with drugs that share its elimination pathways: pharmacokinetic effects in healthy subjects: Drug interactions with rivaroxaban. *Br J Clin Pharmacol* 2013;76(3):455–66.

Müller J, Lips KS, Metzner L, et al. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem Pharmacol* 2005;70(12):1851-60.

Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, et al. A new blood–brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 2009;54(3–4):253–63.

Nakagomi-Hagihara R, Nakai D, Tokui T. Inhibition of human organic anion transporter 3 mediated pravastatin transport by gemfibrozil and the metabolites in humans. *Xenobiotica* 2007;37(4):416–26.

Nakamura Y, Oka M, Soda H, et al. Gefitinib (“Iressa”, ZD1839), an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Reverses Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2–Mediated Drug Resistance. *Cancer Res* 2005;65(4):1541–6.

Nakamura K, Hirayama-Kurogi M, Ito S, et al. Large-scale multiplex absolute protein quantification of drug-metabolizing enzymes and transporters in human intestine, liver, and kidney microsomes by SWATH-MS: Comparison with MRM/SRM and HR-MRM/PRM. *Proteomics* 2016;16(15–16):2106–17.

Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, et al. Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 2011;11(4):535–53.

Nielsen R, Birn H, Moestrup SK, et al. Characterization of a kidney proximal tubule cell line, LLC-PK1, expressing endocytotic active megalin. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(10):1767–76.

Nies AT, Koepsell H, Winter S, et al. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* 2009;50(4):1227–40.

Nies AT, Koepsell H, Damme K, et al. Organic Cation Transporters (OCTs, MATEs), In vitro and In Vivo Evidence for the Importance in Drug Therapy. In: *Drug Transporters*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011,105-167.

Niessen CM. Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *J Invest Dermatol* 2007;127(11):2525–32.

Nigam SK, Bush KT, Martovetsky G, et al. The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective. *Physiol Rev* 2015;95(1):83–123.

Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human ATP-binding Cassette and Solute Carrier Transporter Superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20(6):452-77.

Nishizato Y. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: Consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73(6):554–65.

Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, et al. Simultaneous Absolute Protein Quantification of Transporters, Cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases as a Novel Approach for the Characterization of Individual Human Liver: Comparison with mRNA Levels and Activities. *Drug Metab Dispos* 2012;40(1):83–92.

Ohtsuki S, Ikeda C, Uchida Y, et al. Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood–brain barrier model. *Mol Pharm* 2012;10(1):289-96.

Ölander M, Wiśniewski JR, Matsson P, et al. The Proteome of Filter-Grown Caco-2 Cells With a Focus on Proteins Involved in Drug Disposition. *J Pharm Sci* 2016;105(2):817–27.

Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002;1(5):376–86.

Ong S-E, Mann M. Mass spectrometry–based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol* 2005;1(5):252–62.

Oswald S, Terhaag B, Siegmund W. In vivo probes of drug transport: commonly used probe drugs to assess function of intestinal P-glycoprotein (ABCB1) in humans. *Handb Exp Pharmacol* 2011;201:403-47.

Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, et al. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(50):17923–8.

Özvegy C, Litman T, Szakács G, et al. Functional Characterization of the Human Multidrug Transporter, ABCG2, Expressed in Insect Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285(1):111–7.

Pal A, Mehn D, Molnar E, et al. Cholesterol Potentiates ABCG2 Activity in a Heterologous Expression System: Improved in vitro Model to Study Function of Human ABCG2. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321(3):1085–94.

Pan Y, Hsu V, Grimstein M, et al. The application of physiologically based pharmacokinetic modeling to predict the role of drug transporters: scientific and regulatory perspectives. *J Clin Pharmacol* 2016;56:S122-31.

- Parasrampur DA, Mendell J, Shi M, et al. Edoxaban drug-drug interactions with ketoconazole, erythromycin, and cyclosporine: Edoxaban drug interactions with ketoconazole, erythromycin, and cyclosporine. *Br J Clin Pharmacol* 2016;82(6):1591–600.
- Paré G, Eriksson N, Lehr T, et al. Genetic determinants of dabigatran plasma levels and their relation to bleeding. *Circulation* 2013;127(13):1404-12.
- Pauli-Magnus C, von Richter O, Burk O, et al. Characterization of the major metabolites of verapamil as substrates and inhibitors of P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293(2):376-82.
- Peng KC, Cluzeaud F, Bens M, et al. Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. *J Histochem Cytochem* 1999 47(6):757-67.
- Penzak SR, Shen JM, Alfaro RM, et al. Ritonavir decreases the nonrenal clearance of digoxin in healthy volunteers with known MDR1 genotypes. *Ther Drug Monit* 2004;26(3):322-30.
- Perez-Moreno M, Fuchs E. Catenins: Keeping Cells from Getting Their Signals Crossed. *Dev Cell* 2006;11(5):601–12.
- Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, et al. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939-an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J Thromb Haemost* 2005;3(3):514–21.
- Poller B, Drewe J, Krähenbühl S, et al. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-Glycoprotein (ABCB1) by Cytokines in a Model of the Human Blood–Brain Barrier. *Cell Mol Neurobiol* 2010;30(1):63–70.
- Prasad B, Johnson K, Billington S, et al. Abundance of Drug Transporters in the Human Kidney Cortex as Quantified by Quantitative Targeted Proteomics. *Drug Metab Dispos* 2016;44(12):1920–4.
- Prozialeck WC, Edwards JR, Lamar PC, et al. Epithelial barrier characteristics and expression of cell adhesion molecules in proximal tubule-derived cell lines commonly used for in vitro toxicity studies. *Toxicol In vitro* 2006;20(6):942–53.
- Puech C, Hodin S, Forest V, et al. Assessment of HBEC-5i endothelial cell line cultivated in astrocyte conditioned medium as a human blood-brain barrier model for ABC drug transport studies. *Int J Pharm* 2018;551(1–2):281–9.
- Raghavan N, Frost CE, Yu Z, et al. Apixaban Metabolism and Pharmacokinetics after Oral Administration to Humans. *Drug Metab Dispos* 2009;37(1):74–81.

Rau T, Erney B, Gores R, et al. High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80(5):468–76.

Résumé des caractéristiques du produit – Coumadine. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (Consulté le 8 septembre 2019). Disponible : <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0192712.htm>

Résumé des caractéristiques du produit – Previscan. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (Consulté le 8 septembre 2019). Disponible : <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0214873.htm>

Résumé des caractéristiques du produit – Sintrom. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (Consulté le 8 septembre 2019). Disponible : <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0192847.htm>

Rickert V, Haefeli WE, Weiss J. Pharmacokinetic interaction profile of riociguat, a new soluble guanylate cyclase stimulator, in vitro. *Pulm Pharmacol Ther* 2014;28:130–7.

Robinson K, Johnston A, Walker S, et al. The digoxin-amiodarone interaction. *Cardiovasc Drugs Ther* 1989;3(1):25-8.

Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 2010;401(2):318–20.

Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004;3(12):1154–69.

Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 2012;165(5):1260–87.

Rubio-Aliaga I, Daniel H. Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition. *Xenobiotica* 2008;38(7–8):1022–42.

Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, et al. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Re.* 2001;18(10):1400–4.

Sarmiento B, Andrade F, Silva SB, et al. Cell-based *in vitro* models for predicting drug permeability. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012;8(5):607–21.

Saurin W, Hofnung M, Dassa E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* 1999;48:22-41.

Schaefer O, Ohtsuki S, Kawakami H, et al. Absolute quantification and differential expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes, and UDP-glucuronosyltransferases in cultured primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2012;40(1):93-103.

Scheer N, Balimane P, Hayward MD, et al. Generation and Characterization of a Novel Multidrug Resistance Protein 2 Humanized Mouse Line. *Drug Metab Dispos* 2012;40(11):2212–8.

Scheer N, Wolf CR. Genetically humanized mouse models of drug metabolizing enzymes and transporters and their applications. *Xenobiotica* 2014;44(2):96–108.

