



HAL
open science

Imagerie translationnelle pour la mise en évidence des répercussions pharmacocinétiques des transporteurs de médicaments

Solène Marie

► **To cite this version:**

Solène Marie. Imagerie translationnelle pour la mise en évidence des répercussions pharmacocinétiques des transporteurs de médicaments. Pharmacologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASQ004 . tel-03148829

HAL Id: tel-03148829

<https://theses.hal.science/tel-03148829>

Submitted on 22 Feb 2021

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.

Imagerie translationnelle pour la
mise en évidence des répercussions
pharmacocinétiques des
transporteurs de médicaments

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n° 569,
Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Inserm, Laboratoire d'Imagerie
Biomédicale Multimodale Paris Saclay, 91401, Orsay, France.

Référent : Faculté de Pharmacie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 9 Octobre 2020 par

Solène MARIE

Composition du Jury

Olivier FARDEL

PU-PH, Université de Rennes 1

Président

Benjamin GUILLET

PU-PH, Aix-Marseille Université

Rapporteur & Examineur

Catherine PASTOR

Professeure, Université de Paris

Rapporteur & Examinatrice

Aurélië BARRAIL-TRAN

MCU-PH, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Stéphanie FRANCHI-ABELLA

PU-PH, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Nicolas TOURNIER

Docteur, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

Remerciements

À Madame la Professeure Catherine Pastor et Monsieur le Professeur Benjamin Guillet pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Les échanges que nous avons eus en congrès à propos de ce travail ont été extrêmement enrichissants pour moi. Pour cela je vous remercie et je suis heureuse aujourd'hui de vous présenter les résultats de ce travail et de ces réflexions.

Aux examinateurs ayant accepté de participer à ce jury de thèse : M. Olivier Fardel, Professeur à l'Université de Rennes-1, c'est un honneur pour moi que ce travail soit évalué par votre regard de spécialiste des transporteurs, Mme Stéphanie Franchi-Abella, Professeure à l'Université Paris-Saclay, merci d'avoir accepté d'apporter votre expertise en imagerie hépatique, Mme Aurélie Barrail-Tran, enseignante à l'Université Paris-Saclay, merci pour l'intérêt que tu portes à ces méthodes d'imagerie et pour avoir accepté d'évaluer ce travail de ton regard aguerri de pharmacocinéticienne.

À M. Nicolas Tournier, mon directeur de thèse, que je remercie du fond du cœur pour son encadrement exceptionnel tout au long de ce travail. J'ai eu le privilège d'être la première doctorante officiellement sous ton HDR et j'espère avoir été à la hauteur. Ta gentillesse, ta disponibilité et ton optimisme à toute épreuve ont été un soutien immense pour moi au cours de cette thèse. Merci de m'avoir permis de grandir scientifiquement et humainement depuis toutes ces années et de m'avoir initiée au monde passionnant des transporteurs.

À tous mes collègues de l'unité BioMaps et du SHFJ avec qui j'ai partagé ces années et ce travail. Vous avez été tellement nombreux à m'aider et me soutenir qu'il est difficile de vous remercier individuellement mais vous avez été essentiels à cette thèse. Un merci particulier à M. Vincent Lebon, Professeur à l'Université Paris-Saclay et directeur de l'unité, et à MM. Charles Truillet et Philippe Gervais pour leur soutien chaleureux, ainsi qu'à Mmes Maud Goisard et Louise Breuil qui m'ont aidée pour toutes les expérimentations et sans qui rien n'aurait été possible.

À mes collègues de l'Université de Vienne, Mme Irene Hernández-Lozano et M. Oliver Langer, pour leur aide précieuse sur l'analyse des données scintigraphiques. Vos remarques étaient toujours extrêmement constructives et nos échanges m'ont permis d'améliorer rapidement mon niveau d'anglais.

À mes nombreux collègues de l'Hôpital Bicêtre et de la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Saclay qui m'ont accompagnée au cours de ces années. Je tiens à remercier vivement et à exprimer ma gratitude à M. le Professeur Marc Pallardy, Doyen de la Faculté, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse en me donnant la chance d'occuper un poste d'AHU au sein de l'Université Paris-Saclay.

À tous mes amis qui m'ont soutenue et avec qui j'ai finalement réussi à garder le contact malgré mon « agenda de ministre » que vous me reprochez souvent. Un merci tout particulier à ceux qui m'ont proposé de relire ce manuscrit et grâce à qui j'ai pu corriger quelques belles coquilles.

À ma famille qui a arrêté depuis longtemps d'essayer de comprendre mon parcours universitaire mais qui continue à m'encourager et m'aimer malgré tout.

À Horté qui a croisé mon chemin peu de temps après le début de cette thèse et qui m'a acceptée telle que je suis en respectant mes choix professionnels.

Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières	5
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux	11
Liste des abréviations.....	13
Introduction et objectifs	17
Chapitre I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
1. Importance de la distribution tissulaire des médicaments en pharmacocinétique ..	23
2. Implication des transporteurs en pharmacocinétique	24
2.1. Les transporteurs ATP-Binding Cassette (ABC).....	24
2.1.1. La famille MDR (ABCB).....	25
2.1.2. La famille MRP (ABCC)	27
2.1.3. La BCRP (ABCG2)	27
2.2. Les transporteurs Solute Carrier (SLC).....	28
2.2.1. La famille MATE (SLC47).....	29
2.2.2. La famille OAT/OCT (SLC22)	30
2.2.2.1. Les transporteurs OAT	30
2.2.2.2. Les transporteurs OCT	31
2.2.3. La famille OATP (SLC21/SLCO).....	33
2.2.3.1. Nomenclature.....	33
2.2.3.2. Structure des transporteurs.....	37
2.2.3.3. Mécanisme du transport OATP	39
2.2.3.4. Spécificités des substrats des OATP.....	40
2.2.3.5. Distribution tissulaire et impact fonctionnel des OATP.....	44
2.2.3.6. Inhibiteurs des transporteurs OATP	48
2.3. Importance des transporteurs dans le développement des médicaments	49
2.3.1. Transporteurs d'importance clinique reconnue	50
2.3.2. Rôle des transporteurs hépatiques en pharmacocinétique.....	53

2.3.2.1.	Participation à l'élimination hépatobiliaire des médicaments	53
2.3.2.2.	Situations physiologiques et pathologiques pouvant altérer la fonction des transporteurs hépatiques	55
2.3.2.3.	Interactions médicamenteuses impliquant les transporteurs	59
2.3.3.	Complexité de l'évaluation clinique des interactions médicamenteuses au niveau des transporteurs hépatiques	64
2.3.4.	Méthodes d'étude des transporteurs hépatiques	68
3.	Apport de l'imagerie pour l'étude des transporteurs en pharmacocinétique.....	73
3.1.	Modalités d'imagerie.....	74
3.1.1.	La scintigraphie gamma	74
3.1.2.	La tomographie par émission de positons (TEP)	75
3.1.3.	L'imagerie par résonance magnétique (IRM)	77
3.2.	Chimie et marquage des sondes pour l'imagerie	77
3.3.	Modélisation des données d'imagerie	81
3.4.	Développement des sondes pour l'imagerie des transporteurs : les leçons de l'imagerie de la P-glycoprotéine	86
3.4.1.	Choix du radionucléide pour radiomarquage.....	87
3.4.2.	Concept de microdose	87
3.4.3.	Capacité de transport et sélectivité.....	88
3.4.4.	Intensité du signal.....	89
3.4.5.	Métabolisme	90
3.4.6.	Variabilité interespèces.....	92
3.4.7.	Exemples d'apports cliniques pour l'étude de la P-gp au niveau de la BHE	92
3.5.	Les sondes pour l'imagerie des OATP	93
3.5.1.	Article n°1 : Imaging Probes and Modalities for the Study of Solute Carrier O (SLCO)-Transport Function <i>In Vivo</i>	93
3.5.2.	Synthèse et actualisation de l'article	103
3.5.3.	La [^{99m} Tc]mébrofénine.....	107
3.5.4.	Le [¹¹ C]glyburide.....	110
4.	Conclusion.....	111

Chapitre II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	115
1. Contexte général	117
2. Partie 1 - [^{99m} Tc]mébrofénine : Optimisation de la sélectivité de l'imagerie OATP ou MRP2 <i>in vivo</i>	118
2.1. Article n°2 : Validation of Pharmacological Protocols for Targeted Inhibition of Canalicular MRP2 Activity in Hepatocytes Using [^{99m} Tc]mebrofenin Imaging in Rats..	118
2.2. Contexte et objectifs	140
2.3. Données complémentaires à l'article.....	143
2.3.1. Acquisition des données scintigraphiques.....	143
2.3.2. Analyse des données scintigraphiques.....	144
2.3.3. Etude comparative du potentiel d'inhibition de MRP2 <i>in vitro</i>	145
2.3.4. Effets des inhibiteurs de MRP2 sur la perfusion hépatique.....	147
2.4. Synthèse des résultats	148
2.5. Conclusion et perspectives	151
3. Partie 2 - [¹¹ C]glyburide : Validation d'une nouvelle sonde clinique pour l'imagerie OATP.....	155
3.1. Validation préclinique des méthodes de quantification du [¹¹ C]glyburide ...	158
3.1.1. Contexte et objectif.....	158
3.1.2. Matériels et méthodes	159
3.1.2.1. Acquisition des données.....	159
3.1.2.2. Application des méthodes d'analyse quantitative.....	159
3.1.3. Résultats.....	160
3.1.4. Conclusion et perspectives.....	162
3.1.5. Communications.....	163
3.2. Validation clinique du [¹¹ C]glyburide comme sonde OATP	164
3.2.1. Contexte de l'étude	164
3.2.2. Article n°3 (en préparation) : Validation of [¹¹ C]glyburide as PET probe for imaging OATP function in Humans.....	168
3.2.3. Communications.....	186
4. Discussion générale.....	188
Conclusion générale.....	201

Bibliographie	203
Publications.....	239
Résumé	248

Liste des figures

Figure 1 : Expression des différents transporteurs au niveau de l'intestin, du foie et du rein. -----	18
Figure 2 : Arbre phylogénétique de la famille OATP. -----	34
Figure 3 : Structure secondaire du transporteur OATP1B1. -----	37
Figure 4 : Structure tridimensionnelle du transporteur OATP1B1. -----	38
Figure 5 : Distribution tissulaire des différents OATP chez l'Homme. -----	44
Figure 6 : Recommandations de l'ITC pour l'étude des transporteurs dans le développement des médicaments. -----	52
Figure 7 : Abondance des transporteurs dans le tissu hépatique. -----	55
Figure 8 : Influence de l'âge et du sexe sur l'expression tissulaire des OATP dans le foie. -----	56
Figure 9 : Posologies maximales recommandées de rosuvastatine et d'atorvastatine en fonction de l'âge et des polymorphismes génétiques. -----	57
Figure 10 : Arbres décisionnels recommandés par l'ITC pour l'étude des interactions avec les OATP. -----	62
Figure 11 : Démarche pour le développement des médicaments des méthodes <i>in vitro</i> , précliniques et cliniques permettant de générer et modéliser des données pour l'étude, la caractérisation et la prédiction de la pharmacocinétique tissulaire et plasmatique chez l'Homme des médicaments substrats des transporteurs. -----	66
Figure 12 : Performances relatives des modalités d'imagerie clinique pour l'étude fonctionnelle des transporteurs <i>in vivo</i> . -----	75
Figure 13 : Radiotraceurs utilisés pour l'imagerie de la P-gp et exemples d'images obtenues chez des volontaires sains. -----	89
Figure 14 : Métabolisme du [¹¹ C]vérapamil. -----	91
Figure 15 : Valeurs des constantes de transfert k_1 (sang vers le foie) de la [^{99m} Tc]mébrofénine en fonction des concentrations croissantes de ciclosporine. ---	150
Figure 16 : Western-Blot d'homogénats de foies de rats contrôles (WT : wild type) et déficients en MRP2 (TR ⁻ : transport déficient). -----	153
Figure 17 : Distribution du [¹¹ C]erlotinib dans le foie en condition basale et après inhibition des transporteurs OATP par rifampicine. -----	157
Figure 18 : Métabolisme du [¹¹ C]glyburide chez le primate en l'absence et en présence d'inhibiteurs des transporteurs (n = 2 dans chaque condition). -----	160
Figure 19 : ASC _R du [¹¹ C]glyburide en l'absence (ctrl) et en présence d'inhibiteurs des transporteurs (rif = rifampicine, CsA = ciclosporine) dans les différents tissus analysés chez le primate de 0 à 15 minutes (n = 2 dans chaque condition). -----	161

Figure 20 : Transfert du [¹¹ C]glyburide chez le primate du sang vers chacun des tissus évalué de 0 à 12 minutes en l'absence et en présence d'inhibiteurs des transporteurs (n = 2 dans chaque condition). -----	162
Figure 21 : Automated two-step radiosynthesis of [¹¹ C]glyburide. -----	170
Figure 22 : Imaging protocol of the clinical study with [¹¹ C]glyburide. -----	172
Figure 23 : [¹¹ C]glyburide metabolism in healthy volunteers in presence and absence of rifampicin (n = 3). -----	175
Figure 24 : Correlation of whole-blood concentrations of [¹¹ C]glyburide (kBq/cc) obtained with gamma counting of blood samples and PET imaging quantification in the baseline and the rifampicin-treated groups (n = 3). -----	176
Figure 25 : Whole-body PET images of [¹¹ C]glyburide distribution in baseline condition and after treatment with rifampicin (9 mg/kg IV) in a healthy volunteer. -----	176
Figure 26 : Time-activity curves obtained in different VOI after injection of [¹¹ C]glyburide in baseline conditions and after treatment with rifampicin (9 mg/kg IV). -----	178
Figure 27 : (A) AUC [¹¹ C]glyburide blood TAC measured from 0 to 30 minutes before and after injection of rifampicin (9 mg/kg IV) for each healthy volunteer. (B) CL _{urine} of [¹¹ C]glyburide at 30 minutes for each volunteer before and after injection of rifampicin (9 mg/kg IV). -----	179
Figure 28 : Evolution of the area-under the curves ratios for each tissue (AUC _{tissue} /AUC _{blood}) of [¹¹ C]glyburide TAC measured from 0 to 30 minutes for every healthy volunteers before and after injection of rifampicin (9 mg/kg IV). -----	181
Figure 29 : Représentation schématique de l'élimination hépatique et rénale du glyburide et de ses métabolites. -----	191

Liste des tableaux

Tableau 1 : Transporteurs OATP (SLCO) humains et leurs orthologues chez le rongeur. -----	36
Tableau 2 : Liste des principaux substrats endogènes des OATP. -----	41
Tableau 3 : Liste des principaux substrats exogènes des OATP. -----	43
Tableau 4 : Liste des principaux inhibiteurs des OATP. -----	49
Tableau 5 : Modifications du niveau d'expression des transporteurs dans certaines situations pathologiques. -----	58
Tableau 6 : Exemples d'interactions médicamenteuses d'impact clinique impliquant des médicaments substrats et inhibiteurs de OATP1B1 et/ou OATP1B3.-----	60
Tableau 7 : Substrats et inhibiteurs recommandés pour l'étude <i>in vitro</i> des transporteurs et sondes cliniques potentielles. -----	69
Tableau 8 : Exemples d'interactions relevées au niveau des transporteurs OATP2B1. -----	156

Liste des abréviations

ABC : ATP-Binding Cassette

AM : AcétoxyMéthyl

ANSM : Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des Produits de Santé

ASC (AUC) : Aire Sous la Courbe (Area Under the Curve)

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

ANOVA : ANalyse Of Variance

ANR : Agence Nationale de la Recherche

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

BBB : Blood-Brain Barrier

BCRP : Breast Cancer Resistance Protein

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

Bq : Becquerel

BSEP : Bile Salt Export Pump

¹¹C : carbone-11

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Energies Alternatives

CHO : Chinese Hamster Ovary

CL : clairance

C_{max} : Concentration maximale

CPP : Comité de Protection des Personnes

cps : coups par seconde

CsA : Ciclosporine A

CT : Computerized Tomography

CV : coefficient de variation

DTPA : Acide Diéthylène Triamine Penta Acétique

HEAS : Déhydroépiandrostérone

DDI : Drug-Drug Interaction

DILI : Drug-Induced Liver Injury

DME : Dossier de Médicament Expérimental
E17βG : Estradiol-17β-glucuronide
EMA : Agence Européenne du Médicament
EOB : EthOxyBenzyl
ES : Estrone-3-sulfate
¹⁸F : Fluor-18
FDG : FluoroDésoxyGlucose
FDA : Food and Drug Administration
F_b : Fraction liée aux protéines plasmatiques
g : gramme
⁶⁸Ga : Gallium 68
Gd : Gadolinium
GMP : Good Manufacturing Practice
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
HEK : Human Embryonic Kidney
HMG-CoA : Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Pression
IC₅₀ : Concentration Inhibant 50%
ICH : Conseil International d'Harmonisation
IDA : Acide IminoDiacétique
IDIF : Image-Derived Input Function (fonction d'entrée dérivée de l'image)
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITC : International Transporter Consortium
IV : Intra-Veineuse
keV : KiloElectronVolts
KO : Knock Out
K_{p_{uu}} : Rapport tissu/plasma des fractions libres à l'équilibre
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
MAG : MercaptoAcétyltriGlycine

MATE : Multidrug And Toxin Extrusion
MDCK : Madin-Darby Canine Kidney
MDR : MultiDrug Resistance
mol : mole
MR : Magnetic Resonance
MRP : Multidrug Resistance-associated Protein
NASH : Stéatose Hépatique Non Alcoolique
NBD : Nucleotide-Binding Domain
NME : New Molecular Entity
NOAEL : No Observed Adverse Effect Level
NTCP : Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide
OAT : Organic Anion Transporter
OATP : Organic Anion-Transporting Polypeptide
OCT : Organic Cation Transporter
PBPK : Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling
PET : Positron Emission Tomography
P-gp : P-glycoprotéine
pH : Potentiel Hydrogène
PK : Pharmacocinétique (pharmacokinetics)
PMDA : Agence Pharmaceutique et du Dispositif Médical
RIF : Rifampicin
ROI : Region of Interest
SC : Sous-Cutanée
SCH : Sandwich-Culture Hepatocyte
SLC : SoLute Carrier
SLCO : SoLute Carrier Organic
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography
SUR : SulfonylUrea Receptor

SUV : Standardized Uptake Value

T4 : Thyroxine

T3 : Triiodothyronine

^{99m}Tc : Technétium-99 Métastable

TAC : Courbe de l'Activité en fonction du Temps

TAP : Transporter of Antigen Presentation

TEMP : Tomographie par Émission Monophotonique

TEP : Tomographie par Émission de Positons

TMD : Domaine TransMembranaire

TQD : Tariquidar

T_{max} : Temps pour atteindre la C_{max}

TNF : Facteur de Nécrose Tumorale

TR⁻ : Transport Deficient

VOI : Volume Of Interest

V_T : Volume de distribution en imagerie TEP

Introduction et objectifs

L'organisme est constitué de compartiments tissulaires séparés par des interfaces biologiques qui assurent le maintien local de l'homéostasie. Ces interfaces sont principalement composées par des éléments cellulaires dont les membranes constituent des barrières hydrophobes, séparant physiquement les différents compartiments vis-à-vis de la diffusion des composés endogènes et exogènes. Les transporteurs membranaires sont des protéines qui régulent le transport de ces composés à travers ces membranes et contrôlent leurs concentrations de part et d'autre des membranes. De nombreux médicaments sont substrats de ces transporteurs membranaires qui sont aujourd'hui reconnus comme des déterminants majeurs du devenir des médicaments dans l'organisme (Giacomini et al., 2010; Klaassen and Aleksunes, 2010; Zolk and Fromm, 2011). D'un point de vue fonctionnel, les transporteurs peuvent être classés entre les transporteurs d'influx, faisant entrer les composés de façon facilitée selon le gradient de concentration, et les transporteurs d'efflux, permettant un transport actif et unidirectionnel primaire, grâce à l'énergie apportée par l'adénosine triphosphate (ATP). Les transporteurs d'influx appartiennent à la famille des transporteurs SoLute Carrier (SLC). Les transporteurs d'efflux, pour la plupart, sont regroupés dans la superfamille des transporteurs ATP-Binding Cassette (ABC), dont le représentant le plus étudié est la P-glycoprotéine (P-gp) (König et al., 2013).

On retrouve les transporteurs de médicaments au niveau de la plupart des interfaces biologiques de l'organisme, chacune présentant un profil d'expression qui la caractérise (Hagenbuch and Stieger, 2013). Certains transporteurs exprimés au niveau d'interfaces sang-tissu permettent de contrôler sélectivement l'exposition tissulaire vis-à-vis de composés potentiellement toxiques. C'est le cas par exemple des transporteurs exprimés au niveau des barrières hémato-encéphalique (BHE) ou materno-fœtale (Begley, 2004; Declèves et al., 2006; Gedeon et al., 2006; Hemauer et al., 2010; Knauer et al., 2013; Pollex et al., 2008; St-Pierre et al., 2000; Tournier et al., 2019). Les

transporteurs exprimés dans l'intestin, le foie et le rein ont une importance majeure dans la distribution et l'élimination des médicaments (Lepist and Ray, 2017; Morrissey et al., 2013; Müller and Fromm, 2011; Shitara et al., 2005; Yoshida et al., 2013; Zhang et al., 2011). Parmi ces transporteurs, la famille des Organic Anion-Transporting Polypeptide (OATP, également appelés SLCO) de la superfamille SLC, sont fortement exprimés au niveau du foie, où ils participent à l'élimination hépatobiliaire des médicaments, mais également dans le rein et au niveau d'autres interfaces biologiques où leur rôle est moins bien connu (Figure 1).

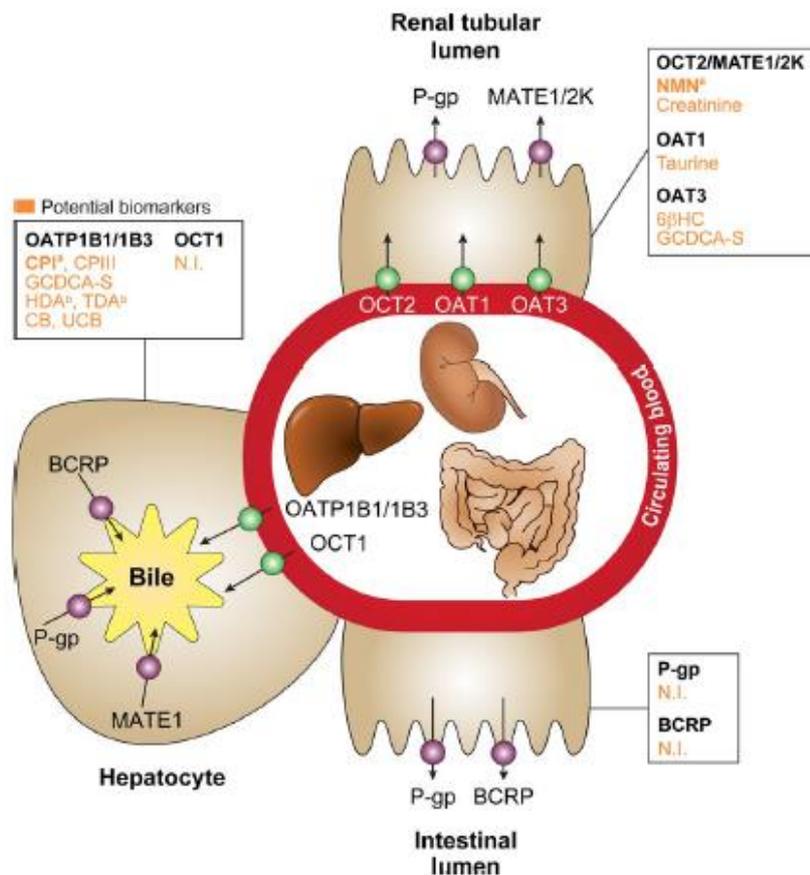


Figure 1 : Expression des différents transporteurs au niveau de l'intestin, du foie et du rein.