Schinkel AH, Smit JJM, van Tellingen O, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994;77(4):491–502.

Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(1):3–29.

Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 2005;5(1):4–15.

Schwabedissen HEM, Kroemer HK. In vitro and in vivo evidence for the importance of breast cancer resistance protein transporters (BCRP/MXR/ABCP/ABCG2). In: *Drug Transporters*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011, 325-371.

Scigelova M, Makarov A. Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics. *Proteomics* 2006;6(S2):16–21.

Sennesael AL, Panin N, Vancraeynest C, et al. Effect of ABCB1 genetic polymorphisms on the transport of rivaroxaban in HEK293 recombinant cell lines. *Sci Rep* 2018;8(1):10514.

Sharom FJ, Yu X, Lu P, et al. Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells. *Biochem Pharmacol* 1999;58(4):571–86.

Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008;9(1):105–27.

Shen H, Yao M, Sinz M, et al. Renal Excretion of Dabigatran: The Potential Role of Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) Proteins. *Mol Pharmaceutics* 2019

Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight Junctions and Cell Polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22(1):207–35.

Shirakawa K, Takara K, Tanigawara Y, et al. Interaction of docetaxel (“Taxotere”) with human P-glycoprotein. *Jpn J Cancer Res* 1999;90(12):1380-6.

Shirasaka Y, Onishi Y, Sakurai A, et al. Evaluation of Human P-Glycoprotein (MDR1/ABCB1) ATPase Activity Assay Method by Comparing with in vitro Transport Measurements: Michaelis–Menten Kinetic Analysis to Estimate the Affinity of P-Glycoprotein to Drugs. *Biol Pharm Bull* 2006;29(12):2465–71.

Shirasaka Y, Sakane T, Yamashita S. Effect of P-glycoprotein expression levels on the concentration-dependent permeability of drugs to the cell membrane. *J Pharm Sci*, 2008;97(1):553-65.

Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci* 2006;27(5):425-46.

Shu Y, Sheardown SA, Brown C, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* 2007;117(5):1422-31.

Shugarts S, Benet LZ. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharm Res* 2009;26(9):2039-54.

Simonson S, Raza A, Martin PD, et al. Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76(2):167–77.

Sparreboom A, Loos WJ, Burger H, et al. Effect of ABCG2 genotype on the oral bioavailability of topotecan. *Cancer Biol Ther* 2005;4(6):650–3.

Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, et al. TEER Measurement Techniques for In vitro Barrier Model Systems. *J Lab Autom* 2015;20(2):107–26.

Stangier J, Stähle H, Rathgen K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dabigatran etexilate, an oral direct thrombin inhibitor, are not affected by moderate hepatic impairment. *J Clin Pharmacol* 2008;48(12):1411-9.

Stangier J, Clemens A. Pharmacology, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Dabigatran Etexilate, an Oral Direct Thrombin Inhibitor. *Clin Appl Thromb* 2009;15:9S-16S.

Stangier J, Rathgen K, Stähle H, et al. Influence of renal impairment on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral dabigatran etexilate. *Clin Pharmacokinet* 2010;49(4):259-68.

Staud F, Pavek P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(4):720–5.

Steck TL, Weinstein RS, Straus JH, et al. Inside-Out Red Cell Membrane Vesicles: Preparation and Purification. *Science* 1970;168(3928):255–7.

Steuber TD, Howard ML, Nisly SA. Direct Oral Anticoagulants in Chronic Liver Disease. *Ann Pharmacother* 2019;53(10):1042-9.

Strupat K, Karas M, Hillenkamp F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 1991;111:89–102.

Sun H, Chow EC, Liu S, et al. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4(4):395-411.

Sychev DA, Levanov AN, Shelekhova TV, et al. The impact of ABCB1 (rs1045642 and rs4148738) and CES1 (rs2244613) gene polymorphisms on dabigatran equilibrium peak concentration in patients after total knee arthroplasty. *Pharmgenomics Pers Med* 2018;11:127-37.

Syed SB, Arya H, Fu IH, et al. Targeting P-glycoprotein: Investigation of piperine analogs for overcoming drug resistance in cancer. *Scientific reports* 2017;7(1):7972.

Takada T, Suzuki H, Sugiyama Y. Characterization of Polarized Expression of Point- or Deletion-Mutated Human BCRP/ABCG2 in LLC-PK1 Cells. *Pharm Res* 2005;22(3):458–64.

Takano A, Kusuhara H, Suhara T, et al. Evaluation of in vivo P-glycoprotein function at the blood–brain barrier among MDR1 gene polymorphisms by using 11C-verapamil. *J Nucl Med* 2006;47(9):1427-33.

Tanaka H, Matsumoto K, Ueno K, et al. Effect of Clarithromycin on Steady-State Digoxin Concentrations. *Ann Pharmacother* 2003;37(2):178–81.

Tanigawara Y, Okamura N, Hirai M, et al. Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263(2):840–5.

Taub ME, Mease K, Sane RS, et al. Digoxin Is Not a Substrate for Organic Anion-Transporting Polypeptide Transporters OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, and OATP2B1 but Is a Substrate for a Sodium-Dependent Transporter Expressed in HEK293 Cells. *Drug Metab Dispos* 2011;39(11):2093–102.

Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, et al. A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Mol Biotechnol* 2013;55(3):217–26.

Terlouw SA, Masereeuw R, van den Broek PHH, et al. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in glutathione-bimane efflux from Caco-2 and rat renal proximal tubule cells. *Br J Pharmacol* 2001;134(5):931–8.

Terwogt JMM, Beijnen JH, ten Bokkel Huinink WW, et al. Co-administration of cyclosporin enables oral therapy with paclitaxel. *Lancet* 1998;352(9124):285.

Testa S, Dellanoce C, Paoletti O, et al. Edoxaban plasma levels in patients with non-valvular atrial fibrillation: Inter and intra-individual variability, correlation with coagulation screening test and renal function. *Thromb Res* 2019;175:61-7.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84(21):7735–8.

Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005;51(3):187–200.

Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, et al. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal Chem* 2003;75(8):1895–904.

Treiber A, Schneider R, Hausler S, et al. Bosentan Is a Substrate of Human OATP1B1 and OATP1B3: Inhibition of Hepatic Uptake as the Common Mechanism of Its Interactions with Cyclosporin A, Rifampicin, and Sildenafil. *Drug Metab Dispos* 2007;35(8):1400–7.

Tracy TS, Chaudhry AS, Prasad B, et al. Interindividual Variability in Cytochrome P450–Mediated Drug Metabolism. *Drug Metab Dispos* 2016;44(3):343–351.

Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, et al. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood–brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* 2011;117(2):333–45.

Uchida Y, Ohtsuki S, Kamiie J, et al. Quantitative targeted absolute proteomics for 28 human transporters in plasma membrane of Caco-2 cell monolayer cultured for 2, 3, and 4 weeks. *Drug Metab Pharmacokinet* 2014;30(2):205–8.

Uchida Y, Toyohara T, Ohtsuki S, et al. Quantitative Targeted Absolute Proteomics for 28 Transporters in Brush-Border and Basolateral Membrane Fractions of Rat Kidney. *J Pharm Sci* 2016;105(2):1011–6.

Ueshima S, Hira D, Fujii R, et al. Impact of ABCB1, ABCG2, and CYP3A5 polymorphisms on plasma trough concentrations of apixaban in Japanese patients with atrial fibrillation. *Pharmacogenet Genomics* 2017;27(9):329–36.

Vakkalagadda B, Frost C, Byon W, et al. Effect of Rifampin on the Pharmacokinetics of Apixaban, an Oral Direct Inhibitor of Factor Xa. *Am J Cardiovasc Drugs* 2016;16(2):119–27.

Vallakati A, Chandra PA, Pednekar M, et al. Dronedarone-induced digoxin toxicity: new drug, new interactions. *Am J Ther* 2013;20(6):717–19.

Van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005;1(2):175–85.