(Giacomini et al., 2018)

L'étude de l'expression et de l'impact fonctionnel des transporteurs membranaires à ces différentes interfaces est complexe. La quantification de l'expression protéique des transporteurs n'est possible que par des méthodes invasives peu envisageables chez l'Homme *in vivo*. L'exploration de l'impact fonctionnel des transporteurs sur la distribution des médicaments est limitée par le fait que les méthodes actuelles de pharmacocinétique ne permettent pas la quantification directe de la distribution du médicament dans les tissus. C'est pourtant au niveau tissulaire que s'exerce le plus souvent l'action pharmacologique ou toxique des médicaments. Plusieurs techniques d'imagerie sont actuellement en développement pour envisager l'étude de façon non invasive des transporteurs au niveau des interfaces biologiques. Ce domaine bénéficie largement des travaux pionniers réalisés pour le développement de sondes d'imagerie TEP permettant d'étudier le rôle de la P-gp, principalement par Tomographie par Émission de Positons (TEP).

L'objectif de ce travail de thèse a été de développer et proposer de nouvelles méthodes d'imagerie translationnelle permettant d'explorer d'autres transporteurs de médicaments *in vivo* au niveau d'interfaces biologiques complexes afin de mieux comprendre leurs répercussions fonctionnelles sur la distribution et l'élimination des médicaments chez l'animal puis chez l'Homme.

Chapitre I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Importance de la distribution tissulaire des médicaments en pharmacocinétique

L'activité pharmacologique d'un médicament nécessite d'atteindre des concentrations adéquates au niveau de son site d'action. Ainsi, la prédiction de la concentration d'un médicament au niveau tissulaire est souvent essentielle dans le développement clinique d'un médicament (Cook et al., 2014; Morgan et al., 2012). Cependant, la complexité des barrières biologiques de l'organisme fait qu'il est difficile de prédire l'exposition tissulaire des principes actifs et métabolites des médicaments à partir de leurs caractéristiques physico-chimiques. Cela nécessite la mise en œuvre de protocoles de pharmacocinétique expérimentale permettant de démontrer la capacité du médicament à atteindre les tissus cibles. La mesure de la concentration des médicaments dans les tissus d'intérêt est souvent complexe car elle nécessite leur prélèvement et des dosages destructifs. Ainsi, les concentrations tissulaires sont la plupart du temps estimées à partir des concentrations plasmatiques, plus accessibles à la mesure. Cependant, la diffusion de solutés d'un tissu à l'autre obéit à des mécanismes complexes. La prise en compte exclusive des données de concentrations plasmatiques dans les modèles pharmacocinétiques peut donc conduire à une mauvaise estimation de l'exposition tissulaire. L'exposition tissulaire d'un principe actif dépend de plusieurs facteurs comme son métabolisme, ses propriétés physico-chimiques, la perméabilité des membranes biologiques concernées ou encore la présence de transporteurs d'influx ou d'efflux au niveau des interfaces biologiques (Rizk et al., 2017).

Différentes méthodes quantitatives ont été développées pour déterminer la concentration tissulaire des principes actifs, notamment chez l'animal. Ces techniques ont permis de mieux connaître l'implication des transporteurs dans la distribution tissulaire et l'élimination des médicaments (Foti et al., 2015). L'étude des transporteurs membranaires a également bénéficié du développement de modèles cellulaires dont l'objectif est de mimer la structure et la fonction des interfaces biologiques *in vitro*. La

standardisation de ces modèles *in vitro* a permis le développement de modèles pharmacocinétiques (modèles PBPK, « *physiologically-based pharmacokinetic model* ») qui constituent une approche quantitative aidant à la prédiction de la distribution des médicaments et à l'évaluation de facteurs pouvant moduler cette distribution (Jones et al., 2012a; Rowland, 2013; Rowland et al., 2015).

La modélisation pharmacocinétique considère la plupart des sites d'action comme des compartiments propres et vise à établir un lien entre la pharmacocinétique plasmatique et l'exposition tissulaire. Il faut cependant rester prudent dans certaines situations, notamment dans les situations complexes comme celles faisant intervenir les transporteurs membranaires (Rizk et al., 2017).

Les transporteurs membranaires participent aux phénomènes d'absorption, de distribution et d'élimination des médicaments et représentent donc des déterminants majeurs de leur pharmacocinétique (König et al., 2013). Les transporteurs peuvent agir comme une barrière protectrice pour certains tissus, en permettant l'efflux de xénobiotiques et limitant l'exposition tissulaire ou, au contraire, participer à l'accumulation de médicaments dans certains tissus où sont exprimés des transporteurs d'influx. Pour ces raisons, il est important de disposer d'outils permettant de mieux comprendre le rôle précis de chacun des transporteurs en pharmacocinétique afin d'améliorer la prédiction de la distribution des médicaments vers leur site d'action ou vers les tissus vulnérables.

2. Implication des transporteurs en pharmacocinétique

2.1. Les transporteurs ATP-Binding Cassette (ABC)

La superfamille des transporteurs ABC regroupe 8 familles classées en fonction de leurs homologies de séquence d'acides aminés et leur phylogénie (Alexander et al., 2019; Dean and Annilo, 2005; Dean et al., 2001). Selon la nomenclature HUGO du Gene Nomenclature Committee (www.genenames.org), elles sont nommées de ABCA à ABCG et chaque membre de la famille est identifié individuellement avec un chiffre à

la fin des quatre lettres. Les transporteurs ABC sont composés pour la plupart de deux sous-unités comportant chacune six domaines transmembranaires (TMD) et associées chacune à un site de fixation de l'ATP (NBD : Nucleotide-Binding Domain) (Lazarowski et al., 2007). Certains transporteurs ABC (ABCD, ABCG) sont des « demi-transporteurs » avec seulement un seul domaine transmembranaire et son site de fixation à l'ATP, et nécessitent de s'associer pour former une unité fonctionnelle. A l'inverse, d'autres transporteurs (certains ABCC) possèdent un domaine transmembranaire supplémentaire (Chen et al., 2016; Liu, 2019). L'expression de ces protéines est ubiquitaire et l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP fixée sur le NBD permet le transport actif d'une grande variété de substrats incluant les ions, lipides, peptides et stéroïdes. Les trois familles d'intérêt en pharmacologie sont ABCB, ABCC et ABCG, dont certains membres participent à l'efflux de médicaments au niveau de différentes interfaces de l'organisme.

2.1.1. La famille MDR (ABCB)

La famille ABCB, également appelée MDR (Multidrug resistance) est composée de 11 représentants dénommés ABCB1 à ABCB11 et codés par les gènes *ABCB1* à *ABCB11* (Alexander et al., 2019; Dean and Annilo, 2005; Dean et al., 2001). Parmi les transporteurs d'intérêt, TAP1 et TAP2 (Transporter of Antigen Presentation, ABCB2, ABCB3) transportent les peptides vers le réticulum endoplasmique, participant à la réponse immune adaptative (Seyffer and Tampé, 2015) ; MDR3 (ABCB4, PGY3) assure le transport des phospholipides vers le milieu extracellulaire ; la BSEP (Bile Salt Export Pump, ABCB11) permet l'efflux des sels biliaires de l'hépatocyte vers la bile au niveau de son interface canaliculaire (König et al., 2013). La BSEP est indispensable au bon fonctionnement de l'efflux biliaire et participe également au transfert du foie vers les voies biliaires de certains médicaments comme les statines (Hirano et al., 2005). L'inhibition ou le dysfonctionnement de ce transporteur peut conduire à des phénomènes de cholestase pouvant avoir pour conséquences des lésions

hépatotoxiques d'origine parfois médicamenteuse (DILI : drug-induced liver injury) (Keppler, 2011a; Yang et al., 2019).

Le représentant le plus étudié de cette famille est la P-glycoprotéine (ABCB1), nommée également Multidrug resistance protein 1 (MDR1) car elle a d'abord été découverte dans des cellules cancéreuses où elle participait aux phénomènes de pharmacorésistance aux chimiothérapies (Schinkel et al., 1995). On sait aujourd'hui que son expression est également physiologique et que de nombreux substrats à la fois endogènes (stéroïdes, lipides, acides biliaires, bilirubine) et exogènes, parmi lesquels beaucoup de médicaments, sont transportés par cette protéine d'efflux. Les classes thérapeutiques dont la pharmacocinétique est influencée par cette protéine sont très nombreuses et diverses : médicaments anticancéreux (docétaxel, étoposide, vincristine), immunosuppresseurs (ciclosporine, tacrolimus), antibiotiques (macrolides), statines (atorvastatine, lovastatine), digoxine, β -bloquants (Cascorbi and Haenisch, 2010; Fromm, 2004; Löscher and Potschka, 2005). La P-gp est exprimée au niveau de plusieurs interfaces biologiques dont l'intestin, le rein, le foie, le cerveau et le placenta (Figure 1). On la retrouve du côté apical de ces barrières, assurant ainsi l'efflux de ses substrats du milieu intracellulaire vers le compartiment extracellulaire. La P-gp est par exemple exprimée au niveau de la membrane apicale de l'intestin, du duodénum au rectum, avec une expression prédominante dans les entérocytes de l'intestin grêle où elle limite l'absorption de ses substrats administrés par voie orale (Canaparo et al., 2007). La P-gp participe également à l'élimination des médicaments car elle est exprimée au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes ainsi que sur la membrane luminale des cellules du tube proximal rénal où elle participe à l'excrétion des médicaments respectivement vers la bile et vers les urines (Thiebaut et al., 1987). Aussi, la P-gp joue un rôle important au niveau de la BHE, où elle exerce un mécanisme de défense, empêchant la diffusion de composés toxiques endogènes et exogènes (toxines et xénobiotiques) vers le système nerveux central (Fromm, 2000; Tournier et al., 2019). Ainsi, la P-gp est un transporteur majeur en pharmacocinétique et constitue

un site important d'interactions médicamenteuses d'origine pharmacocinétique entre des médicaments substrats et inhibiteurs de ce transporteur.

2.1.2. La famille MRP (ABCC)

La famille ABCC est composée de 13 transporteurs dont 9 sont nommés MRP (multidrug resistance-associated protein) : MRP1 à MRP9 correspondent aux protéines ABCC1 à ABCC6 puis ABCC10 à ABCC12 (Alexander et al., 2019; Dean et al., 2001). Parmi les autres transporteurs de la famille on retrouve SUR1 et SUR2 (ABCC8 et ABCC9), le premier étant connu pour être le site de fixation des sulfonyles (SUR : Sulfonylurea receptor), une classe d'antidiabétiques hypoglycémisants comme le glyburide. L'expression de ces protéines est codée par les gènes *ABCC1* à *ABCC13*.

Le plus important représentant de cette classe en pharmacocinétique est le transporteur MRP2 (ABCC2). Ce transporteur est surtout exprimé au niveau du foie mais aussi, dans une moindre mesure, au niveau des reins, de l'intestin grêle et du placenta (Figure 1) (Büchler et al., 1996; Fromm, 2000; Rost et al., 2001; Schaub et al., 1999; St-Pierre et al., 2000). Sa localisation au pôle apical des cellules composant ces interfaces lui permet d'exercer une fonction d'excrétion de ses substrats vers la bile, les urines et la lumière intestinale. Ceux-ci sont à la fois endogènes (bilirubine, œstradiol, leucotriènes) (Cui et al., 1999; Kamisako et al., 1999) mais aussi exogènes avec beaucoup de médicaments et leurs métabolites (statines, méthotrexate, melphalan) (Barnouin et al., 1998; Keppler, 2011b; Masuda et al., 1997; Nies and Keppler, 2007; Yamazaki et al., 1997).

2.1.3. La BCRP (ABCG2)

La Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2) est le mieux connu des transporteurs ABCG en pharmacologie, codé par le gène *ABCG2*. La BCRP est également exprimée par de nombreux tissus de l'organisme comme l'intestin, le foie, les reins et le cerveau (Figure 1) mais aussi les testicules et le placenta (Maliepaard et al., 2001). Sa localisation sur le pôle apical des cellules lui permet lui aussi de jouer un

rôle d'efflux vers le compartiment extracellulaire. Elle participe également au transport de composés endogènes (vitamine K3, estrone, acide urique) (Shukla et al., 2008; Woodward et al., 2009) et de certains médicaments. Plusieurs principes actifs ont été identifiés comme substrats de cette protéine de transport parmi lesquels des antiviraux (aciclovir), des statines (pravastatine, rosuvastatine), des médicaments anticancéreux (topotécan), des antibiotiques (ciprofloxacine, ofloxacine), mais aussi des anti-inflammatoires (diclofenac) (Ando et al., 2007; Huang et al., 2006; Jonker et al., 2005; Lagas et al., 2009; Maliepaard et al., 1999; Matsushima et al., 2005). La plupart des substrats de la BCRP sont également substrats de la P-gp. L'association synergique de ces deux transporteurs au niveau de nombreuses interfaces biologiques offre donc un double niveau de protection (Huls et al., 2009).

2.2. Les transporteurs Solute Carrier (SLC)

La superfamille des transporteurs SLC comprend chez l'Homme 52 familles regroupant plus de 400 transporteurs ayant une grande diversité de structures (César-Razquin et al., 2015; Lin et al., 2015). Le site du Hugo Gene Nomenclature Committee (www.genenames.org) recense la liste des gènes codant les transporteurs de cette superfamille. Pour appartenir à la superfamille de SLC, un transporteur doit avoir au moins 20-25% de sa séquence d'acides aminés commune aux autres membres. La nomenclature de ces transporteurs commence par les lettres SLC suivies par un nombre correspondant à la famille, puis une lettre correspondant à la sous-famille, elle-même suivie par un autre nombre identifiant le transporteur (Hediger et al., 2013). La famille SLC1 par exemple regroupe les transporteurs d'acides aminés. La sous-famille SLC1A contient différents transporteurs du glutamate nommés SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3... (Alexander et al., 2019) D'un point de vue fonctionnel, on peut distinguer les transporteurs nécessitant un gradient ionique (sodium, chlorure et protons en particulier), les échangeurs de substrats, et ceux permettant seulement l'équilibre des substrats de part et d'autre de la membrane (Höglund et al., 2011). Cependant, beaucoup de familles se recoupent au niveau des substrats qu'elles transportent, étant

donné leurs similarités (Lin et al., 2015). Cette superfamille a été identifiée plus récemment que la superfamille ABC. La plupart des protéines SLC ne sont pas encore bien caractérisées et leurs rôles physiologiques n'ont pas encore été complètement élucidés. L'intérêt de certains transporteurs ayant un impact sur la pharmacocinétique des médicaments a toutefois été identifié. Parmi ceux-ci, les plus étudiés sont les transporteurs anioniques et cationiques OAT/OCT (SLC22), les transporteurs Organic Anion-Transporting Polypeptide OATP (SLC21 également appelés SLCO) et le transporteur MATE1 (SLC47), exerçant plutôt un transport d'efflux bien qu'appartenant à la famille SLC. Ces transporteurs apportent des perspectives nouvelles en pharmacologie (Estudante et al., 2016).

2.2.1. La famille MATE (SLC47)

La famille des « multidrug and toxin transporters » (MATE) est composée des 2 transporteurs MATE1 (SLC47A1) et MATE2 (SLC47A2) codés par les gènes *SLC47A1* et *SLC47A2*. Bien qu'appartenant à la superfamille SLC, composée majoritairement de transporteurs d'influx, MATE1 et MATE2 vont plutôt assurer un transport d'efflux, compte tenu de leur mécanisme d'action. Ces transporteurs sont des échangeurs fonctionnant avec un antiport de protons qui va permettre d'effluer différents substrats, principalement des cations organiques, parmi lesquels certains médicaments (Zhang and Wright, 2009). Etant donné la nature de leurs substrats, certains sont communs aux transporteurs cationiques OCT (Nies et al., 2011). Les substrats endogènes de ces deux transporteurs incluent la guanidine, la thiamine, le *N*-methylnicotinamide et la créatinine (Damme et al., 2011). Plusieurs dizaines de médicaments ont également été identifiés comme substrats de ces transporteurs, parmi lesquels la cimétidine, la quinidine, l'aciclovir, la metformine et le topotécan (Tanihara et al.). Le transport d'efflux par MATE1 et MATE2 participe à leur élimination hépatique et rénale. En effet, MATE1 est fortement exprimé sur la membrane canaliculaire des hépatocytes et sur la bordure en brosse des cellules proximales rénales, alors que MATE2 n'est en revanche exprimé que dans les reins (Dresser et al.,

2001; Otsuka et al., 2005). Ils sont parfois également exprimés, mais plus faiblement, dans d'autres tissus comme le côlon, les testicules ou les glandes surrénales (Otsuka et al., 2005).

2.2.2. La famille OAT/OCT (SLC22)

La famille SLC22 est composée de 23 membres que l'on peut regrouper par la nature des substrats qu'ils transportent. Les principaux transporteurs d'intérêt pour les médicaments sont les transporteurs d'anions (OAT) et les transporteurs de cations (OCT), mais parmi les autres membres de la famille on peut également citer les transporteurs d'urate URAT1 (SLC22A12) (Enomoto et al., 2002).

2.2.2.1. Les transporteurs OAT

Quatre de ces transporteurs interviennent dans la pharmacocinétique de certains médicaments : OAT1 (SLC22A6), OAT2 (SLC22A7), OAT3 (SLC22A8) et OAT4 (SLC22A11), codés respectivement par les gènes *SLC22A6*, *SLC22A7*, *SLC22A8*, *SLC22A11* (VanWert et al., 2010). OAT1 est exprimé dans différents tissus avec une localisation prédominante dans le rein au niveau de la membrane basolatérale des cellules du tube proximal (Figure 1) (Hosoyamada et al., 1999). OAT2 est également retrouvé dans le rein avec la même localisation que OAT1, mais cette protéine est principalement exprimée dans le foie (Enomoto et al., 2002; Sekine et al., 1997). OAT3 et OAT4 sont également retrouvés au niveau rénal. OAT3 est lui aussi exprimé sur la membrane basolatérale des cellules tubulaires proximales alors que OAT4 est retrouvé sur la membrane luminale de ces cellules (Figure 1) (Babu et al., 2002; Cha et al., 2001). Dans les conditions physiologiques, les transporteurs OAT agissent par un échange d'anion organique contre un dicarboxylate (Burckhardt and Burckhardt, 2011). L'ensemble de ces transporteurs a une très grande variété de substrats, parmi lesquels plusieurs métabolites endogènes pouvant également parfois les inhiber comme la guanosine monophosphate sodique, des intermédiaires du cycle de dégradation de l'acide citrique (ion dicarboxylate), des sels biliaires ou des dérivés d'hormones (Cropp et al., 2008; König et al., 2013). Beaucoup de médicaments ont également été identifiés

comme substrats ou inhibiteurs de ces transporteurs (Mor et al., 2018). OAT1 est le mieux connu et beaucoup de ses substrats sont aujourd'hui identifiés, parmi lesquels les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (captopril par exemple), certains diurétiques (furosémide), antibiotiques et antiviraux (ganciclovir) (Riedmaier et al., 2012). La plupart des substrats transportés par OAT2 et OAT3 sont communs à OAT1 (certains inhibiteurs de l'enzyme de conversion, diurétiques, antibiotiques). OAT3 présente néanmoins la particularité de transporter des statines (rosuvastatine et pravastatine), ce qui n'est pas le cas de OAT1 ni OAT2 (Hasegawa et al., 2002). Plusieurs statines agissent en revanche comme inhibiteurs de ces trois transporteurs (Khamdang et al., 2004; Yamada et al., 2007; Yuan et al., 2009). Seulement quelques médicaments ont été identifiés comme substrats de OAT4, parmi lesquels le méthotrexate (Takeda et al., 2002). Etant donné la grande variété des substrats des transporteurs OAT, des interactions médicamenteuses sont fréquentes à leur niveau, en particulier lorsqu'il s'agit de médicaments éliminés par les OAT rénaux. L'interaction du probénécide avec le méthotrexate par exemple, connue depuis la fin des années 1970 (Aherne et al., 1978b, 1978a), n'a été expliquée que 30 ans plus tard par l'inhibition du transport OAT1 et OAT3 du méthotrexate par le probénécide (Nozaki et al., 2007).

2.2.2.2. Les transporteurs OCT

En plus des transporteurs OAT, la famille SLC22 comprend les transporteurs cationiques OCT, souvent associés aux transporteurs de zwitterions OCTN (Roth et al., 2012). Les transporteurs d'intérêt en pharmacologie sont OCT1 (SLC22A1), OCT2 (SLC22A2), OCT3 (SLC22A3) codés par les gènes *SLC22A1*, *SLC22A2*, *SLC22A3*, ainsi que OCTN1 (SLC22A4) et OCTN2 (SLC22A5) codés par les gènes *SLC22A4* et *SLC22A5*.

OCT1 est une protéine très largement retrouvée, avec une expression importante dans le foie et plus modérée dans d'autres tissus comme la rate ou les poumons (Gorboulev et al., 1997). L'expression de OCT2 concerne moins de tissus mais on la retrouve de façon importante dans les cellules rénales proximales (Gorboulev et al., 1997). A la différence de OAT1 et OAT2 qui sont majoritairement exprimés dans des organes

d'élimination, l'expression de OCT3 est ubiquitaire. Il est lui aussi retrouvé dans le foie et dans les reins mais on le retrouve dans nombre d'autres tissus comme le myocarde, les muscles squelettiques, les poumons, les intestins, le placenta (Hayer-Zillgen et al., 2002). Ces trois transporteurs OCT transportent un grand nombre de cations organiques aux structures moléculaires très diverses. Leur transport est indépendant du pH et du sodium puisqu'il s'agit d'une diffusion facilitée et réversible, dans le sens du gradient électrochimique (Roth et al., 2012). Plusieurs composés endogènes ont été identifiés substrats de ces transporteurs OCT comme des neurotransmetteurs (dopamine, adrénaline, noradrénaline, sérotonine) ou des hormones (testostérone, progestérone, corticostérone) (Koepsell et al., 2007). Beaucoup de médicaments sont aussi transportés comme des anesthésiques (kétamine), des β -bloquants (propranolol), des antidépresseurs (citalopram) ou des médicaments antidiabétiques (metformine) (Nies et al., 2011).

L'activité des transporteurs OCTN peut en revanche être modulée par un gradient de proton ou de sodium, selon le substrat transporté. OCTN1 et OCTN2 sont très largement exprimés dans l'organisme, avec une prédominance de OCTN1 qui est exprimé principalement dans les reins, la trachée et la moelle osseuse et, de façon moins importante, dans les muscles squelettiques, la prostate, les poumons, le pancréas, le placenta, l'utérus, le myocarde, la rate et la moelle épinière (Tamai et al., 1997). Cependant, ces deux transporteurs sont importants en pharmacocinétique puisqu'on les retrouve à plusieurs interfaces clés comme la membrane des entérocytes et la membrane apicale des cellules rénales proximales (Koepsell, 2013; Tamai et al., 1997; Wu et al., 1998). Plusieurs médicaments sont substrats de ces transporteurs comme c'est le cas de l'antagoniste calcique vérapamil par exemple (Yabuuchi et al., 1999).

2.2.3. La famille OATP (SLC21/SLCO)

Les transporteurs Organic Anion-Transporting Polypeptide composent la famille 21 des transporteurs SLC (SLC21), également appelée famille des transporteurs solute carrier organic anion (SLCO). Ils sont codés par les gènes *SLCO* chez l'Homme et *S/co* chez les autres espèces (Hagenbuch and Meier, 2004). Les premiers OATP ont été identifiés et isolés en 1994 à partir de foies de rats clonés (Jacquemin et al., 1994). Dans les années qui ont suivi, de nombreux autres OATP ont été identifiés chez le rat mais aussi chez l'Homme et beaucoup d'autres espèces animales (Brown et al., 2007; Geyer et al., 2004; Hagenbuch and Meier, 2004; Mikkaichi et al., 2004; Nakao et al., 2006).

2.2.3.1. Nomenclature

La plupart des OATP ont été nommés au fur et à mesure de leur découverte de façon isolée par chacune des équipes qui les étudiaient (Tableau 1). Étant donné la difficulté et la confusion liées à ces dénominations hétéroclites, une nouvelle classification indépendante des espèces a été proposée et approuvée par le Gene Nomenclature Committee HUGO. Selon cette nomenclature, les transporteurs OATP sont aujourd'hui classés en fonction de leurs séquences d'acides aminés dans chaque famille et sous-famille (Figure 2).

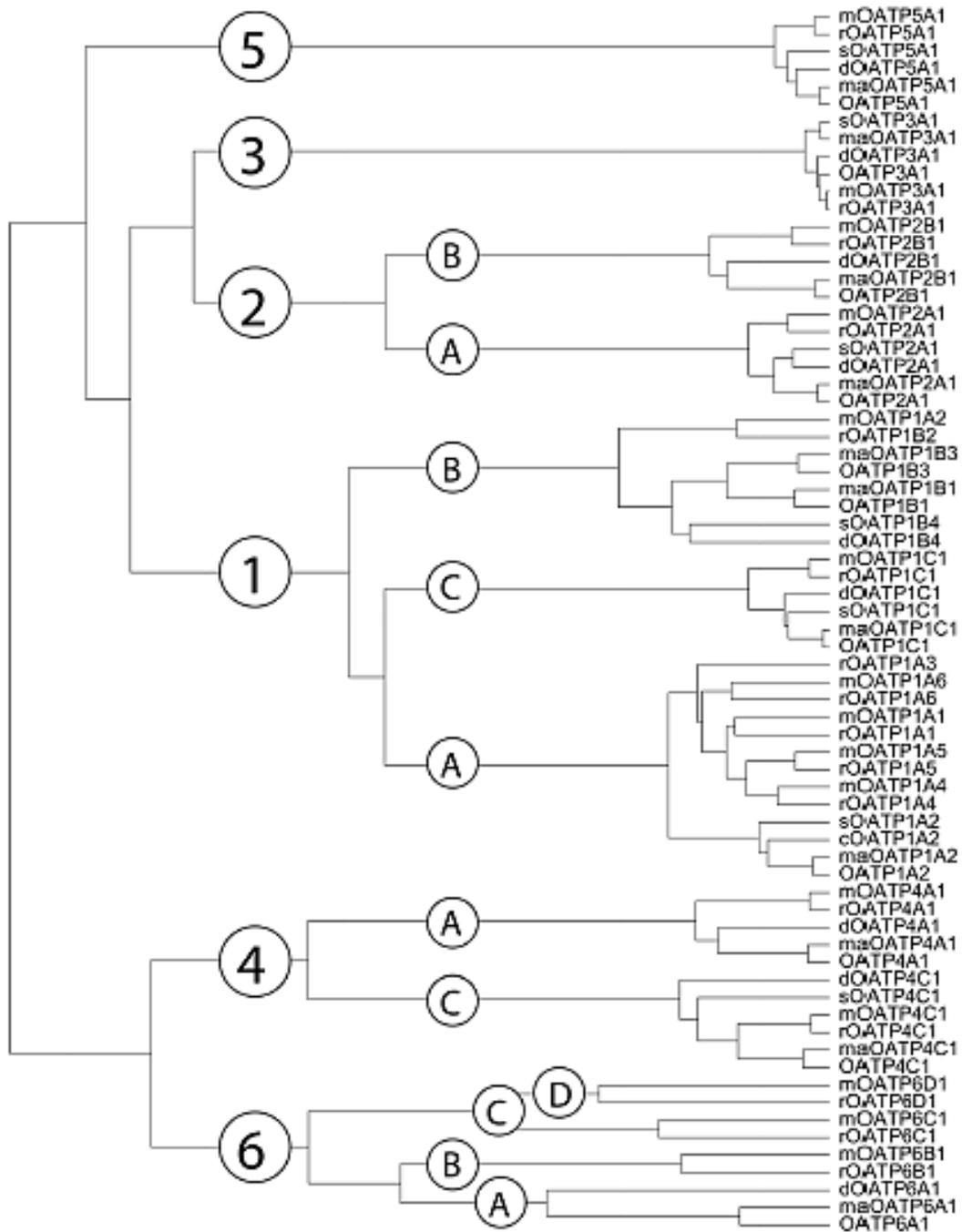


Figure 2 : Arbre phylogénétique de la famille OATP.

Les transporteurs OATP en lettre capitale sont chez l'Homme, maOATP chez le singe, dOATP chez le chien, sOATP chez le cochon, rOATP chez le rat et mOATP chez la souris (Hagenbuch and Stieger, 2013)

Les protéines présentant au moins 40% d'homologie dans leurs séquences d'acides aminés sont groupées dans chacune des 6 familles OATP1, OATP2, OATP3, OATP4, OATP5 et OATP6 ; celles dont l'homologie est de 60% ou plus sont regroupées en sous-familles en ajoutant une lettre à chaque famille (par exemple OATP1A, OATP1B, OATP1C) (Hagenbuch and Meier, 2004). Au sein de ces sous-familles, chaque OATP est identifié individuellement par un nombre, dans l'ordre chronologique de leur découverte (OATP1B1 par exemple est le premier transporteur OATP découvert dans la sous-famille OATP1B). Si un orthologue existe déjà, le nombre donné doit être le même et le symbole doit toujours être donné en lettre capitales quand il s'agit des protéines, qu'elles soient humaines ou animales. En revanche, le symbole du gène correspondant doit commencer par *SLCO* pour les gènes humains et *Slco* pour les autres (toujours en italique), avec le même numéro de famille, lettre de sous-famille et nombre chronologique que la protéine correspondante (par exemple les gènes *SLCO2B1* humains et *Slco2b1* du rongeur codent pour les protéines SLCO2B1 de l'Homme et du rongeur) (Tableau 1) (Hagenbuch and Gui, 2008).

Tableau 1 : Transporteurs OATP (SLCO) humains et leurs orthologues chez le rongeur.

(Marie et al., 2017)

Humain			Rongeur		
Gènes	Protéines	Alias	Gènes	Protéines	Alias
<i>SLCO1A2</i>	SLCO1A2	SLC21A3, OATP-A	<i>Slco1a1</i>	Slco1a1	Slc21a1, Slc21a3, Oatp1
			<i>Slco1a3</i>	Slco1a3 (rat only)	Slco21a4, OAT-K1, OAT-K2, OAT-K3, OAT-K5, OAT-K6, OAT-K7, OAT-K8, OAT-K9, OAT-K11, OAT-K13, OAT-K14
			<i>Slco1a4</i>	Slco1a4	Slc21a5, Oatp2
			<i>Slco1a5</i>	Slco1a5	Slc21a7, Oatp3
			<i>Slco1a6</i>	Slco1a6	Slc21a13, Oatp5
<i>SLCO1B1</i>	SLCO1B1	SLC21A6, HBLR, LST-1, OATP2, OATP-C	<i>Slco1b2</i>	Slco1b2	Slc21a6, Slc21a10, Oatp4, lst-1
<i>SLCO1B3</i>	SLCO1B3	SLC21A8, LST-2, LST-3, HBLRR, OATP8, LST-3TM13			
<i>SLCO1C1</i>	SLCO1C1	SLC21A14, OATP1, OATP-F, OATP14, OATP-RP5	<i>Slco1c1</i>	Slco1c1	Slc21a14, Oatp14, Oatpf, Bsat1
<i>SLCO2A1</i>	SLCO2A1	SLC21A2, PGT, MATR1, PHOAR2	<i>Slco2a1</i>	Slco2a1	Slc21a2, Pgt, Matr1
<i>SLCO2B1</i>	SLCO2B1	SLC21A9, OATP-B	<i>Slco2b1</i>	Slco2b1	Slc21a9, moat1
<i>SLCO3A1</i>	SLCO3A1	SLC21A11, OATP-D, OATP-RP3	<i>Slco3a1</i>	Slco3a1	Slc21a11, Anr1, MJAM
<i>SLCO4A1</i>	SLCO4A1	SLC21A12, OATP1, OATP-E, OATP-RP1, POAT	<i>Slco4a1</i>	Slco4a1	Slc21a12
<i>SLCO4C1</i>	SLCO4C1	SLC21A20, OATP-H, OATPX, OATP-M1, PRO2176	<i>Slco4c1</i>	Slco4c1	Slc21a20, Oatp-H, Oatp-M1, Oatp-R, PRO2176
<i>SLCO5A1</i>	SLCO5A1	SLCO21A15, OATP-J, OATP-RP4	<i>Slco5a1</i>	Slco5a1 (mouse only)	
<i>SLCO6A1</i>	SLCO6A1	OATP-I, OATPY, GST, CT48	<i>Slco6b1</i>	Slco6b1	Tst1, GST-1
			<i>Slco6c1</i>	Slco6c1	GST-2
			<i>Slco6d1</i>	Slco6d1	4921511I05Rik

Plus de 300 membres ont aujourd'hui été identifiés comme appartenant à la famille OATP, parmi plus de 40 espèces. La famille OATP1 est la plus vaste, suivie par OATP6 (Figure 2). La famille OATP3 est la mieux conservée avec une homologie de séquence d'acides aminés entre 94 et 99% alors que la famille OATP6 est la plus divergente. Par ailleurs, aucun OATP n'a été retrouvé chez les bactéries ou les levures, suggérant que les transporteurs OATP sont spécifiques au règne animal (Hagenbuch and Stieger, 2013). Parmi ces 6 familles, 11 OATP humains ont été identifiés : OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2A1, OATP1C1, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1, OATP4C1, OATP5A1, OATP6A1 (Tableau 1).

2.2.3.2. Structure des transporteurs

Les OATP humains contiennent environ 650 à 700 acides aminés et sont composés de 12 domaines transmembranaires, dont les deux extrémités N et C-terminales sont situées du côté intracellulaire de la membrane dans laquelle ils sont enchâssés (Figure 3).

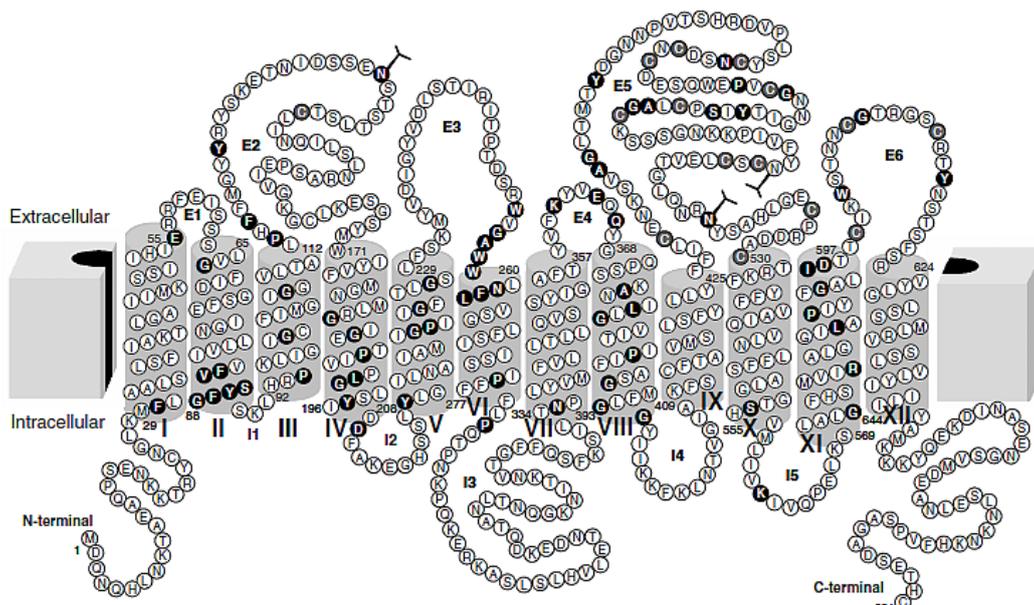


Figure 3 : Structure secondaire du transporteur OATP1B1.

(Hagenbuch and Gui, 2008)

Les deuxième et cinquième boucles, situées du côté extracellulaire de la membrane, contiennent plusieurs sites de N-glycosylation, qui varient selon les protéines et affectent la localisation du transporteur sur la membrane plasmique et l'efficacité du transport (Hagenbuch and Meier, 2004; Wang et al., 2008; Yao et al., 2012). La boucle 5, dont la taille est importante, a conservé 10 résidus cystéine qui sont impliqués dans la formation de ponts disulfures, indispensables à l'expression d'une protéine fonctionnelle sur la membrane plasmique (Hänggi et al., 2006; Wang et al., 2008). La partie la mieux conservée, qui est en quelque sorte la « signature » de la famille OATP, se trouve à cheval sur le bord de la boucle extracellulaire 3 et le domaine transmembranaire 6 (Figure 3). Cette séquence contient 3 résidus tryptophane conservés et peut être utilisée pour identifier de nouveaux OATP. Toutefois, aucun rôle propre à cette séquence n'a été identifié à l'heure actuelle.

Aucune donnée d'étude cristallographique n'étant disponible sur ces protéines, des modélisations d'homologie ont été réalisées afin d'en prédire leur structure tridimensionnelle (Figure 4).

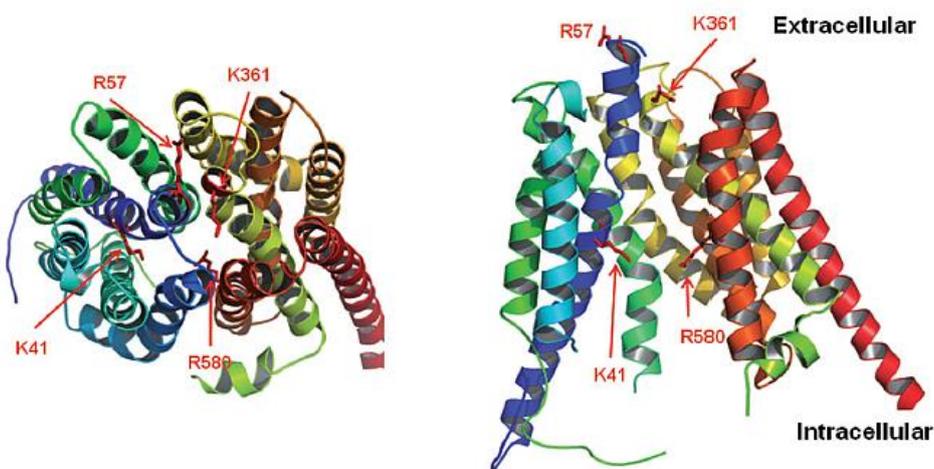


Figure 4 : Structure tridimensionnelle du transporteur OATP1B1.

(Roth et al., 2012)

Plusieurs équipes ont complété ces travaux par des études de mutagénèses dirigées vers certains sites de la protéine afin de déterminer quelles structures ou quelles séquences d'acides aminés sont importantes au bon fonctionnement du transporteur. Ces modèles ont permis d'identifier plusieurs séquences conservées d'acides aminés chargés positivement nécessaires au transport des substrats (R57, K361, R580) (Weaver and Hagenbuch, 2010). D'autres études ont permis d'identifier dans les domaines transmembranaires de nouvelles séquences importantes pour l'expression des protéines et le transport de leur substrat (parmi lesquels les domaines 8, 9 et 10 pour OATP1B1) (Gui and Hagenbuch, 2009; Miyagawa et al., 2009). Une étude a démontré que lorsque trois acides aminés de OATP1B1 (A45, L545, T615) étaient remplacés par les résidus correspondants de OATP1B3, OATP1B1 devenait capable de transporter la cholécystokinine-8, qui est pourtant un substrat spécifique de OATP1B3, ce qui suggère que ces acides aminés sont impliqués dans la reconnaissance et le transport des substrats de OATP1B3 (DeGorter et al., 2012a).

2.2.3.3. Mécanisme du transport OATP

Le mécanisme de transport des OATP n'est pas totalement élucidé mais il est avéré qu'il s'agit d'un mécanisme indépendant du sodium et de l'ATP. Les OATP permettent le transport bidirectionnel de composés et il est probable qu'ils agissent comme des échangeurs d'anions (Hagenbuch and Gui, 2008). Une étude a suggéré que les substrats étaient transportés au centre de l'OATP par une sorte de pore chargé positivement qui jouerait le rôle de « commutateur à bascule » entre le substrat et la substance intracellulaire (Meier-Abt et al., 2006). Il a été mis en évidence que cet échange de substrats se fait contre des bicarbonates intracellulaires, du glutathion ou ses composés conjugués. Il existe cependant certaines spécificités comme par exemple le transport par OATP1B1 et OATP1B3 qui n'est pas dépendant du glutathion (Franco and Cidlowski, 2006; Leuthold et al., 2009; Li et al., 1998, 2000; Mahagita et al., 2007; Satlin et al., 1997). Le pH (potentiel hydrogène) joue également un rôle dans le transport OATP puisqu'il a été montré que la captation des substrats de certains OATP

était augmentée lorsque le pH extracellulaire était faible (Hagenbuch and Stieger, 2013). C'est par exemple le cas pour OATP2B1 qui est exprimé en particulier dans l'intestin grêle où le pH est relativement acide, ce qui améliore sa capacité de transport au niveau de la barrière intestinale (Varma et al., 2011). En plus de la variabilité liée au pH, des modulations de la capacité de transport des OATP liées à l'action d'un substrat sur un autre substrat ont été mises en évidence (Grube et al., 2006a; Sugiyama et al., 2002). Cependant, chaque OATP a plusieurs sites de fixation pour ses substrats, qui peuvent interagir entre eux ou pas, ce qui rend extrêmement complexe la compréhension du mécanisme de transport précis de chaque OATP vis-à-vis de la grande diversité de leurs substrats.

2.2.3.4. Spécificités des substrats des OATP

Bien que la majorité des substrats des OATP soient des anions, certains d'entre eux peuvent également transporter des composés neutres voire des cations, généralement de poids moléculaire supérieur à 350 kDa (Bossuyt et al., 1996). Des études *in vitro* ont mis en évidence que les OATP partagent un certain recouvrement dans le spectre de leurs substrats (König et al., 2013). Les substrats endogènes sont nombreux et variés : acides biliaires, hormones thyroïdiennes, stéroïdes conjugués, bilirubine, prostaglandines, leucotriènes, cholécystokinine, peptides (Tableau 2). De ce fait, les transporteurs OATP sont des acteurs essentiels de la régulation de certains processus physiologiques comme l'homéostasie des acides biliaires, l'élimination de la bilirubine, la régulation des hormones thyroïdiennes ou les processus inflammatoires (Hagenbuch and Stieger, 2013; Roth et al., 2012).

Tableau 2 : Liste des principaux substrats endogènes des OATP.

(d'après Kovacsics et al., 2016)

OATP1A2	Sels biliaires (taurocholate, cholate, acide ursodeoxycholique) Bilirubine Hormones (T4, DHEAS, ES) Prostaglandine E2 Neuropeptides : substance P, vasoactive intestinal peptide
OATP1B1	Sels biliaires (taurocholate, tauroursodeoxycholate) Bilirubine Eicosanoides (leucotriène C4, leucotriène E4, prostaglandine E2, thromboxane B2) Hormones (ES, E17 β G, T3, T4, DHEAS)
OATP1B3	Sels biliaires (cholate, glycocholate, taurocholate, taurochenodeoxycholate, taurodeoxycholate, tauroursodeoxycholate) Bilirubine Cholécystokinine-8 Hormones (T3, T4, ES, DHEAS, testostérone) Leucotriène C4 Stéroïdes conjugués
OATP1C1	Hormones (ES, E17 β G, hormones thyroïdiennes)
OATP2A1	Prostaglandines (PGE1, PGE2, PGD2, PGF2 α , PGH2)
OATP2B1	Hormones (DHEAS, ES, T4) Leucotriène C4 Neuropeptides : substance P, vasoactive intestinal peptide Prostaglandine E2 Taurocholate Thromboxane B2
OATP3A1	Hormones (ES, T4) Prostaglandine E1, Prostaglandine E2, Prostaglandine F2 α Vasopressine
OATP4A1	Hormones (E17 β G, ES, T4, T3) Prostaglandine E2 Taurocholate
OATP4C1	AMPc ES, hormones thyroïdiennes
OATP5A1	-
OATP6A1	-

Plusieurs OATP reconnaissent également des substrats exogènes et quatre d'entre eux ont été identifiés comme jouant un rôle significatif en pharmacocinétique : OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 et OATP2B1 (König et al., 2013). De nombreux médicaments substrats de ces quatre transporteurs ont été recensés. Une des classes thérapeutiques les plus importantes transportées par ces OATP sont les statines, des médicaments inhibant l'HMG-CoA (hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A) réductase pour réduire la synthèse endogène du cholestérol (Hsiang et al., 1999; Seithel et al., 2007; Shirasaka et al., 2011). De nombreux autres médicaments ont été identifiés comme substrats de ces transporteurs OATP. Ces molécules concernent énormément de classes thérapeutiques comme des antibiotiques, des cytotoxiques, des anti-histaminiques, des diurétiques, des inhibiteurs de tyrosine kinase et encore d'autres médicaments importants en thérapeutique (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste des principaux substrats exogènes des OATP.

(d'après Bednarczyk and Sanghvi, 2020; Estudante et al., 2016; Roth et al., 2012)

OATP1A2	Acébutolol, Aliskirène, Aténolol, Atrasentan, Bromosulphophthaléine, Céliprolol, Ciprofloxacine, Darunavir, Docétaxel, Enoxacine, Erythromycine, Fexofénadine, Gatifloxacine, Glibenclamide, Hydroxyurée, Imatinib, Labetalol, Lévofloxacine, Lomefloxacine, Lopinavir, Méthotrexate, Nadolol, Norfloxacine, Ouabaine, Pitavastatine, Rosuvastatine, Saquinavir, Sotalol, Talinolol
OATP1B1	Arsenic (arsenite, arsenate), Asunaprèvir, Atorvastatine, Atrasentan, Benzylpénicilline, Bosentan, Bromosulphophthaléine, Caspofungine, Céfazoline, Cefditorène, Céfopérazone, Cérivastatine, Darunavir, Diclofénac, Docétaxel, Enalapril, Eprosartan, Ezétimibe, Fexofénadine, Fluvastatine, Gimatécan, Glibenclamide, Hydroxyurée, Lopinavir, Mesalazine, Méthotrexate, Natéglinide, Olmesartan, Paclitaxel, Phalloïdine, Pitavastatine, Pravastatine, Rapamycine, Répaglinide, Rifampicine, Rosuvastatine, Saquinavir, Siméprevir, Simvastatine, Temocapril, Troglitazone, Valsartan
OATP1B3	Asunaprèvir, Atorvastatine, Atrasentan, Benzylpénicilline, Bosentan, Bromosulphophthaléine, Cefadroxil, Céfazoline, Cefditorène, Cefmétazole, Céfopérazone, Céfalexine, Diclofenac, Digoxine, Docétaxel, Enalapril, Erythromycine, Fexofénadine, Fluvastatine, Gimatécan, Glibenclamide, Hydroxyurée, Imatinib, Lopinavir, Mesalazine, Méthotrexate, Mycophénolate, Natéglinide, Olmesartan, Ouabaine, Paclitaxel, Phalloïdine, Pitavastatine, Pravastatine, Rapamycine, Rifampicine, Rosuvastatine, Saquinavir, Siméprevir, Telmisartan, Valsartan
OATP1C1	Bromosulphophthaléine
OATP2A1	Latanoprost
OATP2B1	Aliskirène, Amiodarone, Asunaprevir, Atorvastatine, Azilsartan, Balsalazide, Benzylpénicilline, Bosentan, Bromosulphophthaléine, Candesartan, Diclofenac, Eprosartan, Erlotinib, Ezétimibe, Fexofénadine, Fluvastatine, Glibenclamide, Irbesartan, Latanoprost, Losartan, Mesalazine, Montelukast, Osalazine, Pitavastatine, Pravastatine, Prénégénolone, Rifampicine, Rosuvastatine, Talinolol, Tebipénème pivoxil, Telmisartan, Valsartan
OATP3A1	Benzylpénicilline
OATP4A1	Benzylpénicilline
OATP4C1	Digoxine, Méthotrexate, Ouabaine, Sitagliptine
OATP5A1	-
OATP6A1	-

2.2.3.5. Distribution tissulaire et impact fonctionnel des OATP

L'expression tissulaire des OATP a été étudiée à la fois par quantification de l'ARNm (acide ribonucléique messenger) et des protéines. Par ces techniques, les OATP ont été détectés dans les cellules épithéliales ou endothéliales de nombreux organes du corps humain (Figure 5).