Vandell AG, Lee J, Shi M, et al. An integrated pharmacokinetic/pharmacogenomic analysis of ABCB1 and SLCO1B1 polymorphisms on edoxaban exposure. *Pharmacogenomics J* 2018;18(1):153–9.

Vellonen K-S, Mannermaa E, Turner H, et al. Effluxing ABC transporters in human corneal epithelium. *J Pharm Sci* 2010;99(2):1087–98.

Wagner C, Zhao P, Pan Y, et al. Application of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling to support dose selection: report of an FDA public workshop on PBPK. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2015;4(4):226-30.

Walch A, Rauser S, Deininger SO, et al. MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. *Histochem Cell Biol* 2008;130:421.

Wang Z-J, Yin OQP, Tomlinson B, et al. OCT2 polymorphisms and in-vivo renal functional consequence: studies with metformin and cimetidine. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18(7):637.

Wang L, Zhang D, Raghavan N, et al. In vitro Assessment of Metabolic Drug-Drug Interaction Potential of Apixaban through Cytochrome P450 Phenotyping, Inhibition, and Induction Studies. *Drug Metab Dispos* 2010;38(3):448–58.

Wang L, Prasad B, Salphati L, et al. Interspecies variability in expression of hepatobiliary transporters across human, dog, monkey, and rat as determined by quantitative proteomics. *Drug Metab Dispos* 2015;43(3):367-74.

Wegler C, Gaugaz FZ, Andersson TB, et al. Variability in mass spectrometry-based quantification of clinically relevant drug transporters and drug metabolizing enzymes. *Mol Pharm* 2017;14(9):3142-51.

Weinz C, Schwarz T, Kubitza D, et al. Metabolism and Excretion of Rivaroxaban, an Oral, Direct Factor Xa Inhibitor, in Rats, Dogs, and Humans. *Drug Metab Dispos* 2009;37(5):1056-64.

Weiss F, Hammer HS, Klein K, et al. Direct Quantification of Cytochromes P450 and Drug Transporters—A Rapid, Targeted Mass Spectrometry-Based Immunoassay Panel for Tissues and Cell Culture Lysates. *Drug Metab Dispos* 2018;46(4):387–96.

Welinder C, Ekblad L. Coomassie Staining as Loading Control in Western Blot Analysis. *J Proteome Res* 2011;10(3):1416–9.

Westphal K, Weinbrenner A, Zschiesche M, et al. Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: a new type of drug/drug interaction. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68(4):345-55.

Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, et al. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 2007;7(3):340–50.

Wieser M, Stadler G, Jennings P, et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am J Physiol-Ren Physiol* 2008;295(5):1365–75.

Wilmer MJ, Saleem MA, Masereeuw R, et al. Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters. *Cell Tissue Res* 2010;339(2):449–57.

Xia CQ, Milton MN, Gan LS. Evaluation of drug-transporter interactions using in vitro and in vivo models. *Curr Drug Metab* 2007;8(4):341-63.

Xu J, Liu Y, Yang Y, et al. Characterization of Oligomeric Human Half-ABC Transporter ATP-binding Cassette G2. *J Biol Chem* 2004;279(19):19781–9.

Yamasaki Y, Ieiri I, Kusuhara H, et al. Pharmacogenetic Characterization of Sulfasalazine Disposition Based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) Gene Polymorphisms in Humans. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84(1):95–103.

Yang T, Chen F, Xu F, et al. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry-based targeted proteomics assay for monitoring P-glycoprotein levels in human breast tissue. *Clin Chim Acta* 2014;436:283-89.

Yonezawa A, Inui K. Organic cation transporter OCT/SLC22A and H⁺/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochem Pharmacol* 2011;81(5):563–8.

Yumoto R, Murakami T, Nakamoto Y, et al. Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289(1):149-55.

Zaïr ZM, Eloranta JJ, Stieger B, et al. Pharmacogenetics of OATP (SLC21 / SLCO), OAT and OCT (SLC22) and PEPT (SLC15) transporters in the intestine, liver and kidney. *Pharmacogenomics* 2008;9(5):597–624.

Zamek-Gliszczyński MJ, Xiong H, Patel NJ, et al. Pharmacokinetics of 5 (and 6)-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein and its diacetate promoiety in the liver. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304(2):801-9.

Zanelli U, Caradonna NP, Hallifax D, et al. Comparison of cryopreserved HepaRG cells with cryopreserved human hepatocytes for prediction of clearance for 26 drugs. *Drug Metab Dispos* 2012;40(1):104-10.

Zhang EY. Genetic Polymorphisms in Human Proton-Dependent Dipeptide Transporter PEPT1: Implications for the Functional Role of Pro586. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310(2):437–45.

Zhang Y, Li N, Brown PW, et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry based targeted proteomics quantification of P-glycoprotein in various biological samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011;25(12):1715–24.

Zhang D, He K, Herbst JJ, et al. Characterization of Efflux Transporters Involved in Distribution and Disposition of Apixaban. *Drug Metab Dispos* 2013;41(4):827-35.

Zolk O, Solbach TF, König J, et al. Functional Characterization of the Human Organic Cation Transporter 2 Variant p.270Ala>Ser. *Drug Metab Dispos* 2009;37(6):1312–8.

LISTE DES TRAVAUX

Publication acceptée

Jacqueroux E., Mercier C., Margelidon-Cozzolino V., Hodin S., Bertoletti L., Delavenne X. *In vitro* assessment of P-gp and BCRP transporters-mediated drug-drug interactions of riociguat with direct oral anticoagulants. *Fundam Clin Pharmacol.* 2019 [Epub ahead of print].

Publication en cours de soumission

Jacqueroux E., Hodin S., Saib S., Bin V., He Z., Delézay O., Delavenne X. Value of quantifying ABC transporters by mass spectrometry and impact on *in vitro*-to-*in vivo* prediction of transporter-mediated drug-drug interactions of rivaroxaban. *Eur J Pharm Biopharm.* (soumis)

Publications acceptées, en lien avec ma thèse

Mercier C., Jacqueroux E., He Z., Hodin S., Constant S., Perek N., Boudard D., Delavenne X. Pharmacological characterization of the 3D MucilAir™ nasal model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019,139:186-96.

Margelidon-Cozzolino V., Hodin S., Jacqueroux E., Delézay O., Bertoletti L., Delavenne X. *In vitro* Assessment of Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions of Direct Oral Anticoagulants: Type 5-Phosphodiesterase Inhibitors Are Inhibitors of Rivaroxaban and Apixaban Efflux by P-Glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018,365:519-25.

Hodin S., Basset T., Jacqueroux E., Delézay O., Clotagatide A., Perek N., Mismetti P., Delavenne X. *In vitro* Comparison of the Role of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein on Direct Oral Anticoagulants Disposition. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2018,43:183-91.

Communication orale sélectionnée sur résumé

Jacqueroux E., Hodin S., Mismetti P., Delavenne X. The parallel reaction monitoring-based high resolution mass spectrometry: a new validated method for the quantification of proteins (CO-012 : Juin 2019, 23^{ème} Congrès de la SFPT, Lyon).

Communication affichée sélectionnée sur résumé

Jacqueroux E., Hodin S., Mismetti P., Delavenne X. Comparison of validated Caco-2 and MDCKs *in vitro* cell models for drug transport studies (PM1-056 : 2018, 22^{ème} Congrès de la SFPT, Toulouse) (Prix du poster modéré – session pharmacocinétique)



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb

Research paper

Pharmacological characterization of the 3D MucilAir™ nasal model

Clément Mercier^{a,b,*}, Elodie Jacqueroix^{a,b}, Zhiguo He^{b,c}, Sophie Hodin^{a,b}, Samuel Constant^d, Nathalie Perek^{a,b}, Delphine Boudard^{a,b,e}, Xavier Delavenne^{a,b,f}^a INSERM, U1059, Dysfonction Vasculaire et Hémostase, Saint-Etienne, France^b Université de Lyon, Saint-Etienne F-42023, France^c Laboratoire de biologie, d'ingénierie et d'imagerie de la greffe de cornée, BtiGC, EA2521 Saint-Etienne, France^d Epithelix Sàrl, 14 chemin des aulx, CH-1228 Plan-les-Ouates, Geneva, Switzerland^e UF6725 Cytologie et Histologie Rénale, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France^f Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie Gaz du sang, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

ARTICLE INFO

Keywords:

MucilAir™
In vitro model
Nasal barrier
Drug delivery
ABC transporters
Bidirectional transport

ABSTRACT

The preclinical evaluation of nasally administered drug candidates requires screening studies based on *in vitro* models of the nasal mucosa. The aim of this study was to evaluate the morpho-functional characteristics of the 3D MucilAir™ nasal model with a pharmacological focus on [ATP]-binding cassette (ABC) efflux transporters. We initially performed a phenotypic characterization of the MucilAir™ model and assessed its barrier properties by immunofluorescence (IF), protein mass spectrometry and examination of histological sections. We then focused on the functional expression of the ABC transporters P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance associated protein (MRP)1, MRP2 and breast cancer resistance protein (BCRP) in bidirectional transport experiments. The MucilAir™ model comprises a tight, polarized, pseudo-stratified nasal epithelium composed of fully differentiated ciliated, goblet and basal cells. These ABC transporters were all expressed by the cell membranes. P-gp and BCRP were both functional and capable of actively effluxing substrates. The MucilAir™ model could consequently represent a potent tool for evaluating the interaction of nasally administered drugs with ABC transporters.

1. Introduction

Nasal delivery represents a highly effective route of administration for drugs requiring a quick onset of action. Nasal drug delivery offers several advantages over systemic administration, including reduced side-effects, avoidance of hepatic first-pass metabolism and rapid local absorption of drugs owing to the abundant vascularization and high permeability of the sizeable nasal mucosa [1].

The introduction of intranasal drug candidates requires the development of pre-clinical screening experiments to evaluate their permeability through the nasal mucosa [2]. Currently, Caco-2 intestinal cell line is the only FDA-approved predictive *in vitro* model to evaluate the absorption of drugs [3]. Considering the morphological and physiological differences with the nasal barrier, new models of nasal mucosa must be developed and characterized to evaluate the absorption of nasal drugs. In this context, several *in vitro* cellular models have been developed with the aim of closely mimicking the biology of the nasal

barrier. The use of immortalized nasal cell lines, such as the bovine turbinate (BT) [4], rat nasal squamous carcinoma (NAS 2BL) [5] and human nasal squamous carcinoma RPMI 2650 cell lines [6,7] represents a widespread approach. Despite some advantages, including high proliferation capacity and genetic homogeneity, immortalized cell lines are far from the human nasal epithelium in terms of biophysiology due to their weak differentiation ability [8]. To overcome these limitations, various *in vitro* models have evolved over the years, becoming increasingly complex and developing from submerged monocultures to three-dimensional epithelia cultured at the air-liquid interface. These latest models, available under the brand names EpiAirway™ (MatTek Corporation) and MucilAir™ (Epithelix), are constituted from primary human epithelial cells freshly isolated from nasal or bronchial biopsies [9]. These models accurately reproduce the biophysiology of human airway epithelia including the presence of a functional mucociliary system and the secretion of mucus in a homeostatic state [10].

Nasally administered drugs permeate through the nasal epithelium

* Corresponding author at: 10 rue de la Marandière, Faculté de Médecine, Saint-Priest-en-Jarez, France.

E-mail addresses: c.mercier@univ-st-etienne.fr (C. Mercier), elodie.jacqueroix@univ-st-etienne.fr (E. Jacqueroix), zhiguo.he@univ-st-etienne.fr (Z. He), sophie.hodin@univ-st-etienne.fr (S. Hodin), samuel.constant@epithelix.com (S. Constant), nathalie.perek@univ-st-etienne.fr (N. Perek), delphine.boudard@univ-st-etienne.fr (D. Boudard), xavier.delavenne@chu-st-etienne.fr (X. Delavenne).

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.04.002>

Received 22 November 2018; Received in revised form 18 March 2019; Accepted 2 April 2019

Available online 03 April 2019

0939-6411/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

In Vitro Assessment of Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions of Direct Oral Anticoagulants: Type 5-Phosphodiesterase Inhibitors Are Inhibitors of Rivaroxaban and Apixaban Efflux by P-Glycoprotein

Victor Margelidon-Cozzolino, Sophie Hodin, Elodie Jacqueroix, Olivier Delézay, Laurent Bertoletti, and Xavier Delavenne

INSERM UMR 1059, Equipe Dysfonctions Vasculaires et de l' Hémostase, Faculté de Médecine de St-Etienne, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France (V.M.-C., S.H., E.J., O.D., X.D.); and Service de Médecine Vasculaire et Thérapeutique, CHU de St-Etienne, Saint-Etienne, France (L.B.)

Received October 30, 2017; accepted March 21, 2018

ABSTRACT

Because of their lower bleeding risk and simplicity of use, direct oral anticoagulants (DOACs) could represent an interesting alternative to conventional anticoagulant treatment with vitamin K antagonists for patients with pulmonary arterial hypertension (PAH). P-glycoprotein (P-gp) plays a key role in DOAC pharmacokinetics. Type 5-phosphodiesterase inhibitors (PDE5is), a drug class commonly used in the treatment of PAH, have been shown to strongly inhibit P-gp. This work aimed to assess potential P-gp-mediated drug-drug interactions between PDE5is and DOACs using *in vitro* methods. A cellular model of drug transport assay, using P-gp-overexpressing Madin-Darby canine kidney cells (transfected with the human P-gp gene), was used to determine the bidirectional permeabilities of two DOACs (rivaroxaban and apixaban) in the absence

and presence of increasing concentrations (0.5–100 μM) of three PDE5is (sildenafil, tadalafil, and vardenafil). Permeabilities and efflux ratios were calculated from DOAC concentrations, were measured with liquid chromatography coupled with mass spectrometry, and were subsequently used to determine the PDE5i percentage of inhibition and half maximal inhibitory concentration (IC_{50}). Rivaroxaban efflux was inhibited by 99%, 66%, and 100% with 100 μM sildenafil, tadalafil, and vardenafil, respectively. Similarly, apixaban efflux was inhibited by 97%, 74%, and 100%, respectively. The IC_{50} values of the three PDE5is were 8, 28, and 5 μM for rivaroxaban and 23, 15, and 3 μM for apixaban, respectively. This study showed strong *in vitro* inhibition of DOAC efflux by PDE5is. *In vivo* studies are required to determine the clinical relevance of these interactions.

Introduction

Anticoagulant therapy remains a challenging issue in the field of pulmonary hypertension treatment. Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a vascular pulmonary disease characterized by elevated mean pulmonary arterial pressure that leads to right heart failure and death (Galie et al., 2016). Oral anticoagulants, particularly vitamin K antagonists (VKAs), are widely used in PAH as a supportive therapy (e.g., in 60% of participants in a recent French cohort; Gabriel et al., 2016). The risk/benefit ratio of VKAs seems to be associated with a significant bleeding risk in these patients (Henkens et al., 2013).

In addition to anticoagulants, patients with PAH receive specific drugs called “targeted therapies,” which include prostanoid analogs, endothelin receptor antagonists, and type 5-phosphodiesterase inhibitors (PDE5is) (Galie et al., 2016). These targeted therapies are noticeably involved in drug-drug interactions (DDIs), especially with VKAs (Fernández and Romá, 2003; Ciraci et al., 2014; Said, 2014). Indeed, some of these drugs are P-glycoprotein (P-gp) and/or CYP3A4 substrates and can act as P-gp and CYP3A4 competitive inhibitors toward other drugs prescribed simultaneously. Interestingly, PDE5is were shown to be *in vitro* P-gp inhibitors when tested with chemotherapy in P-gp-overexpressing neoplastic cells (Ding et al., 2011; Shi et al., 2011). However, these studies only monitored intracellular accumulation of P-gp substrates and did not specifically study drug transport.