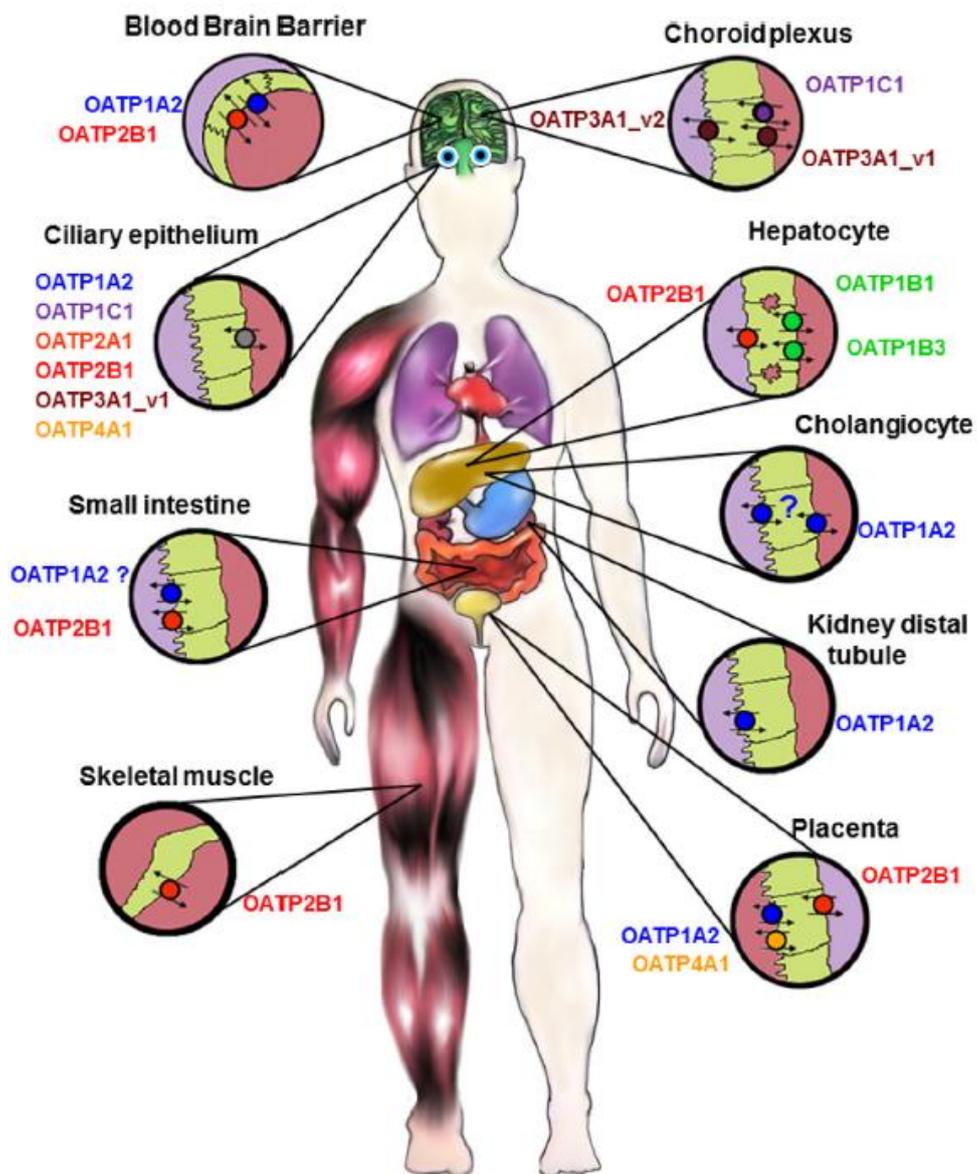


Figure 5 : Distribution tissulaire des différents OATP chez l'Homme.

(Hagenbuch and Stieger, 2013)

Certains OATP sont considérés comme ubiquitaires. C'est le cas de OATP2A1, OATP3A1 et OATP4A1 dont l'ARNm a été retrouvé dans tous les tissus analysés (Roth et al., 2012). D'autres au contraire ont une expression restreinte et sont parfois considérés comme spécifiques de certains organes. Les deux principaux transporteurs illustrant cela chez l'Homme sont OATP1B1 et OATP1B3, considérés comme spécifiques du foie. Toutefois, des faibles niveaux d'expression d'OATP1B3 ont été retrouvés au niveau extra-hépatique, en particulier par une équipe qui a récemment mis en évidence la présence d'OATP1B3 au niveau du pancréas (Kim et al., 2017). La présence importante des OATP au niveau du foie et d'autres organes clés de la pharmacocinétique comme le rein ou l'intestin, leur confère un rôle central dans les processus d'absorption, distribution et élimination des médicaments.

Au niveau du foie, OATP1B1 et OATP1B3 sont exprimés en quantités importantes au niveau de la membrane sinusoidale des hépatocytes (Figure 1) où ils participent à la captation du sang vers les hépatocytes de composés endogènes comme la bile ou les acides biliaires, mais aussi à l'élimination hépatobiliaire de médicaments substrats. OATP1B1 est le plus abondant et probablement le plus important des OATP retrouvés au niveau du foie (Kunze et al., 2014) puisqu'il est retrouvé partout au niveau des lobules alors que OATP1B3 semble être majoritairement exprimé autour de la veine centrale (König et al., 2000).

L'importance pharmacologique des OATP a été démontrée après avoir observé que les concentrations plasmatiques de statines augmentaient en présence d'inhibiteurs de OATP1B1 comme la ciclosporine ou le gemfibrozil (Pasanen et al., 2006; Shitara et al., 2003, 2004) (Tableau 4). OATP2B1, qui est exprimé de façon ubiquitaire, est lui aussi retrouvé sur la membrane sinusoidale des hépatocytes où il participe également à l'élimination hépatique des médicaments. Il est toutefois difficile d'estimer *in vivo* la contribution relative de chacun de ces trois OATP à la captation hépatique des médicaments étant donné le recouvrement de leurs substrats et inhibiteurs. A noter également que OATP1A2, très largement exprimé dans l'organisme, est également

retrouvé en petite quantité au niveau du foie avec une localisation limitée aux cholangiocytes où il pourrait participer probablement à la réabsorption de composés endogènes et de xénobiotiques sécrétés dans la bile (Lee et al., 2005).

Au niveau du rein, on retrouve OATP4C1 qui est considéré comme spécifique de cet organe (Figure 6). Il est localisé sur la membrane sinusoidale des cellules du tube contourné proximal. OATP4C1 est impliqué dans les processus d'élimination des toxines urémiques et participe à l'élimination rénale de certains médicaments à visée cardiaque (digoxine, ouabaïne) ou cytotoxiques (méthotrexate) (He et al., 2014a; Masereeuw et al., 2014; Mikkaichi et al., 2004; Toyohara et al., 2009). OATP1A2 est également exprimé dans le rein, mais au niveau des tubes contournés distaux du néphron (Figure 5). Il pourrait à ce niveau favoriser la sécrétion et la réabsorption tubulaire de certains médicaments comme le méthotrexate et potentiellement contribuer à la toxicité de ce médicament (Badagnani et al., 2006). La présence de OATP2B1 est également présumée au niveau du rein depuis que de l'ARNm a été retrouvé en quantités équivalentes à celles de l'intestin, mais l'expression protéique de ce transporteur n'a pas encore été confirmée (Knauer et al., 2013).

Au niveau de l'intestin plusieurs OATP ubiquitaires ont été détectés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes dans le duodénum : OATP1A2, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1 (Glaeser et al., 2007). Des analyses quantitatives d'ARNm ont montré que OATP2B1 était le plus abondamment exprimé au niveau de cet organe et des études par immunofluorescence ont confirmé sa localisation sur le pôle apical des entérocytes (Kobayashi et al., 2003; Meier et al., 2007). OATP2B1 semble donc être le principal OATP impliqué dans l'absorption des médicaments et un des acteurs pouvant modifier la biodisponibilité des médicaments administrés par voie orale.

Au niveau des autres interfaces où sont exprimés les transporteurs OATP, leur retentissement fonctionnel est moins bien caractérisé à l'heure actuelle. OATP1A2 et OATP2B1 sont exprimés au niveau de la BHE, du côté apical des cellules endothéliales des microcapillaires cérébraux (Gao et al., 2015). Pour chacun, leurs ARNm ont été

retrouvés dans des proportions équivalentes et leur expression protéique a été mise en évidence, mais leur rôle n'a pu être confirmé *in vivo* (Bronger et al., 2005; Lee et al., 2005). Leur présence a également été identifiée récemment dans la rétine, où ils participeraient à la captation de neurotransmetteurs et de neurostéroïdes vers ce tissu (Gao et al., 2015). OATP1A2 est aussi exprimé dans les neurones et pourrait influencer les concentrations neuronales de statines et de méthotrexate (Urquhart and Kim, 2009). L'expression protéique de OATP1C1 et OATP3A1 a également été détectée dans le plexus choroïde et dans les axones des neurones du cortex frontal pour OATP3A1 (Huber et al., 2007; Pizzagalli et al., 2002). La participation des OATP est aussi présumée au niveau des barrières foeto-placentaire (OATP1A2, OATP1B3, OATP2B1, OATP2A1, OATP4A1) (Roth et al., 2012; Wang et al., 2012), testiculaire (OATP1A2, OATP1C1, OATP3A1, OATP6A1) (Hagenbuch and Stieger, 2013; Roth et al., 2012) et oculaire (OATP1A2, OATP1C1, OATP2B1, OATP1A2, OATP3A1, OATP4A1) (Chan et al., 2015; Roth et al., 2012). Les OATP présents dans le placenta participent au transport des stéroïdes et des hormones thyroïdiennes mais leur rôle dans l'exposition foetale aux médicaments n'a pas été clarifié pour l'instant (Grube et al., 2007; Hagenbuch, 2007). Certains OATP ubiquitaires ont également été retrouvés au niveau d'autres tissus. OATP2A1 a été identifié au niveau du côlon, du myocarde, des poumons, des ovaires, du pancréas, de la prostate, des muscles squelettiques et de la rate (Schuster, 2002). OATP2B1 est exprimé aussi dans les kératinocytes de l'épiderme, dans l'épithélium entourant les cellules épithéliales des canaux des glandes mammaires, dans les cellules endothéliales vasculaires du cœur et dans les muscles squelettiques (Grube et al., 2006b; Knauer et al., 2010; Pizzagalli et al., 2003; Schiffer et al., 2003). OATP3A1 est lui aussi retrouvé dans les kératinocytes de l'épiderme (Schiffer et al., 2003) alors que l'ARNm de OATP4A1 a été identifié dans les poumons, les muscles squelettiques et le pancréas (Fujiwara et al., 2001; Tamai et al., 2000), mais l'expression protéique n'a pas été mise en évidence pour l'instant.

2.2.3.6. Inhibiteurs des transporteurs OATP

Etant donné la très large distribution des OATP dans les tissus de l'organisme et leur implication dans toutes les étapes de la pharmacocinétique, l'identification des inhibiteurs des OATP revêt une importance toute particulière en pharmacologie. En effet, un très grand nombre de substances endogènes et de xénobiotiques, parmi lesquelles des médicaments, est distribué au travers des membranes par ces transporteurs. La présence de substances inhibant leur activité risque donc de perturber certains processus physiologiques en empêchant le transport de substances endogènes, ou de déclencher des interactions médicamenteuses lorsqu'elles interfèrent avec le transport d'un médicament substrat. Une liste de médicaments identifiés comme inhibiteurs des OATP est présentée dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Liste des principaux inhibiteurs des OATP.

(d'après Chen et al., 2020; Estudante et al., 2016; Karlgren et al., 2012; Unger et al., 2020)

OATP1A2	Azithromycine, Clarithromycine, Ciclosporine, Flavonoïdes, Naringine, Quinidine, Rifampicine
OATP1B1	Atazanavir, Atorvastatine, Budésonide, Carfilzomib, Ciclosporine, Clarithromycine, Diclofénac, Dipyridamole, Dronédarone, Elacridar, Erythromycine, Flavonoïdes, Fluvastatine, Fosinopril, Gemfibrozil, Glibenclamide, Gliquidone, Lapatinib, Lopinavir, Pitavastatine, Rapamycine, Répaglinide, Rifampicine, Ritonavir, Rosuvastatine, Roxithromycine, Sirolimus, Sulfasalazine, Télithromycine, Telmisartan, Trametinib, Valspodar
OATP1B3	Atazanavir, Atorvastatine, Budésonide, Carfilzomib, Clarithromycine, Ciclosporine, Clarithromycine, Dipyridamole, Dronédarone, Flavonoïdes, Fluvastatine, Fosinopril, Gemfibrozil, Glibenclamide, Gliquidone, Lapatinib, Lopinavir, Pitavastatine, Rapamycine, Répaglinide, Rifampicine, Ritonavir, Rosuvastatine, Sildénafil, Sirolimus, Sulfasalazine, Telmisartan, Trametinib, Valspodar
OATP1C1	Probénécide
OATP2A1	-
OATP2B1	Acémétacine, Atazanavir, Atorvastatine, Asunaparévir, Axitinib, Budésonide, Cabozatinib, Ciclosporine, Daclatasavir, Debrafenib, Dipyridamole, Erlotinib, Flavonoïdes, Fluvastatine, Gefitinib, Gemfibrozil, Glibenclamide, Irbesartan, Lopinavir, Naringine, Olsalazine, Pitavastatine, Quinidine, Ritonavir, Rosuvastatine, Rifampicine, Sildénafil, Simeprevir, Sofosbuvir, Sulfasalazine, Telmisartan, Tipranavir
OATP3A1	-
OATP4A1	-
OATP4C1	-
OATP5A1	-
OATP6A1	-

2.3. Importance des transporteurs dans le développement des médicaments

L'importance des transporteurs en pharmacocinétique pour l'efficacité et la sécurité d'utilisation des médicaments nécessite aujourd'hui leur prise en compte dans les phases de développement. L'Agence Européenne du médicament (EMA), la Food and Drug Administration (FDA) et la Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) au Japon imposent désormais pour tout nouveau candidat médicament d'étudier son potentiel substrat ou inhibiteur des transporteurs afin d'anticiper le risque associé d'interactions médicamenteuses d'origine pharmacocinétique (European Medicines

Agency, 2012; Food and Drug Administration, 2017; Ishiguro et al., 2020). Un comité d'experts international, l'International Transporter Consortium (ITC) émet des recommandations concernant les transporteurs pouvant avoir une importance clinique en pharmacocinétique et une potentielle implication dans les phénomènes d'interactions médicamenteuses. Ce comité évalue et propose des méthodes adaptées à l'étude de ces transporteurs, à mettre en œuvre en fonction du profil pharmacocinétique de chaque candidat médicament (Giacomini et al., 2010).

2.3.1. Transporteurs d'importance clinique reconnue

L'objectif initial de l'ITC était d'identifier les transporteurs déterminants en pharmacocinétique et de proposer des recommandations pour le développement préclinique et clinique des médicaments (Huang et al., 2010). La composition complète et actualisée de l'ITC est consultable sur leur site internet (<https://www.itc-transporter.org/>).

Le travail de l'ITC s'est d'abord focalisé sur 7 transporteurs dont l'implication en pharmacocinétique est évidente : P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT2, OCT2 (Giacomini et al., 2010) (Figure 6). Les recommandations ont ensuite été élargies à d'autres transporteurs pouvant avoir un impact pharmacologique, mais également pouvant contribuer à la toxicité tissulaire des médicaments : MATE1, MATE2, MRP2 et BSEP (Zamek-Gliszczynski et al., 2012) (Figure 6). Concernant MRP2 et BSEP, cette décision a été guidée par leur rôle important dans l'élimination des substances de l'organisme et leur potentielle implication dans des maladies déclenchées par un déficit d'élimination de substances endogènes ou exogènes (cholestase, DILI). Néanmoins, l'évaluation du pouvoir d'inhibition des médicaments sur ces transporteurs est recommandée uniquement de façon rétrospective, si des signes d'hépatotoxicité sont observés, afin d'apporter une explication mécanistique à cette toxicité (Hillgren et al., 2013; Zamek-Gliszczyński et al., 2012). Plus récemment, il a été décidé d'étudier de façon prospective le pouvoir d'inhibition de chaque nouveau candidat médicament sur le transporteur OCT1. OATP2B1 a plus récemment été ajouté à la liste des transporteurs

à évaluer étant donné certaines preuves récentes de son implication dans des interactions entre certains médicaments et jus de fruits. Cependant, son étude n'est recommandée que de façon rétrospective pour expliquer des observations cliniques particulières qui ne pourraient pas être expliquées par d'autres mécanismes plus habituels (interaction avec la P-gp, la BCRP ou les autres OATP par exemple). Les arguments ne sont pour l'instant pas suffisants pour recommander l'étude des autres transporteurs lors du développement des médicaments (Figure 6).

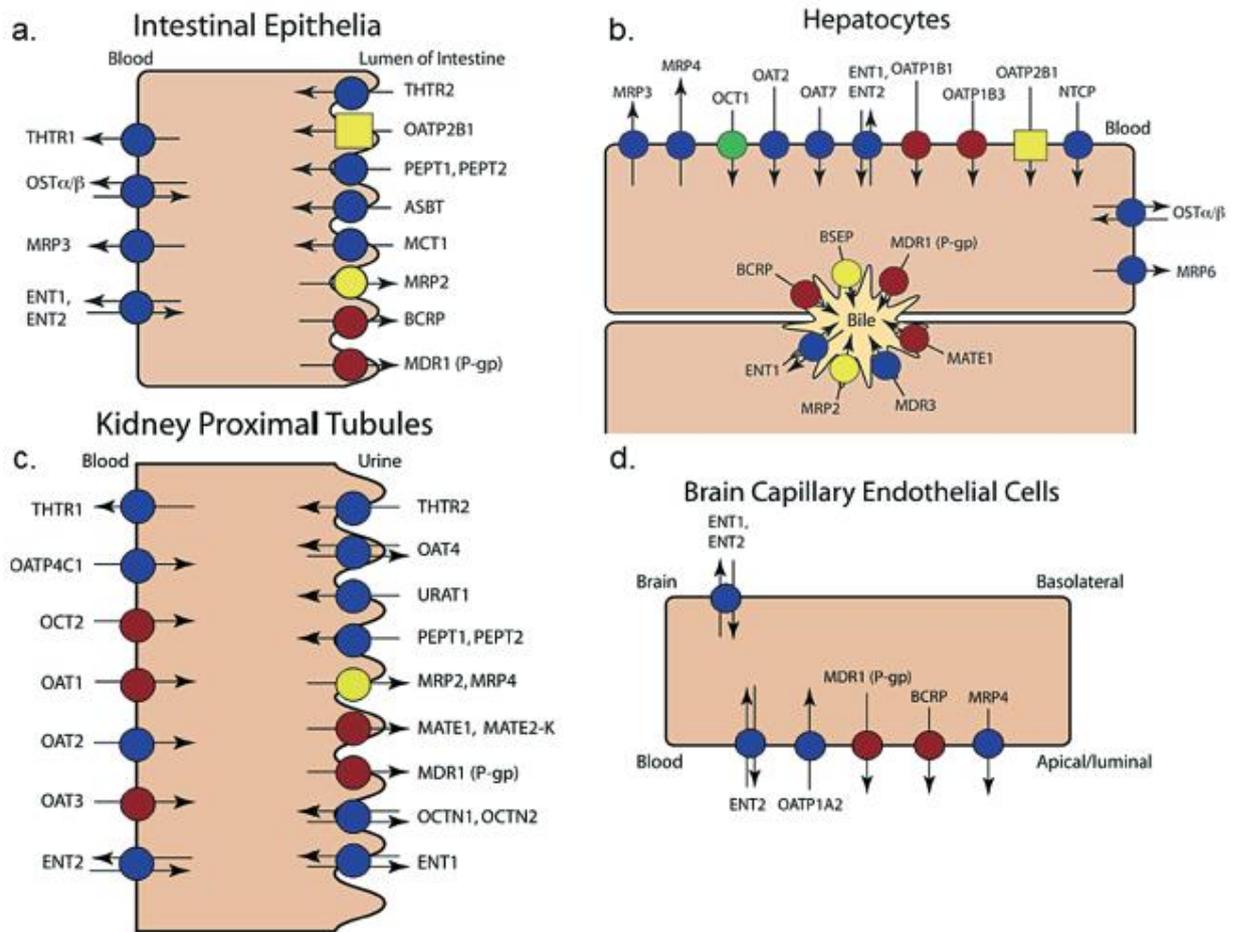


Figure 6 : Recommandations de l'ITC pour l'étude des transporteurs dans le développement des médicaments.

L'étude des transporteurs en rouge était déjà recommandée depuis plusieurs années pour le potentiel substrat et inhibiteur des nouveaux candidats médicaments et le transporteur en vert a été ajouté suite à la dernière réunion de l'ITC. L'étude des transporteurs en jaune (rond) n'est recommandée que de façon rétrospective après l'observation clinique d'une interaction, pour en expliquer le mécanisme. L'étude du transporteur en jaune (carré) n'est recommandée que dans certaines situations précises d'interactions médicamenteuses inexpliquées par d'autres mécanismes.

(Zamek-Gliszczynski et al., 2018)

L'ITC propose également des arbres décisionnels permettant de guider les industriels et les autorités compétentes sur la nécessité de tester chaque transporteur en fonction des propriétés du médicament développé et de son potentiel à générer des

interactions médicamenteuses. A titre d'exemple, l'arbre décisionnel des OATP sera détaillé un peu plus tard dans ce mémoire (Figure 10).

2.3.2. Rôle des transporteurs hépatiques en pharmacocinétique

2.3.2.1. Participation à l'élimination hépatobiliaire des médicaments

Le foie est composé d'une multitude d'hépatocytes qui sont des cellules polarisées. Le pôle basolatéral de la membrane plasmique de l'hépatocyte peut être subdivisé en domaine basal, appelé domaine sinusoidal car en regard du capillaire sinusoidal, et en un domaine latéral faisant face à l'hépatocyte voisin. Le pôle apical est aussi habituellement dénommé domaine canaliculaire, car il forme le canalicule biliaire qui est la partie initiale des voies biliaires. Le domaine sinusoidal représente les deux tiers de la membrane plasmique, tandis que les deux autres domaines se partagent à peu près également le tiers restant (Feldmann and Maurice, 1997).

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme et l'élimination des médicaments. L'élimination hépatique implique une succession de processus : captation sinusoidale des composés du sang vers les hépatocytes, efflux basolatéral des hépatocytes vers le sang, métabolisme puis sécrétion biliaire (Yoshida et al., 2013). La globalité de ces processus sur la clairance hépatique ($CL_{int,all,h}$) est décrite par le concept de la clairance étendue (« *extended clearance concept* ») et s'évalue par le calcul :

$$CL_{int, all, h} = PS_{inf} \times \frac{CL_{int, met} + CL_{int, bile}}{PS_{eff} + CL_{int, met} + CL_{int, bile}}$$

avec PS_{inf} , PS_{eff} , $CL_{int,met}$ et $CL_{int,bile}$ qui représentent respectivement la clairance de captation sinusoidale, la clairance d'efflux basolatéral, la clairance de métabolisation et la clairance d'élimination biliaire (Liu and Sahi, 2016; Shitara et al., 2006).

Le rôle des transporteurs hépatiques est essentiel dans ces processus puisqu'ils permettent le passage des membranes hépatocytaires de façon synchronisée, de la captation hépatique à la sécrétion biliaire. Ainsi, les transporteurs sont exprimés sur les différentes membranes des hépatocytes et conditionnent la distribution hépatique, le

métabolisme et l'élimination des médicaments et, par conséquent, l'exposition globale de l'organisme (Figure 6).

La captation hépatique des composés du sang vers les hépatocytes est médiée par plusieurs transporteurs de la famille SLC, comme les OATP (OATP1B1, OATP1B3 et OATP2B1), les OAT (OAT2, OAT7), OCT1 et la Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP, SLC22A1) (Figure 6). Les composés inchangés et leurs métabolites produits par les enzymes hépatiques sont ensuite excrétés dans la bile par des transporteurs appartenant principalement à la famille des transporteurs d'efflux ABC comme la P-gp, MRP2 et la BCRP (Figure 6). Le transporteur SLC MATE1 participe également à l'élimination biliaire des composés au niveau de cette interface (Figure 6). Certains composés inchangés ou métabolisés peuvent subir un efflux basolatéral médié par les transporteurs MRP (MRP3, MRP4 et MRP6 principalement) (Figure 6). Des analyses protéomiques quantitatives ont permis de quantifier le niveau d'expression protéique de chacun de ces transporteurs dans les hépatocytes (Ohtsuki et al., 2012; Wang et al., 2015) (Figure 7).

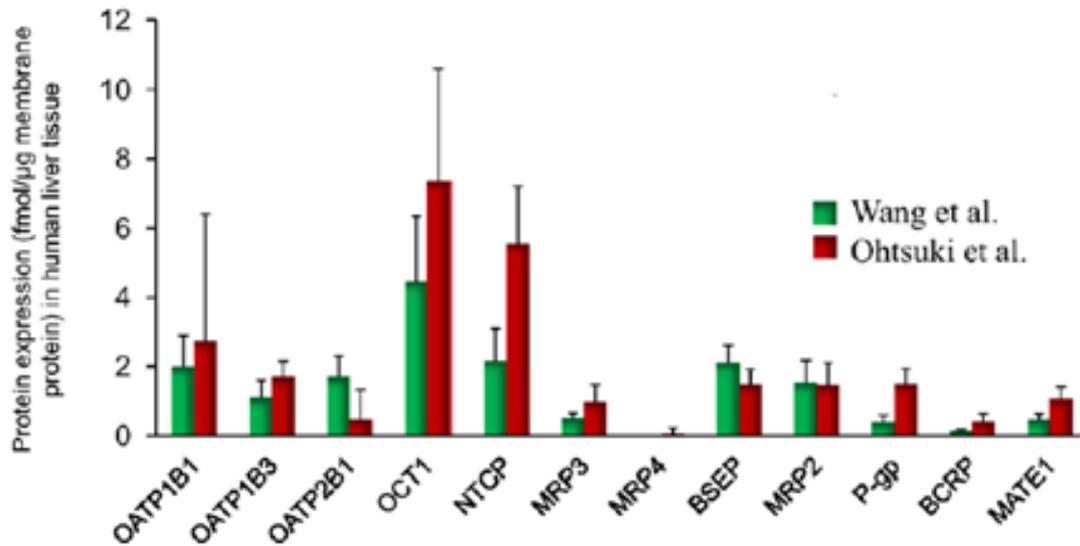


Figure 7 : Abondance des transporteurs dans le tissu hépatique.

Les mesures d'expression protéique des transporteurs ont été effectuées par LC-MS/MS dans deux études indépendantes (Ohtsuki et al., 2012; Wang et al., 2015) (d'après Liu and Sahi, 2016)

La méthodologie de ces études n'était pas tout à fait identique mais elles ont permis de montrer que OCT1, NTCP et les OATP sont les transporteurs les plus exprimés au niveau sinusoidal et la BSEP et MRP2 les transporteurs les plus retrouvés au niveau canaliculaire (Figure 7). Etant donné le nombre très important et la diversité des médicaments substrats de ces transporteurs, en particulier les OATP, ces transporteurs hépatiques sont un facteur important de variabilité pharmacocinétique, qui peut provenir d'altérations physiologiques ou pathologiques de l'expression de ces transporteurs ou d'interactions médicamenteuses impliquant une modulation de l'activité de ces transporteurs.

2.3.2.2. Situations physiologiques et pathologiques pouvant altérer la fonction des transporteurs hépatiques

Une méta-analyse reprenant huit études cliniques sur les transporteurs OATP hépatiques n'a montré aucune corrélation entre l'expression de ces transporteurs et le sexe des sujets (Figure 8) (Badée et al., 2015). En revanche une légère corrélation a été relevée entre l'expression de OATP1B1 et l'âge des sujets (Figure 8).

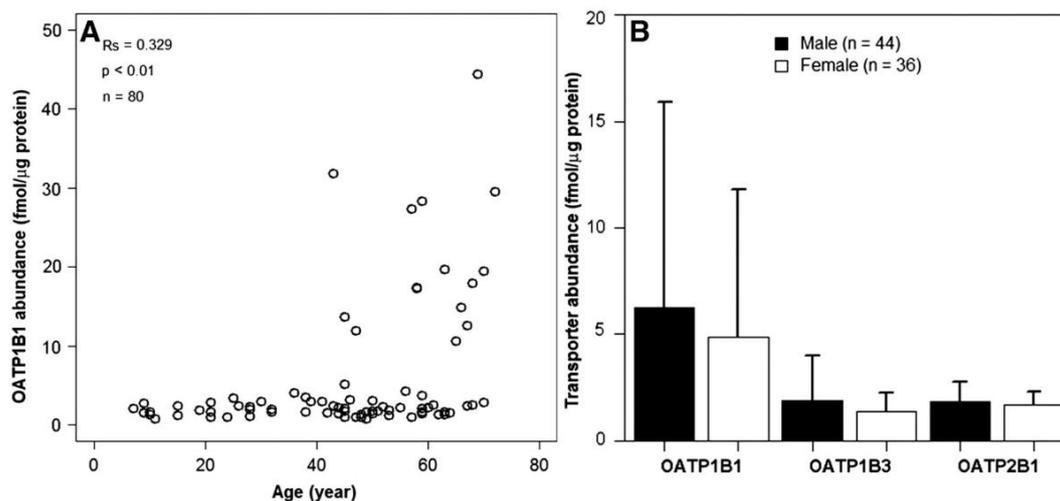


Figure 8 : Influence de l'âge et du sexe sur l'expression tissulaire des OATP dans le foie. (Badée et al., 2015)

Un autre facteur physiologique pouvant modifier l'activité des transporteurs est le polymorphisme génétique. Plusieurs études ont en effet démontré que les variants de OATP1B1 comme c.521T>C et c.388A>G avaient des effets significatifs sur l'exposition systémique de certains de ses médicaments substrats (Gong and Kim, 2013; Niemi et al., 2011). C'est le SNP (Single Nucleotide Polymorphism) c.521T>C qui a été identifié comme cliniquement significatif en pharmacocinétique et les personnes présentant cet allèle sont par exemple plus à risque de développer des myopathies induites par les statines (Kalliokoski et al., 2008; The SEARCH collaborative group, 2008). Un algorithme a d'ailleurs été proposé pour recommander des adaptations de doses de rosuvastatine et atorvastatine afin de limiter l'exposition systémique aux statines à l'origine de ces myopathies (Figure 9).

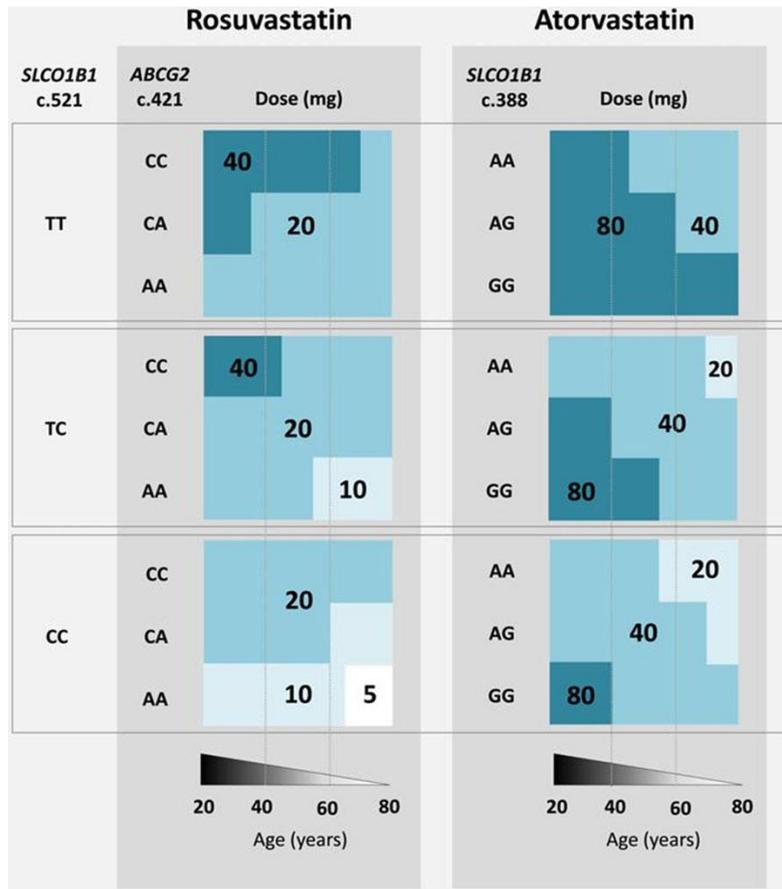


Figure 9 : Posologies maximales recommandées de rosuvastatine et d'atorvastatine en fonction de l'âge et des polymorphismes génétiques.

(DeGorter et al., 2013)

La plupart des données cliniques sur les transporteurs hépatiques sont issues de volontaires sains. Cependant, l'activité de ces transporteurs peut être altérée par différentes pathologies, ce qui peut modifier l'efficacité et la sécurité des médicaments substrats. Les données cliniques sur le sujet sont assez limitées mais de nombreuses études sont réalisées actuellement afin d'identifier ces situations pathologiques à haut risque pharmacocinétique afin d'envisager des approches pharmacologiques adaptées (Evers et al., 2018). Le Tableau 5 recense plusieurs situations pathologiques où des modifications d'expression des transporteurs ont été recensées à des stades précliniques ou cliniques.

Tableau 5 : Modifications du niveau d'expression des transporteurs dans certaines situations pathologiques.

(d'après Evers et al., 2018; Thakkar et al., 2017)

Pathologie	Modification ARNm du transporteur	Modification expression protéique du transporteur
Carcinome hépatocellulaire secondaire au virus de l'hépatite C	-	<u>Tissus cancéreux humains</u> : ↓ NTCP, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OCT1, BSEP, MATE1, MRP2, MRP3, P-gp
Cholestase	<u>Homme</u> : ↓ NTCP, OATP1B1, OATP1B3, MRP2 ↔ BSEP ↑ MRP3, MRP4 <u>Rat</u> : ↓ NTCP, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, BSEP	<u>Homme</u> : ↓ NTCP, MRP2 ↔ BSEP, P-gp ↑ MRP3 <u>Rat</u> : ↓ OCT1, BSEP ↔ OATP1B1, OATP1B3
Cirrhose alcoolique	<u>Homme</u> : ↓ OATP1B3 ↑ MRP4, MRP5, BCRP, OATP2B1, MRP1, MRP3, MRP5	<u>Homme</u> : ↓ NTCP, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, BCRP, BSEP ↔ OATP2B1, MATE1, MRP2, P-gp ↑ MATE1, MRP3
Hépatite C cirrhotique	-	<u>Homme</u> : ↓ NTCP, OATP1B3, OCT1, BSEP, MRP2, P-gp ↔ OATP1B1, OATP2B1, BCRP, MRP3 ↑ MATE1
Inflammation	<u>Coupes d'hépatocyte traités aux liposaccharides</u> : ↔ MRP2, BSEP <u>Hépatocytes traités à l'oncostatine M</u> : ↓ NTCP, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OCT1, OAT2, MRP2, BCRP ↔ P-gp, MRP3, MRP4, BSEP <u>Hépatocytes traités à l'interleukine-6</u> : ↓ P-gp, MRP2, BCRP, NTCP, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OCT1 <u>Hépatocytes traités au TNF-α</u> : ↓ BSEP, NTCP, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OAT2 <u>Hépatocytes traités à l'interféron-γ</u> : ↓ P-gp, MRP2, MRP3, BCRP, BSEP, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1	<u>Homme (prélèvements postmortem)</u> : ↓ BSEP ↑ MRP3, ↑ MRP4 <u>Coupes d'hépatocyte traités aux liposaccharides</u> : ↓ MRP2, BSEP <u>Hépatocytes traités à l'oncostatine M</u> : ↓ NTCP, OATP1B1, OATP2B1, BCRP <u>Hépatocytes traités à l'interleukine-6</u> : ↓ MRP2, BCRP, NTCP, OATP1B1 ↔ P-gp ↑ MRP3 <u>Hépatocytes traités au TNF-α</u> : ↓ NTCP, OATP1B1, ↑ MRP3, BCRP ↔ MRP2, P-gp
Maladie du foie gras non alcoolique / Stéatose hépatique non alcoolique (NASH)	<u>Homme</u> : ↓ BSEP, MRP2 (femmes seulement), NTCP (hommes et femmes), MRP6, OATP1B3 ↔ OATP1B1, OATP2B1 ↑ MRP1, MRP3, MRP4, MRP5, P-gp, BCRP	<u>Homme</u> : ↓ OATP1B3 ↔ OATP1A2 ↑ MRP1, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6, P-gp, BCRP, OATP1B1
Maladie rénale chronique	<u>Rat</u> : ↑ P-gp, MRP2	<u>Rat</u> : ↓ OATP2B1 ↑ P-gp

2.3.2.3. Interactions médicamenteuses impliquant les transporteurs

Le rôle prédominant du foie dans les étapes de métabolisme et d'élimination en fait un site privilégié d'interactions médicamenteuses pharmacocinétiques. Une modification du métabolisme enzymatique des médicaments ou de leur transport par un autre médicament substrat, inducteur ou inhibiteur de ces mêmes enzymes ou transporteurs, peut être à l'origine d'une augmentation ou d'une diminution des concentrations plasmatiques du médicament victime de l'interaction (Levêque et al., 2010). Les répercussions pharmacocinétiques sont d'importance variable mais peuvent conduire dans certaines situations à une contre-indication d'association.

Parmi les transporteurs retrouvés au niveau hépatique, les transporteurs OATP ont été identifiés comme le siège de nombreuses interactions médicamenteuses. L'inhibition des OATP peut provoquer une augmentation importante de l'exposition plasmatique aux médicaments substrats de ces transporteurs. La première interaction médicamenteuse mise en évidence au niveau de ces transporteurs était celle entre la cérvastatine et la ciclosporine (Shitara et al., 2003), mais beaucoup d'autres ont été découvertes depuis (Tableau 6) (Patel et al., 2016). Ces interactions médicamenteuses se distinguent par l'intensité de leurs répercussions pharmacocinétiques, qui peuvent mener à une augmentation d'un facteur 23 dans le cas de l'interaction de la pravastatine avec la ciclosporine (Tableau 6).

Tableau 6 : Exemples d'interactions médicamenteuses d'impact clinique impliquant des médicaments substrats et inhibiteurs de OATP1B1 et/ou OATP1B3.

F_aF_g représente la forme inchangée, AUCR correspond au rapport des aires sous la courbe plasmatique du médicament substrat avant et après ajout de l'inhibiteur, ^b dose non indiquée dans la publication, ^c l'inhibition du CYP3A4 et de OATP1B1 sont à prendre en considération, ^d l'inhibition du CYP2C8 est le principal mécanisme d'interaction médicamenteuse (Shitara et al., 2013)

Inhibitor drug	Dose [mg]	Substrate drug		Reported AUCR		
		Name	F _a F _g [%]			
Atazanavir/Ritonavir	300/100	Rosuvastatin	43	3.1		
		Clarithromycin	500	4.4 ^c		
Telithromycin	500	Pravastatin	50	2.1		
	250	Glibenclamide	100	1.3		
	250	Repaglinide	100	1.4 ^c		
	800	Repaglinide	100	1.8 ^c		
	^b	Atorvastatin	39	9.0 ^c		
	175	Atorvastatin	39	15 ^c		
	^b	Cerivastatin	78	3.8 ^c		
	^b	Fluvastatin	100	3.5		
	131	Pitavastatin	100	4.6		
	^b	Pravastatin	50	10		
Cyclosporin A	^b	Pravastatin	50	12		
	^b	Pravastatin	50	23		
	^b	Rosuvastatin	43	7.1		
	100	Repaglinide	100	2.4 ^c		
	Darunavir/Ritonavir	300/100	Atorvastatin	39	3.4 ^c	
		600/100	Pravastatin	50	1.8	
		600/100	Rosuvastatin	43	1.5	
	Eltrombopag	75	Rosuvastatin	43	1.6	
		Fluconazole	200	Fluvastatin	100	1.8
			200	Pravastatin	50	1.4
200		Rosuvastatin	43	1.1		
200		Glimepiride	100	2.4		
200		Nateglinide	80	1.5		
200		Irbesartan	100	1.6		
Gemfibrozil		600	Atorvastatin	39	1.3	
	600	Cerivastatin	78	5.6 ^d		
	600	Fluvastatin	100	1.1		
	600	Pitavastatin	100	1.5		
	600	Pravastatin	50	2.0		
	600	Rosuvastatin	43	1.9		
	600	Glimepiride	100	1.2		
	600	Repaglinide	100	7.0		
	600	Repaglinide	100	8.2		
	600	Repaglinide	100	7.6		
Itraconazole	600	Repaglinide	100	8.1		
	200	Atorvastatin	39	2.5 ^c		
	200	Atorvastatin	39	3.2 ^c		
	200 (i.v.)	Atorvastatin	39	1.1		
	200	Cerivastatin	78	0.9 ^c		
	200	Cerivastatin	78	1.3 ^c		
	100	Fluvastatin	100	1.3		
	200	Pravastatin	50	1.5		
	200	Pravastatin	50	1.7		
	200 (i.v.)	Pravastatin	50	1.5		
Mibefradil	200	Rosuvastatin	43	1.3		
	100	Repaglinide	100	1.4 ^c		
	100	Atorvastatin	39	4.4 ^c		
	100	Pravastatin	50	1.2		
Nisoldipine	100	Pravastatin	50	1.3		
	10	Telmisartan	83	2.3		
Rifampicin	600	Atorvastatin	39	8.5		
	600	Atorvastatin	39	12		
	600 (i.v.)	Atorvastatin	39	7.3		
	600	Pravastatin	50	2.6		
	600	Pravastatin	50	4.6		
	600 (i.v.)	Glibenclamide	100	2.2		
Lopinavir/Ritonavir	400/100	Atorvastatin	39	5.9 ^c		
	400/100	Pravastatin	50	1.3		
	400/100	Rosuvastatin	43	2.1		
Saquinavir/Ritonavir	400/400	Atorvastatin	39	3.5 ^c		
	400/100	Pravastatin	50	0.5		
Tipranavir/Ritonavir	500/200	Atorvastatin	39	9.4 ^c		
	500/100	Rosuvastatin	43	1.4		
Ursodeoxycholic acid	500	Rosuvastatin	43	1.4		

A ce jour en effet, les interactions les plus préoccupantes d'un point de vue clinique sont certainement celles qui concernent les médicaments de la famille des statines dont l'exposition systémique peut être augmentée si elles sont administrées en même temps qu'un inhibiteur des OATP, pouvant ainsi déclencher l'apparition de myopathies, même à des doses pharmacologiques (Ramsey et al., 2014). L'étude des interactions médicamenteuses au niveau des transporteurs OATP est d'autant plus complexe que les sites de fixation des médicaments aux transporteurs OATP sont multiples (Noé et al., 2007; Roth et al., 2011; Tamai et al., 2001).

De ce fait, lors du développement d'un nouveau médicament, l'ITC recommande de s'interroger sur l'implication des OATP dans le mécanisme d'élimination du candidat médicament, en particulier si celui-ci présente une forte captation hépatique (Giacomini et al., 2010). Si le médicament est éliminé à plus de 25% par voie hépatique, des tests *in vitro* sur des hépatocytes ou des cellules transfectées doivent être effectués pour vérifier s'il est substrat des transporteurs OATP1B1 et OATP1B3 (European Medicines Agency, 2012; Food and Drug Administration, 2017; Ishiguro et al., 2020). Si les résultats *in vitro* sont positifs, une étude clinique est recommandée pour étudier *in vivo* le potentiel d'interaction de ce médicament avec un inhibiteur connu du transporteur (par exemple une dose unique de rifampicine ou de ciclosporine, Figure 10) afin de vérifier le risque et les conséquences pharmacocinétiques d'une interaction médicamenteuse impliquant les OATP (Figure 10).