Direct oral anticoagulants (DOACs) are direct specific activated factor X (anti-Xa) or thrombin (Anti-IIa) inhibitors, which are increasingly prescribed for approved indications

This work was supported by La Fondation du Souffle and Le Fonds de Recherche en Santé Respiratoire.
<https://doi.org/10.1124/jpet.117.245993>

ABBREVIATIONS: AF, atrial fibrillation; DDI, drug-drug interaction; DMSO, dimethylsulfoxide; DOAC, direct oral anticoagulation; ER, efflux ratio; FA, formic acid; FDA, U.S. Food and Drug Administration; MDCK, Madin-Darby canine kidney; m/z, mass-to-charge ratio; P-gp, P-glycoprotein; PAH, pulmonary arterial hypertension; $P_{\text{appA}\rightarrow\text{B}}$, apical-to-basolateral permeability; $P_{\text{appB}\rightarrow\text{A}}$, basolateral-to-apical permeability; PDE5i, type 5-phosphodiesterase inhibitor; RER, relative efflux ratio; TEER, transepithelial electric resistance; VKA, vitamin K antagonist; VTE, venous thromboembolism.

In Vitro Comparison of the Role of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein on Direct Oral Anticoagulants Disposition

Sophie Hodin^{1,2} · Thierry Basset^{1,2,3} · Elodie Jacqueroix^{1,2} · Olivier Delezay^{1,2} · Anthony Clotagide⁴ · Nathalie Perek^{1,2} · Patrick Mismetti^{1,2,5} · Xavier Delavenne^{1,2,3} 

© Springer International Publishing AG 2017

Abstract

Background Pharmacokinetics of direct oral anticoagulants (DOACs) are influenced by ATP-binding cassette (ABC) transporters such as P-glycoprotein (P-gp) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP).

Objectives To better understand the role of transporters in DOAC disposition, we evaluated and compared the permeabilities and transport properties of these drugs.

Methods Bidirectional permeabilities of DOACs were investigated across Caco-2 cells monolayer. Transport assays were performed using different concentrations of DOAC and specific inhibitors of ABC transporters. Cell model functionality was evaluated by transport assay of two positive control substrates.

Results The results of transport assays suggest a concentration-dependent efflux of apixaban, dabigatran etexilate and edoxaban, whereas the efflux transport of rivaroxaban did not seem to depend on concentration. Verapamil, a strong inhibitor of P-gp, decreased DOAC efflux in the Caco-2 cell model by 12–87%, depending on the drug

tested. Ko143 reduced BCRP-mediated DOAC efflux in Caco-2 cells by 46–76%.

Conclusion This study allowed identification of three different profiles of ABC carrier-mediated transport: predominantly P-gp-dependent transport (dabigatran), preferential BCRP-dependent transport (apixaban) and approximately equivalent P-gp and BCRP-mediated transport (edoxaban and rivaroxaban).

Key Points

Pharmacokinetics of DOACs are influenced by ATP-binding cassette (ABC) transporters.

This study indicates that both P-gp and BCRP were involved in all DOACs' disposition.

Three different profiles of DOACs were determined regarding their modulation by P-gp or BCRP.

✉ Xavier Delavenne
xavier.delavenne@chu-st-etienne.fr

¹ INSERM, U1059, Dysfonction Vasculaire et Hémostase, Saint-Étienne, France

² Université de Lyon, 42023 Saint-Étienne, France

³ Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie-Gaz du sang, Plateau de Biologie-Hôpital Nord, CHU de Saint-Etienne, 42055 Saint-Étienne, France

⁴ Service de Radiopharmacie, CHU de Saint-Etienne, 42055 Saint-Étienne, France

⁵ Unité de Recherche Clinique Innovation et Pharmacologie, CHU de Saint-Etienne, 42055 Saint-Étienne, France

1 Introduction

Direct oral anticoagulants (DOACs) represent a major improvement in the prevention and treatment of stroke and thromboembolism. These drugs, apixaban, dabigatran etexilate, edoxaban, and rivaroxaban constitute attractive alternatives to warfarin and other vitamin-K antagonists in view of their limited requirement for monitoring and more predictable pharmacokinetics and pharmacodynamics. All DOACs are known to be substrates of ATP-binding cassette (ABC) transporters such as

CO-009

O-GlcNAcase inhibition by Thiamet G opposes acute cardiac decompensation in rats with chronic heart failure

M Soulié^a, O Beseme^b, L Nicole^b, JP Henry^c, F Pinet^c, V Richard^d, P Mulder^a ^aNormandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1096, EnVI & FHU-REMEDI-VHF - Rouen (France); ^bINSERM, U1167, FHU-REMEDI-HF, Institut Pasteur de Lille, University Lille, Nord de France - Lille (France)

Introduction: Exacerbation of heart failure (HF), better known as acute decompensated HF, is characterized by dyspnea, edema and fatigue, which is associated with a high morbi-mortality. O-linked β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a key regulator of the cellular stress response and augmented O-GlcNAc levels exerts protective effects in models of acute vascular injury and ischemia-reperfusion injury. However, whether increasing O-GlcNAc exerts similar protective effects in acute decompensation of HF is unknown. Thus we evaluated the cardiac effects of increasing O-GlcNAc levels by inhibiting O-GlcNAcase with Thiamet G (TG) in a rat model of acute decompensated HF.

Material and methods: Three months after coronary artery ligation resulting in established HF, rats received 2.5 mL water (control) or 1.8 g/kg NaCl (dissolved in 2.5 mL water) provoking acute decompensation. Left ventricular (LV) fractional shortening and cardiac output (echography) as well as LV tissue perfusion (MRI) were assessed 1 and 14 days after NaCl-loading, and TG was administered 12 h after NaCl (25 mg/kg IP).

Results: NaCl provoked acute decompensation in rats with HF. Indeed, 1 day after NaCl, the HF-related impairments of LV fractional shortening, cardiac output and myocardial tissue perfusion were aggravated. Fourteen days after NaCl, cardiac output partially recovered, but fractional shortening and myocardial perfusion remained impaired. As soon as 12 h after administration, TG improved fractional shortening, cardiac output and tended to increase myocardial perfusion. Moreover, 14 days after TG, cardiac output and myocardial perfusion were still improved.

Discussion/Conclusion: These data show that in an experimental model salt-induced acute decompensation of HF, a curative treatment with TG improves both cardiac output as well as myocardial perfusion. The cellular mechanisms, i.e. post-translational protein O-GlcNAcylation, implicated in the effects of TG, are currently under investigation.

LV Function

Group	LV FS (%)		CO (ml/min)		Myocardial Perfusion (ml/min/g)		Pulmonary weight (g)	
	Day 1	Day 14	Day 1	Day 14	Day 1	Day 14	Day 1	Day 14
	HF	15 ± 1	17 ± 1	121 ± 6	121 ± 6	3.45 ± 0.12	3.45 ± 0.12	1.17 ± 0.04
HF+NaCl	12 ± 1*	12 ± 1*	104 ± 3*	114 ± 2*	2.06 ± 0.10*	2.41 ± 0.16*	1.12 ± 0.03	1.52 ± 0.18*
HF+NaCl+TG	16 ± 1†	18 ± 1†	129 ± 4†	125 ± 4†	2.63 ± 0.44†	3.02 ± 0.22†	1.22 ± 0.07	1.18 ± 0.03

LV FS: left ventricular fractional shortening; CO: cardiac output. *P < 0.05 vs. HF; †: P < 0.05 vs. HF+NaCl.