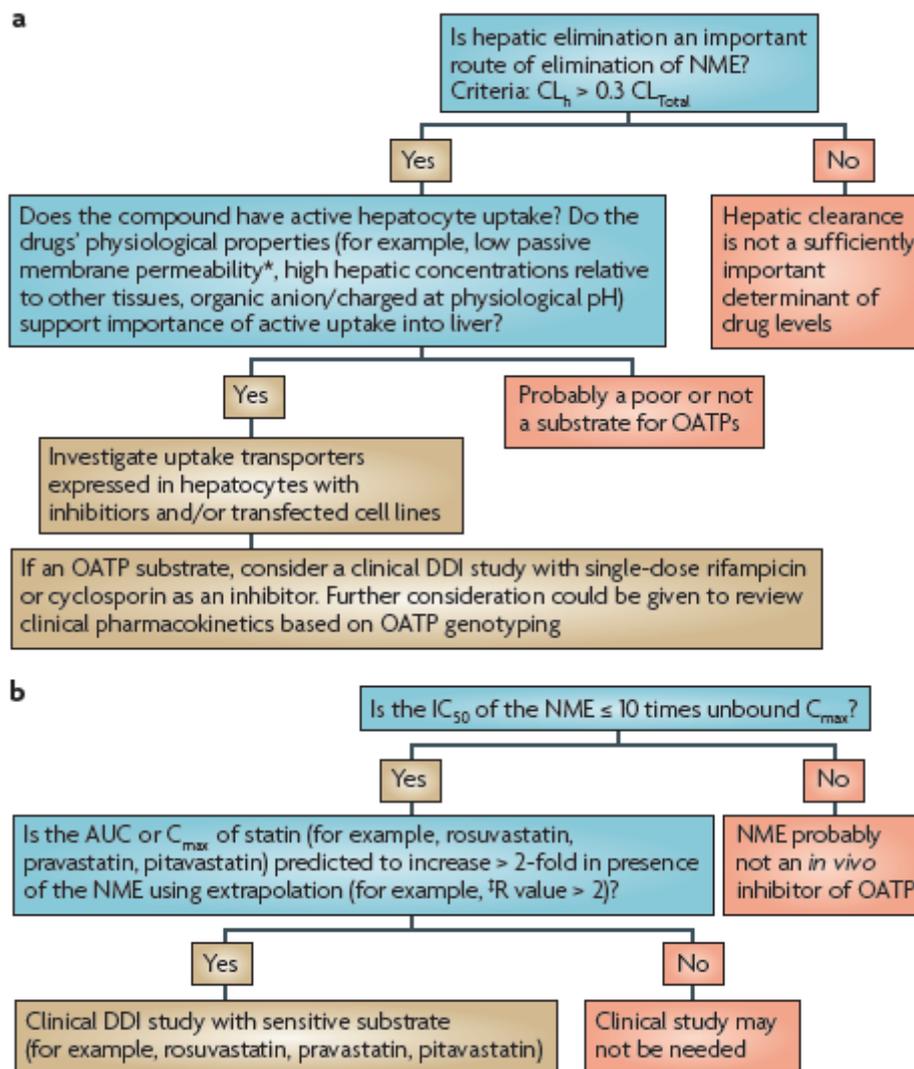


Figure 10 : Arbres décisionnels recommandés par l'ITC pour l'étude des interactions avec les OATP.

(a) Si NME (new molecular entity) potentiel substrat des OATP et (b) si NME potentiel inhibiteur.

(Giacomini et al., 2010)

Tous les candidats médicaments doivent également être testés *in vitro* pour voir s'ils sont substrats de la P-gp ou de la BCRP. Ces recommandations se basent plutôt sur le rôle important qu'exercent ces transporteurs au niveau intestinal où ils limitent la biodisponibilité des médicaments. Bien qu'ils soient tous les deux également exprimés sur la membrane canaliculaire des hépatocytes, leur implication clinique dans un risque d'interaction médicamenteuse pharmacocinétique à ce niveau n'a pas encore été

clairement démontrée. Le niveau d'expression de la P-gp au niveau canaliculaire est d'ailleurs environ sept fois moins élevé que dans l'intestin (von Richter et al., 2004).

Parmi les autres transporteurs d'efflux retrouvés sur l'interface canaliculaire, la protéine BSEP, bien qu'elle ne soit à priori pas une voie principale d'élimination des médicaments, peut participer aux phénomènes d'interactions médicamenteuses. En effet cette protéine permet la sécrétion de nombreux composés endogènes, en particulier les acides biliaires. L'inhibition de BSEP par un médicament peut être à l'origine d'une cholestase iatrogène et avoir parfois pour conséquence le développement de lésions hépatiques (Stieger, 2010). En effet, environ 30% des atteintes hépatiques cliniques d'origine médicamenteuse (DILI) impliquent une cholestase (Zamek-Gliszczynski et al., 2012). Toutefois, le rôle exact de la BSEP dans les interactions médicamenteuses et la survenue de DILI reste mal compris puisque la prise au long cours de certains médicaments l'inhibant de façon puissante (troglitazone, benzbromarone par exemple) est souvent associée à une hépatotoxicité alors que d'autres médicaments inhibiteurs de la BSEP (glimépiride, pioglitazone, simvastatine par exemple) ont une toxicité bien moindre (Liu and Sahi, 2016). Cependant, l'inhibition *in vitro* de BSEP sans argument préclinique ou clinique de cholestase n'est pas prédictive de la survenue de DILI ; c'est pourquoi il n'est pas recommandé de tester systématiquement ce transporteur lors du développement des médicaments, mais seulement de façon rétrospective, lors d'apparition d'une hépatotoxicité.

MRP2 semble également jouer un rôle important comme transporteur d'efflux à l'interface canaliculaire des hépatocytes mais à ce jour, aucune interaction médicamenteuse d'impact clinique n'a été identifiée (Liu and Sahi, 2016). Il s'agit pourtant là d'un site d'interaction médicamenteuse envisageable étant donné les différentes interactions observées au niveau de ce même transporteur dans d'autres organes comme l'intestin ou les reins (DeGorter et al., 2012b; Zolk and Fromm, 2011). Il est probable qu'une inhibition de MRP2 au niveau canaliculaire n'ait pas de répercussions sur l'exposition plasmatique et ne saurait être détectée chez les patients.

2.3.3. Complexité de l'évaluation clinique des interactions médicamenteuses au niveau des transporteurs hépatiques

L'importance des transporteurs OATP, en particulier OATP1B1 et dans une moindre mesure OATP1B3, a été clairement établie (Kalliokoski and Niemi, 2009). Leur impact clinique a été démontré de manière indirecte grâce à la mesure des cinétiques plasmatiques des médicaments substrats (Patel et al., 2016). Cependant, la prédiction *in vitro* de l'effet *in vivo* de ces transporteurs sur leurs médicaments substrats est délicate compte-tenu de la diversité des sites de transport sur ces transporteurs et de leur proximité au niveau de la membrane sinusoidale des hépatocytes (Kovacsics et al., 2016). L'importance clinique des autres transporteurs hépatiques est moins évidente, bien que beaucoup de médicaments en soient substrats. Les OCT, par exemple, participent à la captation hépatique de la metformine, un médicament antidiabétique à élimination principalement urinaire (Graham et al., 2011). Le manque d'arguments cliniques sur l'importance des autres transporteurs hépatiques dans la pharmacocinétique des médicaments peut s'expliquer par la faible contribution de certains transporteurs à la clairance hépatobiliaire. C'est par exemple l'hypothèse pour les OCT et OAT hépatiques par rapport à ceux du rein où ils jouent un rôle majeur dans la sécrétion tubulaire (Yin and Wang, 2016). C'est probablement aussi le cas de OATP2B1, dont la contribution à la captation hépatique semble relativement faible par rapport à OATP1B1 et OATP1B3 (Kalliokoski and Niemi, 2009).

Parmi les transporteurs hépatocytaires, l'impact clinique de ceux exprimés à l'interface canaliculaire n'est pas clairement élucidé alors que l'excrétion biliaire est une étape essentielle de l'élimination des médicaments. Les conséquences d'une modification du transport biliaire sont moins évidentes à détecter par les méthodes classiques de pharmacocinétique qu'une modification de la captation hépatique. En effet, la captation hépatique est l'étape limitante du processus de clairance hépatique et sa modification impacte directement l'exposition systémique au médicament que l'on pourra mesurer par des prélèvements sanguins. L'inhibition de la sécrétion biliaire, en

revanche, pourrait augmenter la concentration tissulaire hépatique sans forcément entraîner une modification détectable au niveau des concentrations plasmatiques de ce médicament (Patilea-Vrana and Unadkat, 2016).

L'impact fonctionnel des transporteurs d'efflux basolatéraux est également un autre aspect de la cinétique hépatique très mal connu à l'heure actuelle. Bien que l'importance de MRP3 et MRP4 ait été montrée *in vitro* (Ghibellini et al., 2008), l'extrapolation de ces résultats à la pharmacocinétique clinique et à leur implication dans le phénomène d'interactions médicamenteuses est complexe étant donné la difficulté à distinguer *in vivo* le niveau de participation de chacun des processus hépatiques à la cinétique plasmatique des médicaments. Ce phénomène d'efflux basolatéral pourrait pourtant expliquer la toxicité de certains métabolites qui passeraient du foie vers le sang et seraient ensuite distribués vers d'autres tissus (Vasilyeva et al., 2015). La contribution relative de ces nombreux transporteurs exprimés à diverses interfaces biologiques ainsi que leurs interactions sont extrêmement complexes à prédire et à évaluer. A ce jour, des modèles pharmacocinétiques (modèles PBPK) ont été développés dans cet objectif et sont maintenant recommandés à tous les stades du développement des médicaments (Figure 11) (Giacomini et al., 2018; Guo et al., 2018).

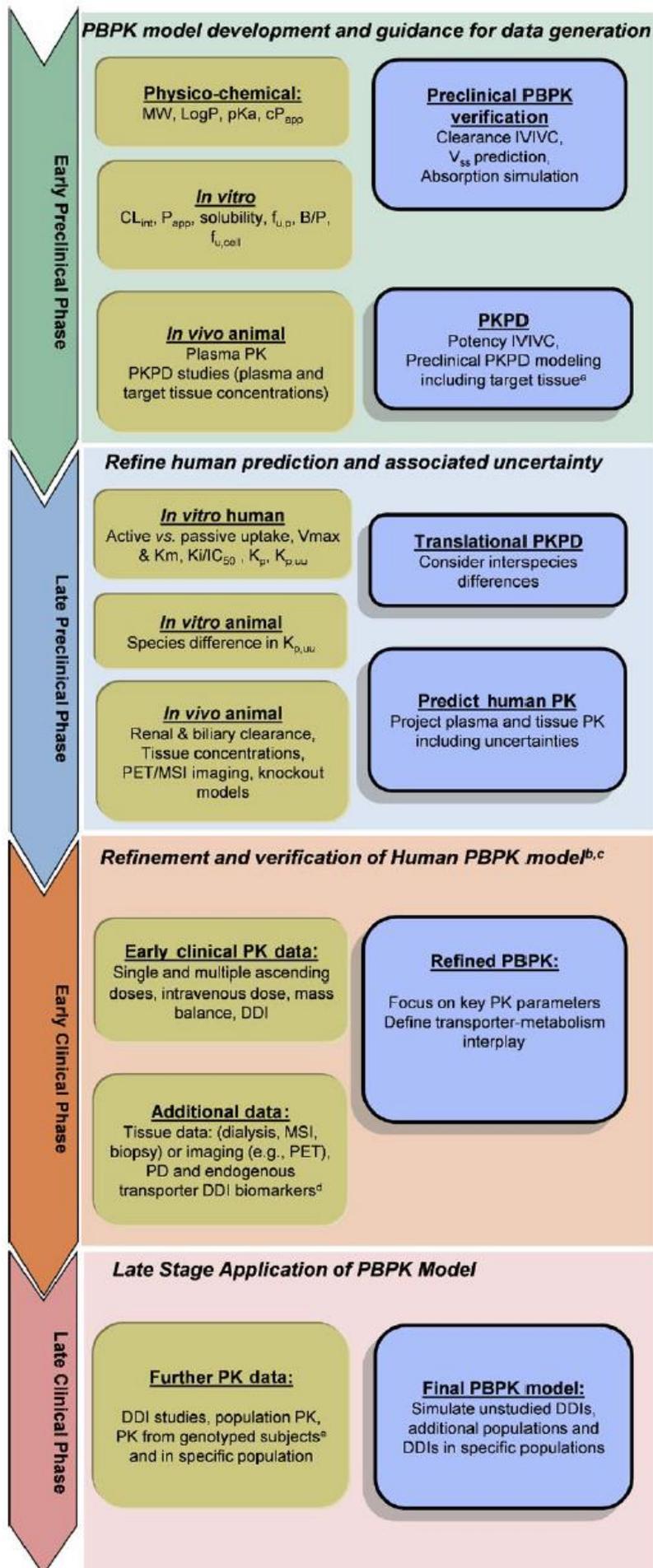


Figure 11 : Démarche pour le développement des médicaments des méthodes *in vitro*, précliniques et cliniques permettant de générer et modéliser des données pour l'étude, la caractérisation et la prédiction de la pharmacocinétique tissulaire et plasmatique chez l'Homme des médicaments substrats des transporteurs.
(Giacomini et al., 2018)

Il est possible d'évaluer l'implication individuelle de chaque transporteur chez l'animal grâce à l'utilisation d'animaux génétiquement déficients (KO) pour un transporteur donné, bien que des phénomènes de compensation fonctionnelle aient été rapportés (Poller et al., 2011; Riley et al., 2016; Urquhart and Kim, 2009). Chez l'Homme, certaines pathologies rares se caractérisent par un déficit d'expression ou de fonction d'un transporteur hépatique. C'est le cas par exemple des syndromes de Rotor et de Dubin-Johnson pour lesquels des mutations héréditaires des gènes *OATP1B1* et *OATP1B3*, et *ABCC2* respectivement sont à l'origine de dysfonctionnements hépatobiliaires (Jetter and Kullak-Ublick, 2020). Le déficit de captation OATP du syndrome de Rotor se caractérise par une hyperbilirubinémie, une coproporphyrinurie et une captation hépatique presque inexistante des solutés anioniques (van de Steeg et al., 2012). Le déficit de la protéine d'efflux MRP2 du syndrome de Dubin-Johnson entraîne un défaut d'origine pharmacocinétique entre des médicaments substrats et inhibiteurs de ce transporteur d'élimination biliaire de la bilirubine, qui est alors prise en charge par la protéine d'efflux MRP3 située sur la membrane basolatérale qui la transporte vers le compartiment plasmatique, provoquant également une hyperbilirubinémie (Keppler, 2014). Une augmentation de l'activité MRP3 a d'ailleurs été mise en évidence dans ce syndrome (Keppler, 2014).

Cependant, l'étude du rôle précis des transporteurs dans l'élimination des médicaments, à chaque interface des hépatocytes nécessite le développement d'inhibiteurs spécifiques qui peuvent être utilisés chez l'Homme. Les méthodes habituellement utilisées en pharmacocinétique clinique ne permettent pas de quantifier directement chez l'Homme la concentration hépatique d'un médicament et l'exposition de ce tissu, ni les échanges de ce médicament au travers des membranes. Il existe pourtant un réel enjeu pharmacologique à étudier le rôle des différents transporteurs hépatocytaires comme déterminants pharmacocinétiques de l'élimination hépatobiliaire des médicaments.

2.3.4. Méthodes d'étude des transporteurs hépatiques

La compréhension grandissante de l'importance des transporteurs hépatocytaires en pharmacocinétique a suscité le développement de modèles d'études permettant d'en apprécier les répercussions fonctionnelles. Les modèles *in vitro*, plus accessibles et permettant de réaliser des études à haut-débit, sont très utilisés en recherche et pour le développement de médicaments. Des hépatocytes animaux ou humains peuvent être mis en culture pour étudier les transporteurs (Hirano et al., 2006; Kouzuki et al., 1998). Pour ces études, les hépatocytes peuvent être utilisés sous différentes formes par exemple en suspension (Ménochet et al., 2012) ou selon le modèle dit « cultivés en sandwich » où une matrice permet aux hépatocytes de se positionner dans une configuration simulant au centre un canal biliaire (Swift et al., 2010a). L'existence de nombreux transporteurs au niveau hépatocytaire complique néanmoins l'interprétation moléculaire et l'identification précise des transporteurs impliqués dans les phénomènes observés. La sélectivité pour tel ou tel système de transport peut être obtenue grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, dont la variété est plus importante que pour un usage *in vivo* (Feng et al., 2014) (Tableau 7).

Tableau 7 : Substrats et inhibiteurs recommandés pour l'étude *in vitro* des transporteurs et sondes cliniques potentielles.

(Brouwer et al., 2013)

Transporter	Recommended <i>in vitro</i> system(s)	Positive control substrates (ref.)	Inhibitors (ref.)	Potential clinical probes
ABCB1 (MDR1 P-gp) ^a	LLC-MDR1	Digoxin (95)	GF120918 (80)	Digoxin
	MDCK-MDR1	Verapamil (96)	Ketoconazole (80)	
	Caco-2	Talinolol (97)	Verapamil (80)	
		Amprenavir (98)	Cyclosporin A (80) PSC833 (99)	
ABCG2 (BCRP)	MDCK-BCRP	Prazosin (100)	Ko143 (103)	Rosuvastatin
	Caco-2	Sulfasalazine (Caco-2) (101) Cimetidine (102)	GF120918 (83)	Methotrexate
ABCC2 (MRP2) ^a	MDCK-MRP2	Vinblastine (87)	MK-571 (105)	Dehydropravastatin ^{99m} Tc-Mebrofenin
		Dinitrophenyl-glutathione (87)	Probenecid (106)	
		Fluo 3-AM (104)	Cyclosporin A (104) PSC833 (104,107)	
OCT1 ^a (SLC22A1)	CHO-OCT1	Tetraethyl ammonium (108)	Decynium-22 (108)	Metformin
	HEK293-OCT1	1-Methyl-4-phenylpyridinium (108)	Quinidine (108)	Lamivudine
		Metformin (108)	Verapamil (108)	
OCT2 ^a (SLC22A2)	CHO-OCT2	Tetraethyl ammonium (108)	Decynium-22 (108)	Metformin
	HEK293-OCT2	Metformin (108)		Lamivudine
OAT1 (SLC22A6)	CHO-OAT1	p-Aminohippurate (108)	Probenecid (110)	Cidofovir
	HEK293-OAT1	Cidofovir (108)		Cephadrine
	MDCK-OAT1	Methotrexate (109)		Ciprofloxacin
OAT3 (SLC22A8)	CHO-OAT3	Estrone 3-sulfate (108)	Probenecid (110)	Cimetidine
	HEK293-OAT3	Cimetidine (108)		Cephadrine
	MDCK-OAT3	Methotrexate (109)		Ciprofloxacin
OATP1B1 ^a (SLCO1B1)	CHO-OATP1B1 ^b	Bromosulphothalein (111)	Estropipate (115)	Rosuvastatin
	HEK293-OATP1B1 ^b	Estradiol 17 β -glucuronide (112)	Cyclosporin A (116)	Atorvastatin
	MDCK-OATP1B1 ^b	Estrone 3-sulfate (113)	Rifampin (117)	Pitavastatin
		Pitavastatin (113)	Rifamycin SV (117)	Pravastatin
		Atorvastatin (113)	Bromosulphothalein (118)	
		Pravastatin (113)	MK-571 (116)	
		Rosuvastatin (30)		
Valsartan (114)				
OATP1B3 ^a (SLCO1B3)	CHO-OATP1B3 ^b	Cholecystokinin octapeptide (113)	Bromosulphothalein (120)	Telmisartan
	HEK293-OATP1B3 ^b	Estradiol 17 β -glucuronide (119)	Ursolic acid (115)	
	MDCK-OATP1B3 ^b	Bromosulphothalein (113)	Cyclosporin A (116)	
		Valsartan (113)	Rifampin (117) Rifamycin SV (117) MK-571 (116)	
OATP2B1 ^a (SLCO2B1)	CHO-OATP2B1 ^b	Estrone 3-sulfate (113)	Bromosulphothalein (120)	Rosuvastatin
	HEK293-OATP2B1 ^b	Bromosulphothalein (116)	MK-571 (116)	
	MDCK-OATP2B1 ^b			
MATE1 (SLC47A1)	CHO-MATE1	Tetraethyl ammonium (121)	Quinidine (121)	Metformin
	HEK293-MATE1	1-Methyl-4-phenylpyridinium (121)	Verapamil (121)	
		Metformin (121)	Cimetidine (122)	
			Pyrimethamine (121)	
MATE2, MATE2-K (SLC47A2)	CHO-MATE2-K	Tetraethyl ammonium (121)	Quinidine (121)	Metformin
	HEK293-MATE2-K	1-Methyl-4-phenylpyridinium (121)	Verapamil (121)	
		Metformin (121)	Cimetidine (122)	
			Pyrimethamine (121)	

Des cellules transfectées avec un ou plusieurs transporteurs d'intérêt ont été développées. Cette approche permet d'évaluer la contribution relative de chaque transporteur au phénomène global de clairance hépatique (Kitamura et al., 2008; Shimizu et al., 2005). La transfection peut être polarisée, ce qui permet d'apprécier l'interaction de différents transporteurs d'influx et d'efflux sur l'accumulation cellulaire des substrats (Hirano et al., 2004; Soars et al., 2012; Varma et al., 2012). L'inconvénient principal de ces méthodes est qu'elles ne permettent pas d'évaluer dans leur globalité le rôle des transporteurs dans le processus d'élimination hépatobiliaire. L'extrapolation des résultats *in vitro* à la pharmacocinétique *in vivo* est réalisée grâce à des modèles PBPK qui ont été développés à partir des facteurs d'échelle, essentiellement déterminés à partir de données obtenues chez l'animal (Jones et al., 2012b). Néanmoins, l'obtention de données *in vivo* est essentielle pour déterminer ces facteurs d'échelle et améliorer la pertinence des modèles PBPK pour prédire et simuler les répercussions pharmacocinétiques d'une modulation des transporteurs hépatocytaires chez l'Homme.

Des méthodes *ex vivo* permettent d'étudier le transport hépatique sur organe isolé, comme la perfusion *in situ*, où le foie est isolé et perfusé avec différents substrats. Le dosage des substrats dans les différents compartiments hépatiques et biliaires au cours du temps permet d'étudier individuellement toutes les étapes de l'élimination hépatobiliaire en mesurant les concentrations de solutés de part et d'autre de chaque interface (Pastor, 2018). Le contrôle des débits de perfusion et la possibilité d'insérer des phases de rinçage permettent de suivre la captation hépatique et l'excrétion biliaire de manière individuelle avec plus de précisions que lors d'une administration systémique des solutés (vom Dahl and Häussinger, 1997). Néanmoins, le caractère invasif de cette approche ne permet pas son utilisation chez l'Homme.

Les approches de biodistribution classiques après administration systémique, basées sur le dosage post-mortem des solutés dans le sang, le foie et la bile à différents temps, permettent d'étudier *in vivo* le fonctionnement des transporteurs hépatocytaires. Ces

techniques invasives nécessitent néanmoins un grand nombre d'animaux et ne permettent pas d'apprécier avec précision la dynamique des phénomènes de transport entre deux temps de prélèvements. La résolution temporelle de cette approche a été améliorée grâce aux techniques de microdialyse qui permettent d'établir un profil cinétique plus précis dans différents tissus de manière parallèle, utilisant ainsi moins d'animaux (Tsai and Tsai, 2004). Ces approches n'offrent néanmoins pas de perspectives translationnelles et seuls les dosages destructifs *post-mortem* dans les tissus sont possibles chez l'Homme (Bierly and Labay, 2018), ce qui n'est pas adapté à l'étude des transporteurs.

Des approches indirectes ont néanmoins été développées pour estimer l'activité OATP hépatique chez l'Homme. La clairance du vert d'indocyanine par exemple évalue la captation hépatique en mesurant la cinétique de l'élimination plasmatique du vert d'indocyanine préalablement administré (Audebert and Vignon-Clementel, 2018). Il a été montré que les concentrations hépatiques du vert d'indocyanine reflètent l'activité des transporteurs hépatocytaires (Cusin et al., 2017). A la différence de la mesure de la clairance rénale où l'on peut quantifier la cinétique d'élimination urinaire des produits utilisés (Delanaye et al., 2009), il est plus difficile de prélever et quantifier avec précision l'élimination biliaire. D'autres substrats de transporteurs sinusoidaux ont été évalués pour une mesure indirecte de l'activité de ces transporteurs et les répercussions d'une modulation de leur activité (Alam et al., 2018). Cette méthode offre donc un aperçu indirect mais très pertinent d'un point de vue pharmacocinétique, de l'extraction hépatique. Néanmoins, cette approche ne permet pas d'évaluer précisément l'excrétion biliaire dont les répercussions sur la cinétique plasmatique sont moins franches que pour les transporteurs sinusoidaux comme les OATP (Wu et al., 2019). La détermination de l'excrétion biliaire des solutés chez l'Homme reste un défi technique. L'approche la plus classique consiste à mesurer la quantité éliminée sous forme inchangée et les métabolites dans les selles par une approche analytique (molécule radiomarquée ou dosage chromatographique). Cette approche ne permet pas de

prendre en compte les phénomènes de sécrétion ou de réabsorption intestinale. Pour les formes orales, cette approche ne permet pas de distinguer la fraction qui n'a pas été absorbée. Ainsi, la fraction éliminée par les fèces reflète mal la quantité excrétée par voie biliaire. Des techniques d'aspiration de la bile pour des mesures pharmacocinétiques ont été envisagées mais restent très invasives et ne se prêtent pas à l'étude des transporteurs canaliculaires (Ghibellini et al., 2006). Aussi, ces approches ne permettent pas de déterminer les concentrations hépatiques et n'offrent donc pas la possibilité d'estimer des constantes de transfert du foie vers la bile chez l'Homme.