CO-010

Pre-clinical evaluation of vectorized therapies combined with an anti-CTLA4 antibody in murine xenografted models of melanoma

S Topin-Ruiz^a, A Mellinger^b, C Bourreau^b, J Fouillet^b, E Lepeltier^b, G Jaouen^c, C Passirani^b, L Martin^d, N Clere^b ^aMINT, Univ Angers, INSERM, CNRS, Université Bretagne Loire, IBS-CHU, 4 rue Larrey, F-49933 Angers, France; ^bCentre Hospitalier Universitaire, Service de Dermatologie, Université Bretagne Loire, 4 rue Larrey, F-49933 - Angers (France); ^cMINT, Univ Angers, INSERM, CNRS, Université Bretagne Loire, IBS-CHU, 4 rue Larrey, F-49933 - Angers (France); ^dPSL, Chimie ParisTech, ParisCedex05; Sorbonne Université, CNRS, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM, UMR 8232) - Paris Cedex 05 (France); ^eCentre Hospitalier Universitaire, Service de Dermatologie, Université Bretagne Loire, 4 rue Larrey, F-49933 Angers; Université Bretagne-Loire, MitoVasc, CNRS 6214/INSERM 1083, 4 rue Larrey, F-49933 - Angers (France)

Introduction: The treatment of advanced melanoma with poor prognosis has been revolutionized by targeted therapy and immune checkpoint blockade. However, only a small proportion of patients respond to these treatments, particularly in the case of metastatic melanoma. In this latter case, the combination of several treatments may be of therapeutic value. Among the strategies that can be combined to immunotherapy, chemotherapy using new molecules that induce senescence of cancer cells such as ferrochens or gene therapy by inhibition of gene transcription through RNA interference constitute a promising innovation. In order to allow systemic administration and to improve the distribution of these drugs, our laboratory has formulated lipid nanoparticles (LNC) which are able to encapsulate various lipophilic or hydrophilic molecules. Our project aims (i) to demonstrate the therapeutic efficacy of LNC encapsulated with ferrochens and (ii) to evaluate the benefits of a combination of this vectorized therapy with anti-CTLA4 antibodies in two murine models of melanoma.

Material and methods: Thus, B16F10 cells have been xenografted on the flank of C57BL/6 male mice. As soon as tumor volume was 100 mm³ (d0), mice have been treated daily between d1 and d5 by LNC ferrochens (0.45 mg/kg) associated (or not) with anti-CTLA4 antibody (10 mg/kg). This randomized, double-blind study involved 8 groups of animals.

Results: Tumor growth following B16F10 cells injection in C57BL/6 mice was significantly reduced when mice were treated with an association of LNC ferrochens and ipilimumab. Moreover, flow cytometry described an enhancement of the cytotoxicity activity of T lymphocytes from mice treated with the association of both treatments. Taken together, these results suggest a benefit of the treatment combining ipilimumab with new pro-apoptotic drugs to treat aggressive melanoma.

AM and STP contributed equally.

The authors thank the "comité départemental du Maine et Loire de la Ligue contre le Cancer" for its financial support for the realization of this project.

CO-011

ISCR-induced chlordecone dechlorination leads to derivatives with lower pro-angiogenic properties in vitro and in vivo on a prostate cancer model

S Legeay^a, E Alabed Alibrahim^a, PA Billat^a, N Clere^a, S Bristeau^b, F Nessler^c, S Faure^d, C Mouvet^d ^aMINT, UNIV Angers, INSERM 1066, CNRS 6021, Université Bretagne Loire, IRIS-IBS-CHU, 4 rue Larrey - Angers (France); ^bBRGM, Laboratory Division, 3 Av. Claude Guillemin - Orléans (France); ^cInstitut Pasteur Lille (IPL) - Lille (France); ^dBRGM, Water, Environment and Ecotechnologies Division, 3 Av. Claude Guillemin - Orléans (France)

Introduction: Chlordecone (CLD) is an organochlorine pesticide intensively used during the 1970s in French West Indies (Guadeloupe and Martinique) to combat weevils in banana plantations. Prohibited from 1993 because of its carcinogenicity notably for prostate cancer [1], CLD still remains in soils and contributes to the local population exposure [2]. In Situ Chemical Reduction (ISCR) has been identified as a possible way for the remediation of soils contaminated by CLD and leads to dechlorinated CLD derivatives [3]. The aim of this work was to evaluate the in vitro and in vivo influence of CLD and three of its dechlorinated derivatives in mutagenicity, genotoxicity and the control of neovascularization in a model of prostate cancer.

Material and methods: The mutagenicity and genotoxicity were investigated using the Ames technique on Salmonella typhimurium and the in vitro micronucleus with TK6 human lymphoblastoid cells. The proangiogenic effect of CLD and three of its dechlorinated derivatives, CLD-1Cl, CLD-3Cl and CLD-4Cl, was evaluated in vitro on human primary endothelial cell at three concentrations: 10–11 M, 10–9 M, 5.10–8 M and in vivo on a murine model of human prostate tumor (PC-3) treated at two exposure levels: 33 µg/kg and 1.7 µg/kg respectively reflecting acute and chronic toxic exposure in human.

Results: Like CLD, the dechlorinated derivatives of CLD studied were devoid of genotoxicity and mutagenicity. The two main dechlorinated CLD derivatives CLD-1Cl and CLD-3Cl, have lower cytotoxicity and proangiogenic properties in vitro than CLD itself. The serum measurements show that, for the same ingested dose, the three metabolites concentrations were significantly lower than that of CLD. Prostate tumor growth was lower in the groups treated by the three metabolites compared to the one treated by CLD. The vascularization measured on the tumor sections was inversely proportional to the rate of dechlorination, the treatment with CLD-4Cl showing no difference with control animals treated with only the vehicle oil used for all substances tested.

Discussion/Conclusion: We can therefore conclude that the pro-angiogenic effect of CLD is significantly decreased following the ISCR-resulting dechlorination. Further investigations are needed to elucidate the molecular mechanisms by which dechlorination of CLD reduces its carcinogenic and proangiogenic effects in prostate tumor.

References

- [1] Multigner L. et al. J. Clin.Oncol. (2010) **28** 3457–3462.
- [2] Cabidoche Y.M. et al. Environ. Pollut. (2009) **157** 1697–1705.
- [3] Clostre F. et al. (2010) Cah PRAM 9–10.

CO-012

The parallel reaction monitoring-based high resolution mass spectrometry: a new validated method for the quantification of proteins

E Jacquerooux, S Hodin, P Mismetti, X Delavenne INSERM UMR 1059, Université Jean Monnet, Université de Lyon, F42023 - Saint-Etienne (France)

Introduction: ATP-binding cassette (ABC) transporters, such as P-glycoprotein (P-gp), Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) or Multidrug Resistance-associated Proteins (MRPs), are well-known to be involved in the absorption of drugs. The FDA recommends several in vitro cell models to study the involvement of ABC transporters in the pharmacokinetics of drugs; however, these models have different characteristics in terms of protein expression. So, it is important to be able to accurately evaluate the expression of ABC transporters in these cell models. The objectives of this study were to develop and validate a multiplexed quantification method of 4 ABC transporters (P-gp, BCRP, MRP1, MRP2) by LC-MS/MS and to apply it to some cell models recommended by the FDA for transport studies.

Material and methods: Quantification of ABC transporters was performed by Parallel Reaction Monitoring (PRM)-based targeted mass spectrometry using a Q-Exactive Plus mass spectrometer. For each protein of interest, 3 proteotypic peptides were selected. For each peptide, the 3 most intense fragments were retained. Regarding cell application, Caco-2 and transfected MDCK cells were recovered from cell culture inserts and the membrane protein fraction was isolated using a commercial kit (Mem-PER Plus[®], Thermo Fisher). Then, the membrane proteins were digested by trypsin for analysis by LC-MS/MS.

Results: Regarding the method validation, linearity, accuracy and precision were proven by analyzing calibration curves for each of the 8 peptides, according to the recommendations of the FDA guidance [1]. All calibration curves gave R2 values above 0.97. LOD and LLOQ were in the range of pmol/L. 5 peptides had a LLOQ of 50 pmol/L, 1 peptide had a LLOQ of 150 pmol/L and 2 peptides had a LLOQ of 250 pmol/L. Quantification on cell models showed a lower expression of P-gp and BCRP transporters in Caco-2 cells than in transfected MDCK cells.

Discussion/Conclusion: This LC-MS/MS-based quantification method was validated according to the recommendations of the FDA guidance. This method was suitable to assess simultaneously the expression of 4 ABC transporters involved in drug kinetics in in vitro cell models. These experiments demonstrated that the expression of ABC transporters varied according to the cell model, which could explain the differences in efflux ratios observed for a molecule in the literature. To our knowledge, this is the first PRM method validation for the quantification of ABC transporters.

Reference

- [1] FDA. Bioanalytical method validation Guidance (2018).

PM1 - 055

Simultaneous cocktail phenotyping of CYP450-mediated drug metabolism in patients with inappropriate response to psychotropic drugs

X Declèves^a, R Reis^a, J Quilichini^a, L Labat^b, C Lloret-Linares^c ^aBiologie du médicament et Toxicologie, Hôpital Cochin, APHP – Paris (France); ^bService de Toxicologie, APHP, Hôpital Lariboisière – Paris (France); ^cService de Pharmacologie et Toxicologie Cliniques, Hôpitaux Universitaires de Genève – Genève (Switzerland)

Introduction: Cytochrome P450 (CYP) enzymes and efflux transporters such as the P-glycoprotein (P-gp) are major proteins in humans whose individual variability affects pharmacokinetics and drug response. It is therefore important to assess their *in vivo* activity. Phenotyping for drug metabolizing enzymes or transporters is defined as measuring its actual *in vivo* activity in an individual. This is performed by administration of a selective substrate for CYP enzymes or transporter and subsequent determination of an appropriate pharmacokinetic parameter, or a ratio between the drug and its metabolite (metabolic ratio). Simultaneous phenotyping is performed by the administration of a cocktail of probe drugs, each of which is metabolized by one specific cytochrome or transported by P-gp. Due to the low dose of the probe drugs and subsequent plasma concentrations, a sensible bioanalytical method must be used for the quantification of all analytes. Thus, a new method for the quantitative analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) of P-glycoprotein (P-gp) and cytochrome P450 (CYP) probe substrates and their metabolites was developed and validated in human plasma.

Material and methods: CYP-specific substrates (caffeine for CYP1A2, bupropion for CYP2B6, flurbiprofen for CYP2C9, omeprazole for CYP2C19, dextromethorphan for CYP2D6 and midazolam for CYP3A4), their respective metabolites and P-gp substrate (fexofenadine) were used as cocktail probe drugs. The 13 analytes were simultaneously detected and quantified in human plasma using the selected reaction monitoring mode of a triple quadrupole mass spectrometer after positive ionization with heated electrospray interface. The method was used in a cohort of 22 patients included in Lariboisière Hospital (Department of Internal Medicine).

Results: This method presented satisfactory results in terms of sensitivity, specificity, precision, recovery and matrix effects. The lower limit of quantification and the linearity of all analytes are suitable with the expected concentrations in clinical practice. Patients were phenotyped because of major issue in achieving therapeutic response and severe adverse effects (mainly for analgesics and psychotropic drugs). Phenotyping and clinical results will be presented during the congress.

Discussion/Conclusion: This bioanalytical method can be used to assess the metabolic activities of the most relevant CYPs and P-gp that play a key role in pharmacokinetics interindividual variability and drug response.

PM1 - 056

Comparison of validated Caco-2 and MDCKs in vitro cell models for drug transport studies

E Jacqueroix, S Hodin, P Mismetti, N Perek, X Delavenne INSERM UMR 1059, Université Jean Monnet, Université de Lyon – Saint-Etienne (France)

Introduction: FDA recommendations suggested that two *in vitro* cell models, Caco-2 and MDCKs, can be used in the same way as reference models for drug transport studies. However, Caco-2 and MDCKs cells have different characteristics, both in terms of protein expression and culture conditions. To evaluate these models, we used a direct oral anticoagulant (DOAC), rivaroxaban, which is a well-known substrate of ATP-binding cassette (ABC) transporters, such as P-glycoprotein (P-gp) or Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). The objectives of this study were to compare these two *in vitro* models validated by the FDA and evaluate their indications/specificities in rivaroxaban transport studies.

Material and methods: Caco-2, MDCK-II natives and transfected MDCK (MDCK-mdr1 and MDCK-bcrp) cells were seeded on cell culture inserts and cultured until confluence. Bidirectional permeabilities experiments were performed on each cell line for rivaroxaban, with specific inhibitors of P-gp (verapamil) and BCRP (ko143) and a non-specific inhibitor (cyclosporine) to determine efflux ratios. Then, IC50 values were calculated for both specific inhibitors on each cell model. Relative quantification by Western blotting and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-MS) were used to assess ABC transporters expression on each cell line.

Results: IC50 values for verapamil reflected a lower inhibitory power for MDCK-mdr1 compared to Caco-2 and MDCK-bcrp respectively. For ko143, IC50 values indicated a lower inhibitory power for MDCK-bcrp than for Caco-2 and MDCK-mdr1 respectively. Western blotting experiments showed a higher expression of P-gp and BCRP in transfected MDCK cells compared with Caco-2 cells. This difference was confirmed with LC-MS quantification. ABC transporters expressions were consistent with efflux ratios and IC50 values for each cell model.

Discussion/Conclusion: These experiments demonstrated that these two models can provide different and complementary information. The MDCK models produce results in 5 days vs. 21 days for Caco-2 model. Overexpression of only one human ABC transporter makes the MDCK models more suitable for screening and determining which ABC transporter is more specifically involved in the transport of a drug. However, the Caco-2 model is more appropriate to reveal a possible impact *in vivo* due to a well-known correlation between *in vitro* permeation of drug across Caco-2 and *in vivo* intestinal permeation.

PM1 - 057

Evaluation of a strategy to enhance the brain distribution of erlotinib: a [11C]erlotinib PET imaging study in nonhuman primates

S Goutal^a, S Auvity^a, I Buvat^a, F Caillé^a, O Langer^b, N Tournier^a ^aCEA/IMIV – Orsay (France); ^bAIT – Vienna (Austria)

Introduction: Efflux transport by P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP) at the blood-brain barrier (BBB) is assumed to limit the brain exposure and clinical efficacy of most tyrosine kinase inhibitors such as erlotinib against brain malignancies. Invasive experiments in rodents suggest that elacridar, a multi-drug resistance inhibitor drug, may inhibit this BBB efflux. We non-invasively evaluated the P-gp/BCRP-inhibition potency of elacridar in non-human primates which BBB more closely resembles to human's.

Material and methods: [11C]erlotinib PET experiments were performed in baboons under baseline conditions (n = 4) and during *i.v* infusion of elacridar (12 mg/kg/h, n = 3) which started 30 min before PET. During PET acquisition, arterial blood (facing the BBB) sampling was performed to measure the plasma kinetics of [11C]erlotinib and elacridar using HPLC. Pharmacokinetic modeling of the PET data was performed to estimate the brain distribution of [11C]erlotinib from plasma to the brain, expressed as total volume of distribution (VT; mL/cm³ – Logan plot analysis).

Results: Baseline conditions showed the low brain uptake of [11C]erlotinib (VT = 0.23 ± 0.015 mL/cm³), which was markedly lower (P < 0.001) than its distribution to muscle tissue surrounding the skull (VT = 0.86 ± 0.10 mL/cm³). Plasma concentration of elacridar increased rapidly to reach a plateau at 9.5 ± 0.6 µg/mL within 20 min. Elacridar infusion resulted in a 3.7-fold increase in [11C]erlotinib distribution to the brain (VT = 0.81 ± 0.21 mL/cm³, P < 0.01), reaching comparable levels as in muscle tissue, without changing [11C]erlotinib plasma pharmacokinetics.