Ces différentes méthodes présentent chacune leur limite et ne permettent pas d'étudier directement *in vivo* l'implication des transporteurs hépatiques dans la globalité de l'élimination hépatobiliaire chez l'Homme. Le phénomène de captation hépatique est le plus facilement détectable au niveau de l'exposition systémique et peut être étudié de manière indirecte par des approches de pharmacocinétique conventionnelle. Néanmoins, l'excrétion biliaire est un phénomène tout aussi important au niveau de l'élimination et doit être étudié comme paramètre de l'efficacité et de la sécurité des médicaments, notamment en ce qui concerne l'accumulation hépatique pouvant mener à des DILI. L'excrétion biliaire est pourtant beaucoup plus complexe à évaluer, chez l'animal comme chez l'Homme, car cette interface n'est pas en contact direct avec le compartiment plasmatique. Pour ces raisons, de nouvelles méthodes translationnelles sont indispensables pour l'étude *in vivo* du rôle des transporteurs hépatocytaires afin d'en étudier la synchronicité dans le processus d'élimination hépatobiliaire, et d'en apprécier les répercussions pharmacocinétiques au niveau sanguin et tissulaire.

3. Apport de l'imagerie pour l'étude des transporteurs en pharmacocinétique

Dans la plupart des cas, le dosage de ce médicament dans le sang ne permet pas de déterminer directement, ni de façon précise, sa concentration dans le tissu où il exercera ses effets. Le dosage du médicament dans le tissu ne peut s'envisager que par des méthodes invasives et destructives, souvent peu applicables chez l'Homme. La translation à l'Homme des données tissulaires obtenues par des modèles précliniques est parfois délicate et reste un défi pour la pharmacocinétique moderne (Teitelbaum et al., 2010). L'importance pharmacocinétique des transporteurs exprimés aux différentes interfaces de l'organisme est compliquée à déchiffrer. Son étude nécessite la quantification des solutés distribués de part et d'autre de la membrane où se trouve le transporteur que l'on veut étudier.

Pour répondre à cela, des méthodes d'imagerie peu voire non-invasives ont été développées et permettent de révéler et quantifier la fonction et l'importance des transporteurs dans les processus pharmacocinétiques (Tournier et al., 2018). On parle « d'imagerie moléculaire » car ces méthodes permettent de quantifier des processus biologiques *in vivo* au niveau tissulaire. Le caractère peu invasif de ces techniques permet d'envisager des études répétées, comme par exemple lors de l'étude de l'effet de l'inhibition pharmacologique d'un transporteur chez un seul et même individu (Willmann et al., 2008). Ces méthodes nécessitent l'utilisation de sondes détectées par des systèmes de détection physique qui permettent de réaliser une image quantitative de la distribution tissulaire de la sonde. Ces dernières années, le développement de sondes substrats des transporteurs a enrichi de façon considérable les perspectives d'étude de la pharmacocinétique tissulaire des médicaments.

3.1. Modalités d'imagerie

3.1.1. La scintigraphie gamma

La scintigraphie est une technique basée sur la détection d'un rayonnement émis par un isotope émetteur gamma préalablement administré au patient, permettant ainsi de reconstituer une image bidimensionnelle. Cette technique est apparue dans les services de médecine nucléaire dans les années 1960 et s'est rapidement développée dans les années qui ont suivi (Gnanasegaran and Ballinger, 2014; Hutton, 2014; Khalil et al., 2011). L'acquisition planaire est la plus communément réalisée en scintigraphie et nécessite un ou deux détecteurs externes statiques. Ce type d'acquisition offre une bonne résolution temporelle mais la mesure de la radioactivité correspond à une projection bidimensionnelle et ne permet pas de quantification volumique de la distribution du radiotracer. La profondeur de la source et son rayonnement dans les autres directions que celles du détecteur ne peuvent pas être évalués par cette méthode, ce qui limite ses performances de quantification du signal (Frey et al., 2012). La TEMP (tomographie par émission monophotonique, SPECT en anglais pour « single photon emission computed tomography ») vise à améliorer la quantification en permettant d'obtenir des images tridimensionnelles de la distribution du traceur. Lors de ce type d'acquisition, les détecteurs tournent lentement autour du patient et réalisent ainsi une succession d'images bidimensionnelles sous différentes projections. La reconstruction de l'ensemble de ces images bidimensionnelles permet d'obtenir une projection tridimensionnelle de l'organe analysé. Le nombre élevé de projections impose un temps d'acquisition important, ce qui limite la résolution temporelle de cette technique (Frey et al., 2012). La scintigraphie a longtemps été considérée comme non quantitative, mais les progrès récents en physique médicale rendent aujourd'hui cette technique quantitative du fait de son couplage aux scanners X dans des appareils hybrides (SPECT/CT), et de l'amélioration des algorithmes pour la reconstruction des images et la mise au point de techniques performantes dans la correction de la dispersion et l'atténuation photonique (Figure 12) (Bailey and Willowson, 2014). Cette

technique bénéficiant en revanche d'une bonne sensibilité, permettant l'utilisation de microdoses de radiotracteur, avec un faible risque de toxicité. Indépendamment de certaines contraintes techniques, la scintigraphie représente un outil intéressant et peu coûteux pour l'étude des transporteurs, disponible dans n'importe quel hôpital bénéficiant d'un service de médecine nucléaire.

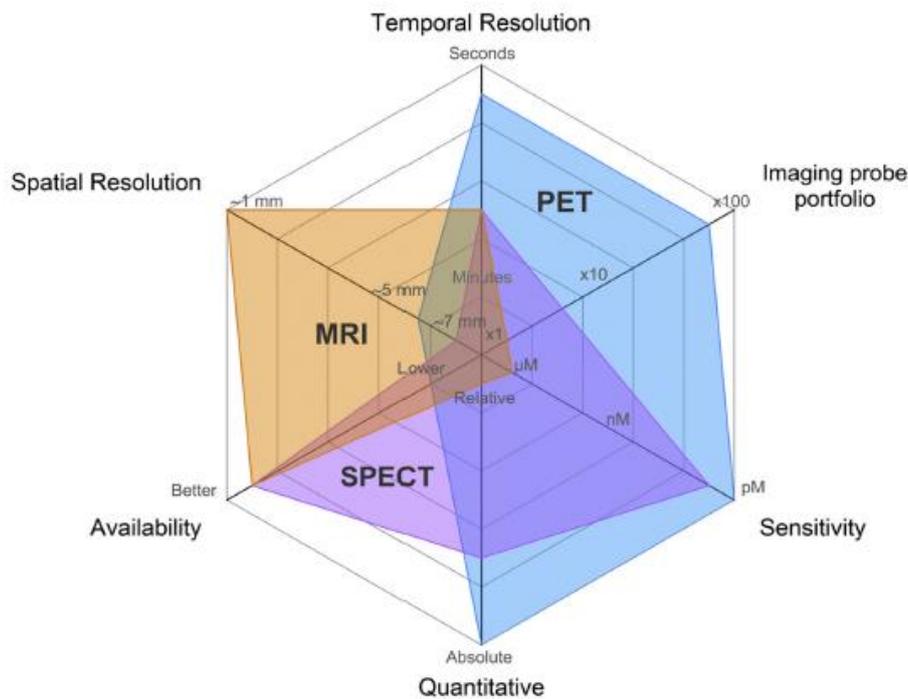


Figure 12 : Performances relatives des modalités d'imagerie clinique pour l'étude fonctionnelle des transporteurs *in vivo*.

(Tournier et al., 2018)

3.1.2. La tomographie par émission de positons (TEP)

La TEP est une autre technique de médecine nucléaire contemporaine de la scintigraphie (Jones and Rabiner, 2012; Rich, 1997). Cette approche est basée sur l'utilisation d'isotopes émetteurs de positons (rayonnement β^+) qui s'annihilent avec des électrons du milieu traversé. Les deux photons issus de cette annihilation sont alors détectés en coïncidence par la caméra TEP, qui peut ainsi reconstituer le point où a eu lieu l'annihilation. Un des avantages de la TEP est la grande diversité des possibilités

de radiomarquages avec les émetteurs de positons (Mann et al., 2015). L'imagerie TEP utilisant des analogues radiomarqués de principes actifs est très largement utilisée pour l'étude de l'importance des transporteurs dans leur distribution tissulaire (Tournier et al., 2018). Cependant, les sondes développées pour cette modalité sont très souvent métabolisées *in vivo* et le système de détection ne peut pas distinguer le rayonnement émis par le radiotracer administré de celui d'un éventuel métabolite radiomarqué, dont l'interaction avec les transporteurs étudiés peut être différente. Le développement de ce type de radiotraceurs doit donc privilégier les sondes les plus stables métaboliquement et la présence éventuelle de ces radiométabolites doit être prise en compte lors de la quantification pour évaluer le plus précisément possible la capacité de transport *in vivo* (Pike, 2009). Tout comme la TEMP, la grande sensibilité de détection des caméras TEP permet d'administrer les radiopharmaceutiques à des microdoses. Toutefois, la TEP présente certains avantages par rapport à la TEMP comme une plus grande sensibilité de détection et une meilleure résolution temporelle et spatiale (Figure 12). La TEP bénéficie en effet d'un système de détection en anneau permettant directement la quantification tridimensionnelle du radiotracer. Tout comme la TEMP, la TEP est une méthode d'imagerie fonctionnelle qui ne donne que très peu d'informations morphologiques. La délimitation de certains organes ou structures est souvent compliquée sur les images TEP. Des informations anatomiques peuvent être obtenues par l'association de la modalité TEP à une modalité d'imagerie anatomique comme le scanner X (CT) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM). La fusion des données obtenues fournit alors des informations à la fois morphologiques et fonctionnelles. Des équipements hybrides (TEP/CT, TEP/IRM) existent afin de permettre l'acquisition et le recalage de ces images à partir d'un seul appareil (Bailey et al., 2018; Beyer et al., 2000).

3.1.3. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

Comparée aux techniques d'imagerie nucléaire, l'IRM présente l'avantage d'être une modalité d'imagerie ne nécessitant pas l'utilisation de rayonnements ionisants. Cette technique de radiologie utilise des impulsions d'ondes radio qui excitent l'énergie de transition des spins nucléaires qui sont ainsi alignés sous l'effet d'un puissant champ magnétique. L'énergie libérée sous forme de radiofréquences par les atomes lors de leur réalignement est détectée, ce qui permet de localiser le signal émis dans l'espace (Bradley and Shelden, 1983; Scherzinger and Hendee, 1985). Cette méthode permet d'obtenir des images d'une excellente qualité anatomique, qui offrent en plus la possibilité de visualiser des processus physiologiques avec une bonne résolution spatiale et un excellent contraste dans les tissus mous. Afin d'améliorer la qualité de ces images, des agents de contraste ont été utilisés dès les années 1980 (Xiao et al., 2016). L'un des inconvénients de ces agents, par rapport aux radiotraceurs utilisés en imagerie nucléaire, est qu'ils doivent être administrés à des doses importantes pour être détectés (Figure 12). La sensibilité du système de détection est donc limitée (de l'ordre du micro- voire du millimolaire) et la quantification tissulaire de la concentration de l'agent de contraste est complexe (Sinharay and Pagel, 2016). L'IRM, en présence d'agent de contraste dans les tissus, permet néanmoins de détecter un changement temporel rapide du signal grâce au changement de contraste. L'IRM permet ainsi d'obtenir des données semi-quantitatives et des images à haute résolution spatio-temporelle qui présentent un intérêt certain pour l'étude fonctionnelle de certains transporteurs *in vivo* (Georgiou et al., 2017).

3.2. Chimie et marquage des sondes pour l'imagerie

Les sondes pour l'imagerie des transporteurs sont rarement élaborées *ex nihilo* mais sont le plus souvent dérivées de médicaments, de leurs métabolites ou de composés endogènes connus pour être substrats d'un transporteur d'intérêt (Kusuhara, 2013; Mairinger et al., 2011; Testa et al., 2015). Pour l'imagerie nucléaire, la période physique d'une sonde d'imagerie doit être compatible avec la période biologique de la molécule

d'intérêt. Pour l'étude des transporteurs, qu'ils soient ABC ou SLC (par exemple au niveau du foie, de la BHE et des reins) des radionucléides de courte période physique peuvent être utilisés, comme les radionucléides émetteurs de positons.

Le plus connu des médicaments émetteurs de positons est le 2-[¹⁸F]fluoro-2-désoxy-D-glucose ([¹⁸F]FDG), développé pour l'imagerie TEP à la fin des années 1970 (Ido et al., 1978). A ce jour, il s'agit encore du radiopharmaceutique le plus utilisé en TEP mais de nombreux autres traceurs ont été développés depuis (Vallabhajosula et al., 2011) et cette modalité d'imagerie est désormais utilisée dans le développement de nombreux médicaments (Willmann et al., 2008). L'émetteur de positons le plus fréquemment utilisé en routine clinique reste le fluor-18 (¹⁸F) dont la période est de 109,8 minutes. Le gallium-68 (⁶⁸Ga, période 67,7 minutes) a également fait son apparition dans les services de médecine nucléaire il y a quelques années et s'est largement répandu depuis. D'autres radionucléides comme le carbone-11 (¹¹C, période 20,3 minutes) sont utilisés pour l'imagerie TEP presque exclusivement dans des protocoles de recherche clinique. Ces radionucléides sont produits en cyclotron (à l'exception du gallium-68 produit grâce à un générateur de germanium-68/gallium-68). La radiosynthèse des radiotraceurs TEP nécessite des mesures de radioprotection adaptées et des modules de synthèse automatisés. Pour cela, la synthèse de ce type de sonde ne peut pas être réalisée dans n'importe quelle structure hospitalière car une infrastructure spécialisée est indispensable pour réaliser ces réactions de radiomarquage, avec notamment un cyclotron et un laboratoire de radiochimie équipé d'automates de synthèse. La production de radiopharmaceutiques à finalité clinique doit se conformer aux Bonnes Pratiques de Fabrication, ce qui augmente la complexité et le coût de la radiochimie destinée à la TEP (European Medicines Agency, 2017). Le carbone-11 est le radionucléide de choix pour l'étude *in vivo* de la cinétique des petites molécules car il permet de marquer des molécules sans aucune modification structurelle. Ce marquage au carbone-11 est le plus souvent réalisé par [¹¹C]méthylation d'un hydroxyl phénolique, acide carboxylique ou groupe amino grâce à un iodure de [¹¹C]méthyl ou

triflate de [¹¹C]méthyl comme agent de radiomarquage. Des approches alternatives de radiomarquage au carbone-11 ont cependant été développées ces dernières années et offrent aujourd'hui des possibilités plus larges de marquage de différents groupes fonctionnels et structures grâce à ce radionucléide (Li and Conti, 2010). L'utilisation des traceurs marqués au carbone-11 reste toutefois limitée par sa très courte période physique qui restreint leur utilisation aux centres de recherche équipés d'un cyclotron directement à proximité d'une caméra TEP. D'une manière générale, la période physique relativement courte des radionucléides émetteurs de positons impose que les radiotraceurs TEP soient synthétisés, contrôlés et administrés très rapidement. La période physique du fluor-18 (109.8 minutes) permet néanmoins de mesurer la distribution tissulaire des sondes marquées avec ce radionucléide et d'en évaluer leur pharmacocinétique pendant plusieurs heures (Brunner et al., 2004; Wuest, 2007). La réaction de marquage au fluor-18 classiquement utilisée est la substitution nucléophile avec la substitution d'un groupe partant (nitro, cyano, chloro, bromo, tosylate, mésylate par exemple) par un [¹⁸F]fluorure. La radiochimie TEP est souvent réalisée avec une importante activité molaire, c'est-à-dire une quantité de radioactivité importante rapportée à la masse de produit (souvent exprimé en GBq/μmol). Pour ces raisons, la masse chimique du médicament non marqué contenu dans la quantité injectée de traceur TEP est très faible (< 100 μg) et répond à la définition d'une « microdose » du point de vue de la réglementation pharmaceutique. Cette particularité simplifie considérablement l'acceptation par les autorités de l'utilisation clinique de radiotraceurs TEP, dont les études toxicologiques précliniques et le dossier sont simplifiés (European Medicines Agency, 2008). La faible quantité de médicament associée à ces radiotraceurs n'entraîne normalement pas d'effet pharmacologique, ce qui confère une certaine sécurité à cette méthode d'imagerie (Langer, 2016).

La mise en œuvre pratique de la radiochimie destinée à la scintigraphie est plus simple que la TEP mais il s'agit souvent d'une chimie de chélation, ce qui limite les possibilités de marquer les substrats sans modifier de façon importante les propriétés physico-

chimiques des molécules marquées et ainsi potentiellement leurs caractéristiques pharmacocinétiques (Tournier et al., 2009). C'est le cas par exemple du technétium-99 métastable (^{99m}Tc) qui est le radionucléide le plus fréquemment utilisé pour la scintigraphie du fait de son énergie moyenne (140 keV) adaptée aux systèmes de détection, sa courte période physique (6,0 heures) et sa disponibilité grâce au générateur de molybdène-99/technétium-99m présent dans tous les services de médecine nucléaire. Les complexes formés avec ce radionucléide présentent néanmoins l'avantage d'un marquage simple et rapide, pouvant être réalisé manuellement. Les radiopharmaceutiques technétiés bénéficient pour la plupart d'une excellente stabilité en solution et *in vivo*. Beaucoup d'autres radionucléides émetteurs gamma sont utilisés classiquement pour la réalisation de scintigraphies, parmi lesquels l'iode-123 et l'indium-111 par exemple. Certains radiotraceurs marqués par des émetteurs gamma développés initialement pour des examens de médecine nucléaire et très largement utilisés en routine clinique se sont ensuite avérés être des sondes intéressantes pour l'imagerie moléculaire des transporteurs. C'est le cas du [^{99m}Tc]sestamibi, utilisé depuis des années en médecine nucléaire principalement pour l'imagerie cardiaque, qui a été identifié comme substrat de la P-gp et de MRP1 (Hendrikse et al., 2004; Perek et al., 2000; Piwnica-Worms et al., 1993). Un autre exemple intéressant est la [^{99m}Tc]mébrofénine dont l'utilisation sera développée largement dans la partie expérimentale de ce mémoire. Bien que moins quantitatives que les traceurs TEP, ces sondes scintigraphiques présentent l'avantage d'une certaine simplicité d'utilisation et d'une grande disponibilité qui permet d'envisager l'étude de certains transporteurs membranaires en milieu hospitalier (Tournier et al., 2018) (Figure 12).

La variété des agents de contraste pour l'IRM est beaucoup plus limitée que celle des radiotraceurs. La chimie des agents de contraste repose principalement sur l'utilisation de métaux associés par des chélates, ce qui limite les possibilités de marquage. Le premier métal a été le chlorure ferrique superparamagnétique puis le gadolinium a ensuite très rapidement fait son apparition (Xiao et al., 2016). Le développement de

sondes marquées au gadolinium a néanmoins permis à L'IRM d'occuper une place grandissante dans le domaine clinique en permettant de détecter des processus biologiques au niveau tissulaire (Sinharay and Pagel, 2016). Le gadoxétate, par exemple (gadolinium-éthoxybenzyl-diéthylènetriamine-acide pentacétique, Gd-EOB-DTPA) est un agent de contraste utilisé pour l'IRM hépatobiliaire dérivé du marqueur de fluides extracellulaires gadopentétate (gadolinium-diéthylènetriamine-acide pentacétique). L'ajout de la fraction lipophile éthoxybenzyl au gadopentétate a permis d'obtenir une augmentation du contraste spécifique de la sonde au niveau du foie. On sait maintenant que cette distribution spécifique s'explique grâce à la captation de ce nouvel agent par le foie et à son élimination biliaire médiées par les transporteurs exprimés aux différents pôles de l'hépatocyte (van Montfoort et al., 1999). Cet agent de contraste présente également l'avantage d'une excellente stabilité *in vivo*, sans aucune biotransformation identifiée, ce qui en fait une sonde particulièrement intéressante pour l'étude *in vivo* des transporteurs hépatiques.

3.3. Modélisation des données d'imagerie

Les méthodes classiquement utilisées en pharmacocinétique évaluent principalement les concentrations de médicaments en fonction du temps dans le plasma, le sang total ou les liquides biologiques, car ils sont accessibles au prélèvement. Ces profils de concentrations obtenus en fonction du temps permettent de déterminer un certain nombre de paramètres pharmacocinétiques comme la concentration maximale du médicament dans le plasma (C_{max}), le temps pour l'atteindre (T_{max}), l'aire sous la courbe (ASC) et la clairance totale (CL) du médicament. L'intérêt des différentes techniques d'imagerie décrites précédemment est qu'elles permettent de mesurer les profils de concentrations tissulaires de leurs sondes. Parmi les différentes techniques d'imagerie, la TEP est la modalité de choix pour la modélisation pharmacocinétique car elle permet une quantification précise de la concentration volumique des radiotraceurs dans les tissus. L'IRM permet quant à elle de révéler des changements de contraste associés à la concentration des agents de contraste dans les tissus. La conversion de ces données

dynamiques en concentrations absolues de l'agent dans les tissus est possible mais complexe (Ingrisch and Sourbron, 2013; Sourbron and Buckley, 2013).

L'interprétation des cinétiques de concentrations tissulaires nécessite l'utilisation de modèles mathématiques adaptés. Les paramètres pharmacocinétiques descriptifs (C_{max} , T_{max} , ASC) constituent déjà une première approche qui donne un aperçu des modifications cinétiques liées à l'activité des transporteurs. L'étude des ASC de l'activité en fonction du temps (« *time-activity curve* », TAC) de la sonde dans les tissus concernés est également un indicateur important de l'exposition tissulaire. Une analyse simple des données d'imagerie pour l'étude de l'activité des transporteurs consiste à calculer le rapport des ASC entre les deux compartiments de part et d'autre de la membrane où se situe le transporteur que l'on veut évaluer. Si l'on prend l'exemple de l'hépatocyte, l'évaluation de l'activité des transporteurs situés sur la membrane sinusoidale peut être déterminée par le calcul du rapport d'ASC : $ASC_R = \frac{ASC_{foie}}{ASC_{sang}}$, calculé sur les temps précoces de l'acquisition, correspondant à la phase de captation du traceur. De la même manière, l'évaluation de l'activité des transporteurs situés sur la face canaliculaire de l'hépatocyte peut être déterminée par le rapport d'ASC : $ASC_R = \frac{ASC_{intestin}}{ASC_{foie}}$, calculé sur des temps tardifs de l'acquisition correspondant à la phase d'élimination du traceur.