Discussion/Conclusion: Baseline conditions showed the low brain uptake of [11C]erlotinib (VT = 0.23 ± 0.015 mL/cm³), which was markedly lower (P < 0.001) than its distribution to muscle tissue surrounding the skull (VT = 0.86 ± 0.10 mL/cm³). Plasma concentration of elacridar increased rapidly to reach a plateau at 9.5 ± 0.6 µg/mL within 20 min. Elacridar infusion resulted in a 3.7-fold increase in [11C]erlotinib distribution to the brain (VT = 0.81 ± 0.21 mL/cm³, P < 0.01), reaching comparable levels as in muscle tissue, without changing [11C]erlotinib plasma pharmacokinetics. Infusion of elacridar allows for controlled plasma concentrations and successfully inhibited P-gp/BCRP at the BBB of nonhuman primates. PET imaging offers a non-invasive and clinically feasible method to evaluate strategies to improve the brain delivery of drugs.

PM1 - 058

Cirrhotic patients, especially those with neurological symptoms, display dramatically increased levels of several xenobiotics in plasma, a metabolomic study

N Weiss^a, P Barbier Saint-Hilaire^b, B Colsch^b, S Attala^b, A Schaefer^a, M Rudler^a, C Bouzib^b, F Lamari^a, F Sedel^a, C Junot^a, D Thabut^a ^aHôpital Pitié-Salpêtrière – Paris (France); ^bCEA – Saclay (France)

Introduction: Encephalopathy is a classical complication of liver disease and/or portosystemic shunts. Its pathophysiology is not completely elucidated; mechanisms include the role of elevated ammonia levels in association with systemic inflammation. An impairment of blood-brain barrier (BBB) permeability is also hypothesized. In a recent metabolomic study including patients who underwent cerebrospinal fluid (CSF) collection, our group outlined that xenobiotics/drugs that usually don't cross BBB were retrieved in the CSF, suggesting a potential neurological toxicity of drugs.

Material and methods: We conducted a retrospective study of plasma samples in the Hepatological ICU. Plasma samples from cirrhotic patients displaying encephalopathy were compared to plasma from cirrhotic patients without neurological symptoms, and to plasma from healthy controls. Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry was performed and then after the metabolic fingerprints were compared to database and between the different groups.

Results: Plasma samples were obtained from 12 cirrhotic patients with encephalopathy (age 59 [40–68], MELD 20 [16–31], alcohol 58%), 13 cirrhotic patients without encephalopathy (age 56 [55–64], MELD 17 [14–29], alcohol 38%) and 9 healthy controls. Among 495 identified metabolites, 25 corresponded to xenobiotics or its derivatives. Fluoxetine was detected with a more than 200 fold increase, aminosalicic acid with a more than 10fold increase and benzyl alcohol (present in cough pills and antiseptics) with a 3 fold increase in cirrhotic patients with encephalopathy as compared to cirrhotic patients. In cirrhotic patients with or without encephalopathy, propranolol was detected with a more than 8500 fold increase, acetaminophen with a 40fold increase, penicillamine and ampicillin both with a 2fold increase as compared to healthy controls. Interestingly, several substances which were not expected to have systemic diffusion were detected in cirrhotic patients and in healthy controls: eugenol, isoeugenol (used in mouth bathing solution), triethanolamine (trolamin, used in cutaneous creams) and resorcinol monoacetate (used in mouth bathing solution and in cutaneous creams).

Discussion/Conclusion: Cirrhotic patients, especially those with neurological symptoms, display dramatically increased levels of several xenobiotics in plasma. These results confirm that PK/PD parameters of commonly used drugs are highly modified in those patients.

Résumé : La prescription des AOD en remplacement des AVK est de plus en plus importante, du fait d'une utilisation moins contraignante pour le patient et d'une plus faible variabilité intra- et interindividuelle. Contrairement aux AVK, les AOD sont des substrats des pompes d'efflux intestinales, hépatiques et rénales. Ces transporteurs sont donc impliqués dans la pharmacocinétique des AOD, particulièrement dans leur absorption et dans leur élimination biliaire et rénale. L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer *in vitro* le rôle des transporteurs P-gp et BCRP dans la variabilité pharmacocinétique du rivaroxaban, un inhibiteur direct du facteur X activé. La première étude a été axée sur l'étude d'une interaction entre le riociguat et deux AOD, l'apixaban et le rivaroxaban. L'estimation des IC50 a révélé la capacité des modèles cellulaires MDCK transfectés à détecter une inhibition de l'efflux lié à BCRP des deux AOD par le riociguat, bien que cette inhibition ne soit pas assez puissante pour être cliniquement pertinente. La seconde étude était centrée sur l'étude des facteurs pouvant faire varier les résultats des études de transport du rivaroxaban obtenus *in vitro*, en particulier la quantité des transporteurs ABC. Une analyse en spectrométrie de masse a révélé une expression plus élevée de P-gp et BCRP dans les cellules MDCK transfectées mais aussi une différence d'expression des transporteurs entre deux lignées Caco-2 issues d'une banque cellulaire différente. Les ratios d'efflux du rivaroxaban et les IC50 des inhibiteurs spécifiques étaient corrélés à la quantité de transporteurs mesurée dans les différents modèles. La troisième étude était basée sur la mise en place d'un modèle d'étude *in vitro* du transport hépatique, grâce à la lignée HepaRG. Les cellules HepaRG présentent des caractéristiques semblables aux hépatocytes *in vivo*, en particulier l'expression de transporteurs d'efflux fonctionnels au pôle canaliculaire, impliqués dans l'efflux biliaire du rivaroxaban. Des études d'accumulation ont démontré une prise en charge du rivaroxaban par les transporteurs d'efflux hépatiques, ainsi qu'une diminution de l'efflux dans les canalicules biliaires en présence d'inhibiteurs de P-gp et BCRP. Finalement, les modèles cellulaires *in vitro* démontrent que le rivaroxaban est pris en charge par deux transporteurs d'efflux, P-gp et BCRP, au niveau intestinal, rénal et hépatique, et que ce transport peut contribuer à la variabilité pharmacocinétique du rivaroxaban.

Abstract : The replacement of VKAs by DOACs is increasing, due to less constraining use for the patient and lower intra- and interindividual variability. Contrary to VKAs, DOACs are substrates of intestinal, hepatic and renal efflux pumps. These transporters are therefore involved in the pharmacokinetics of DOACs, particularly in their absorption and both biliary and renal elimination. This work aimed to evaluate *in vitro* the role of P-gp and BCRP transporters in the pharmacokinetic variability of rivaroxaban, a direct specific activated factor X inhibitor. The first study focused on the interaction between riociguat and two DOACs, apixaban and rivaroxaban. The IC50 estimate highlighted the ability of the transfected MDCK cell models to detect the inhibition of BCRP-mediated efflux of both DOACs by riociguat, although this inhibition was not sufficiently strong to be clinically relevant. The second study focused on factors that could affect the results of *in vitro* rivaroxaban transport studies, in particular the expression levels of ABC transporters. Mass spectrometry analysis revealed a higher expression of P-gp and BCRP in transfected MDCK cells but also a different expression of transporters between two Caco-2 models coming from a different cell bank. Rivaroxaban efflux ratios and IC50s of specific inhibitors were correlated with the quantity of transporters detected in the different cell models. The third study was based on the development of an *in vitro* model of hepatic transport using the HepaRG cell line. HepaRG cells had characteristics similar to *in vivo* hepatocytes, particularly expression of functional canalicular efflux transporters which are involved in the biliary secretion of rivaroxaban. Accumulation studies showed that rivaroxaban was a substrate of hepatic efflux transporters and that canalicular secretion decreased in the presence of P-gp and BCRP inhibitors. Finally, *in vitro* cell models highlight the involvement of two efflux transporters, P-gp and BCRP, at the intestinal, renal and hepatic levels in the disposition of rivaroxaban, and that this transport can contribute to the pharmacokinetic variability of rivaroxaban.