Lorsque la concentration de la sonde dans le sang est connue, une approche par analyse compartimentale peut également être envisagée pour calculer les paramètres pharmacocinétiques décrivant la distribution tissulaire de la sonde, comme la constante de transfert de la sonde du sang vers le tissu. Ces approches par modélisation utilisées pour analyser les données issues de l'imagerie sont assez semblables à celles utilisées en pharmacocinétique conventionnelle, mais la terminologie employée peut parfois être différente (Innis et al., 2007). La notion de volume de distribution par exemple renvoie en pharmacocinétique clinique au volume apparent dans lequel un médicament se distribuerait à l'équilibre. Il s'agit d'un volume

théorique calculé par la quantité de médicament biodisponible divisée par la concentration plasmatique de ce médicament. Lors de l'analyse de données TEP, le volume de distribution (V_T) correspond lui au coefficient de répartition du radiotraceur entre le tissu et le plasma à l'équilibre (Innis et al., 2007).

La technique de référence pour mesurer la concentration du radiotraceur dans le sang en fonction du temps, paramètre indispensable à la modélisation, est la détermination de la fonction d'entrée. Cette technique nécessite des prélèvements de sang artériel et est souvent délicate à mettre en œuvre chez le petit animal. Chez l'Homme, la réalisation de prélèvements artériels pose des problèmes d'acceptabilité compte-tenu du caractère invasif de ces prélèvements. Si des métabolites radiomarqués circulent dans le sang, la radioactivité totale mesurée dans celui-ci doit alors être corrigée de ces métabolites radiomarqués pour obtenir une fonction d'entrée artérielle dite « corrigée des métabolites ». Cela est possible par l'analyse d'échantillons de sang artériel par des méthodes séparatives comme la chromatographie (liquide à haute pression la plupart du temps). Pour certains radiotraceurs, une alternative plus simple et moins invasive que le prélèvement artériel est la détermination de la fonction d'entrée dérivée de l'image, qui consiste en l'extraction de données issues de l'image TEP, par exemple en plaçant le volume d'intérêt sur un vaisseau artériel (Innis et al., 2007). Cependant, cette méthode n'est valable que pour les radiotraceurs peu métabolisés car la fonction d'entrée dérivée de l'image ne permet pas de corriger individuellement par les métabolites radiomarqués circulant chez chacun des sujets.

La modélisation compartimentale des données d'imagerie permet de déterminer certains paramètres comme les constantes de transfert des radiotraceurs entre le sang et les tissus (Innis et al., 2007). Beaucoup de transporteurs ABC et SLC sont exprimés au niveau d'interfaces sang-tissus et ces paramètres sont donc de bons indicateurs pour en évaluer l'activité. Il a par exemple été montré que l'activité de certains transporteurs d'efflux au niveau de la BHE, comme la P-gp et la BCRP, influence la constante de transfert du radiotraceur du plasma vers le cerveau (K_1) et du rapport

cerveau/plasma V_f . Une diminution de l'activité de l'efflux au niveau de la BHE par l'administration d'un inhibiteur de transporteur se traduit par une augmentation du K_1 et du V_f (Muzi et al., 2009; Wagner et al., 2009). L'inhibition de certains transporteurs d'efflux au niveau de la BHE a également permis de démontrer une diminution de la constante d'efflux du cerveau vers le sang (k_2) (Pottier et al., 2016; Tournier et al., 2019). Cependant, les modèles utilisés pour décrire la cinétique cérébrale de radiotraceurs au travers de la BHE comme unique interface ne se prêtent pas à l'étude des transporteurs hépatiques. En effet, les modèles doivent prendre en compte les deux interfaces sinusoidales et canaliculaires pour une interprétation correcte des données cinétiques (Hernández Lozano et al., 2019). Concernant les transporteurs d'influx, il a aussi été montré que leur inhibition par exemple au niveau de la membrane sinusoidale des hépatocytes (les OATP en particulier) entraînait une diminution de la constante de transfert de leurs radiotraceurs du sang vers le foie (Takashima et al., 2012). Dans les approches pharmacocinétiques classiques, des clairances de distribution par organe sont souvent déterminées. Elles sont calculées en multipliant la constante de transfert par le volume du compartiment concerné (sang ou organe). Une approche par analyse graphique (*integration plot analysis*) est parfois utilisée pour déterminer les clairances de distribution des radiotraceurs du sang vers les tissus, dérivées des données obtenues par imagerie, TEP le plus souvent (clairances de captation, également appelées « *uptake clearances* ») (Amor et al., 2018; Ikoma et al., 2006; Takashima et al., 2012). La clairance de distribution du sang vers le foie sera par exemple calculée par la formule : $\frac{X_{\text{foie},t}}{C_{\text{plasma},t}} = CL * \left(\frac{ASC_{\text{plasma},0-t}}{C_{\text{plasma},t}} \right) + V_E$ avec $X_{\text{foie},t}$ qui représente la quantité totale du radiotraceur dans le foie à l'instant t, $C_{\text{plasma},t}$ sa concentration dans le sang à l'instant t et $ASC_{\text{plasma},0-t}$ l'aire sous la courbe plasmatique de 0 au temps t. La clairance de distribution CL correspond à la pente de la droite de régression linéaire et V_E représente le volume de distribution initial du radiotraceur dans le foie au temps 0. Cette approche peut également être appliquée pour déterminer les clairances intrinsèques d'efflux des radiotraceurs, en particulier du foie vers la bile et du rein vers

l'urine, afin de mesurer l'activité des transporteurs d'efflux situés sur la membrane canaliculaire des hépatocytes et sur la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales rénales respectivement (Shingaki et al., 2015; Takashima et al., 2013; Traxl et al., 2017). La formule utilisée pour déterminer par exemple la clairance d'élimination du foie vers la bile est : $X_{\text{bile},t} = \text{CL} * \text{ASC}_{\text{foie},0-t} + X_E$ avec $X_{\text{bile},t}$ quantité du radiotraceur dans la bile à l'instant t , $\text{ASC}_{\text{foie},0-t}$ l'aire sous la courbe hépatique de 0 au temps t et X_E la distribution initiale du radiotraceur dans la bile au temps 0.

Ce type d'approche est assez simple à mettre en œuvre, en particulier sur des petits animaux comme les rongeurs, car le corps de l'animal est souvent positionné en entier dans le champ de vue de la caméra. Cela permet d'obtenir les cinétiques de distribution du radiotraceur dans tous les organes et tissus en une seule acquisition, ce qui est plus difficilement réalisable chez l'Homme. Par exemple lors d'acquisitions TEP cliniques, il n'est souvent pas possible d'obtenir de façon simultanée les données cinétiques du radiotraceur au niveau du cœur et de la vessie car le champ de vue des caméras TEP est trop étroit pour cela. Des caméras TEP corps-entier (« Total Body PET ») sont actuellement en développement pour répondre à ce besoin (Vandenberghe et al., 2020). Néanmoins, ces appareils ne correspondent pas à l'utilisation clinique de la TEP et ne font l'objet que de quelques prototypes dans le monde.

La modélisation des données hépatiques est particulièrement complexe du fait de la double vascularisation du foie, à la fois par l'artère hépatique (environ 25%) et par la veine porte (environ 75%). Le sang de la veine porte ne peut pas être prélevé directement chez l'Homme et des modèles ont été mis au point pour tenter de prendre en compte ce paramètre. Ces modèles s'appuient soit sur des données de sang portal dérivées d'images, mais qui peuvent être biaisées par des artefacts liés au faible volume des structures analysées, soit sur des données acquises par des expérimentations précliniques dans lesquelles le sang portal a été prélevé, soit sur des modèles mathématiques permettant d'estimer la concentration du traceur dans le sang portal à partir des données obtenues dans le sang artériel et les autres organes (Hernández

Lozano et al., 2019; Ørntoft et al., 2017; Sørensen et al., 2016). Ce genre d'approche par modélisation pharmacocinétique est très largement utilisé pour l'imagerie TEP mais devrait pouvoir aussi s'appliquer aux autres modalités comme la scintigraphie (Neyt et al., 2013; Pfeifer et al., 2013) ou l'IRM (Saito et al., 2013; Sourbron et al., 2012).

3.4. Développement des sondes pour l'imagerie des transporteurs : les leçons de l'imagerie de la P-glycoprotéine

La P-gp est le transporteur membranaire dont l'implication en pharmacocinétique fait l'objet du plus de travaux (Finch and Pillans, 2014). Son importance, en particulier au niveau de l'épithélium intestinal, est bien décrite et il est possible de quantifier les répercussions fonctionnelles de ce transporteur sur la biodisponibilité des médicaments administrés par voie orale (Zhou, 2008). La P-gp est également exprimée au niveau du pôle vasculaire des cellules endothéliales des microcapillaires cérébraux qui forment la BHE (Schinkel, 1997). Dans ce cas, l'impact de la P-gp sur la distribution de ses substrats dans le compartiment cérébral ne peut être prédite à partir des seules concentrations plasmatiques. On sait grâce à des études invasives chez l'animal que la P-gp joue un rôle essentiel dans la protection du cerveau et du système nerveux central, en empêchant la pénétration de xénobiotiques ou de composés endogènes potentiellement neurotoxiques (Abbott et al., 2010). Chez l'Homme, une forte expression protéique du transporteur a été mise en évidence et laisse supposer que la P-gp conditionne, au moins partiellement, les effets centraux des nombreux médicaments substrats de ces transporteurs, en contrôlant leur exposition cérébrale (Uchida et al., 2011). Les méthodes invasives n'étant pas applicables à l'Homme, un certain nombre de radiotraceurs ont été développés pour étudier la P-gp au niveau de la BHE. La mise au point de ces sondes d'imagerie des transporteurs, au travers de nombreuses études réalisées par plusieurs laboratoires internationaux, a apporté un éclairage sur les critères et les qualités nécessaires au développement de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie des transporteurs de médicaments.

3.4.1. Choix du radionucléide pour radiomarquage

Bien que le fluor-18 soit le radionucléide le plus utilisé en pratique clinique, c'est le carbone-11 qui est souvent le radionucléide de choix pour le développement de nouvelles sondes de transporteurs. En effet, le carbone-11 permet le radiomarquage d'un grand nombre de molécules connues sans en modifier les propriétés biologiques. Dans le cas de l'étude de la P-gp au niveau de la BHE, trois sondes ont fait l'objet d'un développement clinique, toutes trois marquées au carbone-11 : le [¹¹C]vérapamil, le [¹¹C]-*N*-desméthyl-lopéramide et le [¹¹C]métopropramide (Figure 13) (Marie and Tournier, 2020). Un autre aspect important dans le choix du radionucléide est que sa période physique doit être compatible avec le processus biologique à étudier (Pike, 2009). Pour l'étude des transporteurs, en particulier au niveau de la BHE, la distribution de la sonde vers le transporteur après son injection est très rapide et malgré la période courte du carbone-11, ce radionucléide est tout à fait adapté pour ce genre d'études.

3.4.2. Concept de microdose

Les sondes utilisées en imagerie TEP et TEMP sont administrées à microdoses, c'est-à-dire qu'elles doivent remplir simultanément trois critères définis par le Conseil International d'Harmonisation (ICH) : dose totale < 100 µg, dose totale < 1/100^{ème} du NOAEL (« *No Observed Adverse Effect Level* ») et dose utilisée < 1/100^{ème} de la dose active pharmacologiquement (Burt et al., 2016; International Conference of Harmonization, 2009). L'utilisation de ces très faibles doses implique que les médicaments radiomarqués pour l'étude des transporteurs n'auront pas d'effet pharmacologique, ce qui garantit une certaine sécurité d'utilisation. Cependant, l'activité des transporteurs membranaires est saturable lorsque ses substrats sont présents en fortes concentrations. Cette situation peut introduire un biais dans l'interprétation de la distribution tissulaire du fait de la non-linéarité des paramètres pharmacocinétiques, qui peut dans certains cas limiter l'extrapolation aux doses pharmacologiques des observations réalisées à microdoses. L'administration des radiotraceurs à microdoses permet normalement de les étudier en dessous de ces

niveaux de saturation mais il peut être utile de le vérifier par des examens TEP lors d'une administration d'une dose pharmacologique du composé d'intérêt (Traxl et al., 2015). Le choix de radiomarquer un médicament couramment utilisé en pratique clinique comme le vérapamil ou le métoprolol permet alors de simplifier cette étape du développement puisque la sécurité d'utilisation de ces composés a déjà été validée aux doses pharmacologiques.

3.4.3. Capacité de transport et sélectivité

Un paramètre essentiel dans le choix du radiotracer est que celui-ci soit substrat du transporteur d'intérêt et que son transport au niveau de l'interface que l'on souhaite étudier se fasse sélectivement par ce transporteur (Pike, 2009). En effet, un très grand nombre de radiotraceurs transportés par la P-gp le sont aussi par d'autres transporteurs d'efflux ABC exprimés au niveau de la BHE voire par certains SLC comme c'est le cas par exemple du [^{11}C]erlotinib transporté par la P-gp mais aussi par la BCRP et OATP2B1 (Bauer et al., 2018a; Kannan et al., 2009) ou encore le [^{11}C]glyburide qui est substrat d'un grand nombre de protéines ABC et de certains OATP (Tournier et al., 2013). La réalisation de tests *in vitro* est donc une étape préliminaire indispensable au développement d'une nouvelle sonde afin de s'assurer que le candidat soit bien sélectif du transporteur que l'on souhaite étudier, en tout cas au niveau de la membrane d'intérêt (Kannan et al., 2009). Certaines caractéristiques conditionnent l'utilisation future des radiotraceurs substrats de transporteurs. Le [^{11}C]-*N*-desméthyl-lopéramide, par exemple, est très fortement transporté par la P-gp, à tel point que son passage cérébral basal vers le compartiment cérébral est extrêmement faible (Figure 13). Ainsi, ce radiotracer ne permet pas d'explorer les répercussions fonctionnelles dans les situations où une augmentation de l'efflux par la P-gp est suspectée, comme par exemple la pharmacorésistance à certains médicaments dont les cibles sont cérébrales. Le [^{11}C]métoprolol en revanche est un substrat « modéré » de la P-gp qui présente un passage basal significatif de la BHE (Figure 13). Une première étude clinique avec ce radiotracer a d'ailleurs permis d'affiner les connaissances du rôle du

transporteur au niveau de la BHE en montrant pour la première fois que la P-gp ne participe pas uniquement à la propriété de « barrière » en empêchant l'entrée des composés dans le cerveau, mais qu'elle agit également comme un système de détoxification, en augmentant l'efflux des médicaments substrats ayant franchi le BHE et en limitant ainsi l'exposition cérébrale de ces composés (Tournier et al., 2019). Chez la souris, le [^{11}C]métoclopramide a permis de détecter les répercussions fonctionnelles d'une induction de la P-gp au niveau de la BHE (Zoufal et al., 2020).

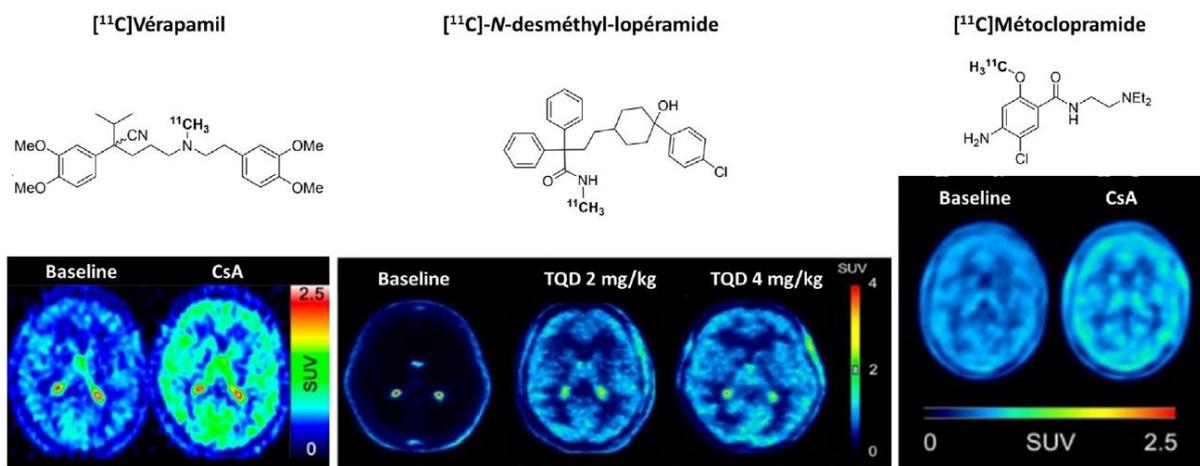


Figure 13 : Radiotraceurs utilisés pour l'imagerie de la P-gp et exemples d'images obtenues chez des volontaires sains.

Chacun des radiotraceurs a été administré en condition basale (baseline) puis après injection d'un inhibiteur de la P-gp : ciclosporine A (CsA) ou tariquidar (TQD).

(Marie and Tournier, 2020)

3.4.4. Intensité du signal

Un autre point important illustré par la Figure 13 est l'intensité de la différence de signal dans le tissu avant et après inhibition du transporteur à l'entrée de ce tissu. Le moyen le plus efficace pour révéler l'activité d'un transporteur est de le bloquer grâce à un inhibiteur de ce transporteur et ainsi mesurer la différence d'activité entre la situation basale et la situation d'inhibition (Marie and Tournier, 2020). La ciclosporine a par exemple été utilisée comme inhibiteur de la P-gp avec le [^{11}C]vérapamil et le

[¹¹C]métoclopramide. Pour le [¹¹C]-*N*-desméthyl-lopéramide il s'agissait du tariquidar, une molécule développée spécifiquement pour l'inhibition de la P-gp (Figure 13). Ces différentes études réalisées chez l'Homme ont permis de montrer que le passage cérébral des radiotraceurs augmentait après inhibition pharmacologique du transporteur d'efflux (Kreisl et al., 2015; Muzi et al., 2009; Tournier et al., 2019). D'autre part, du fait de la faible résolution spatiale de l'imagerie TEP (Figure 12), l'étude de la P-gp au niveau de régions cérébrales de petites tailles ou à proximité de tissus présentant un fort signal TEP peut être biaisée (Kannan et al., 2009). L'utilisation des sondes présentant une bonne intensité de signal permet de limiter cet effet que l'on appelle « effet de volume partiel » (Lehnert et al., 2012).

3.4.5. Métabolisme

Un autre critère essentiel est la pureté radiochimique du signal émis par la sonde, c'est-à-dire l'absence de métabolites radiomarqués au niveau du tissu cible (Pike, 2009). Les radiotraceurs développés pour l'étude des transporteurs subissent pour certains un métabolisme important qui peut fausser les résultats et conduire à une évaluation erronée de l'activité du transporteur. C'est le cas du [¹¹C]vérapamil qui subit un métabolisme intense et certains de ses métabolites chez l'Homme sont radiomarqués et également substrats de la P-gp, alors que d'autres passent librement la BHE (Figure 14) (Ikoma et al., 2006). Ainsi, la quantification et la modélisation des échanges entre le sang et le cerveau sont particulièrement complexes pour ce radiotracer et nécessitent l'utilisation d'un modèle compartimental avec deux fonctions d'entrée artérielles, l'une pour le radiotracer, l'autre pour ses radiométabolites (Pike, 2009).

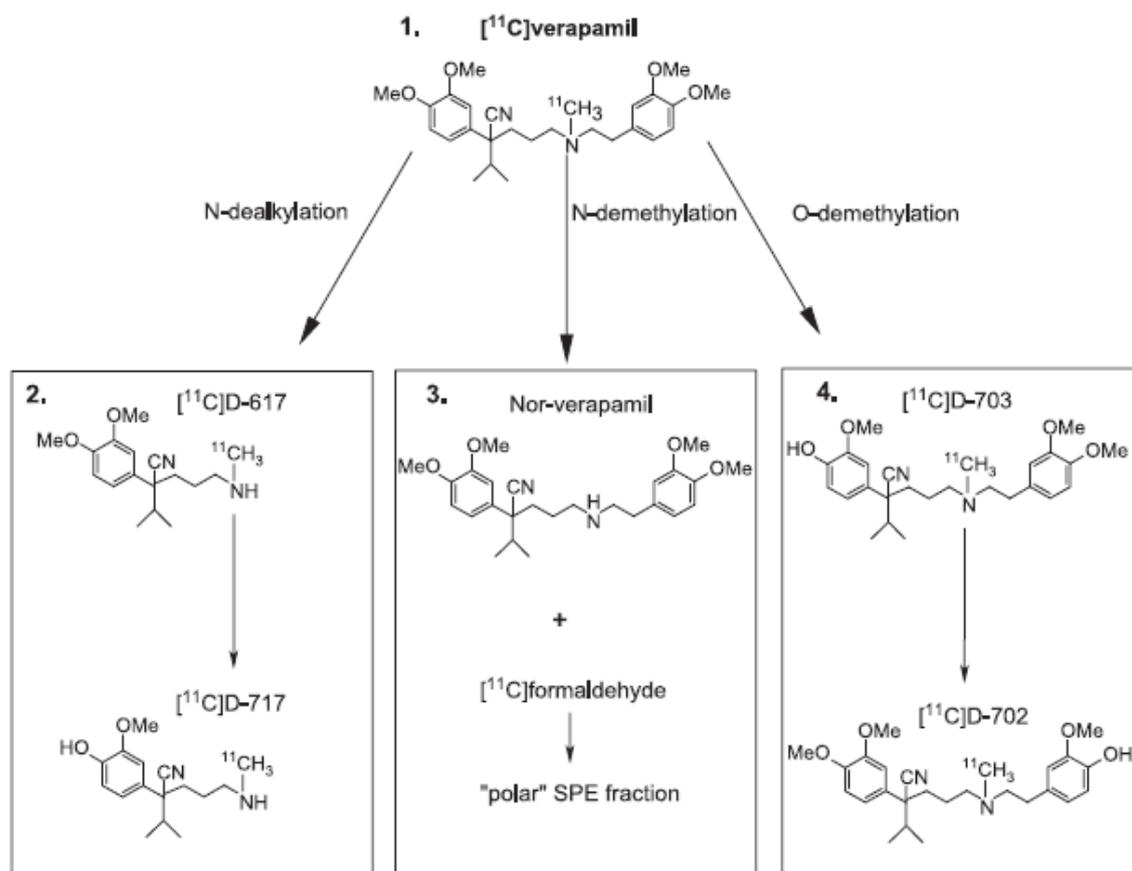


Figure 14 : Métabolisme du [¹¹C]vérapamil.

(Luurtsema et al., 2005)

Le [¹¹C]-*N*-desméthyl-lopéramide bénéficie d'une excellente stabilité métabolique conférant une excellente pureté radiochimique à son signal. Il s'agit d'un métabolite du lopéramide, principe actif connu pour être très fortement substrat de la P-gp au niveau de la BHE (Lazarova et al., 2008; Marie and Tournier, 2020). Le lopéramide avait initialement été marqué au carbone-11 dans l'idée de l'utiliser pour réaliser de l'imagerie de la P-gp, mais il s'est avéré lui aussi fortement métabolisé (Zoghbi et al., 2008). Un de ses métabolites radiomarqués, le [¹¹C]-*N*-desméthyl-lopéramide a été retrouvé en grande quantité dans le cerveau lorsque la P-gp était inhibée (Zoghbi et al., 2008). C'est donc vers cette sonde, qui a ensuite été mise au point par radiosynthèse (Lazarova et al., 2008), que s'est orientée la suite du développement, en raison de sa meilleure stabilité métabolique. Les sondes métaboliquement stables sont donc à privilégier pour l'imagerie, en particulier pour l'étude des transporteurs exprimés au

niveau des organes de clairance, comme le foie ou le rein, où molécule mère et métabolites coexistent fréquemment pour la plupart des médicaments.

3.4.6. Variabilité interespèces

Il est important de prendre en compte des variabilités interespèces lors du développement de sondes. Un radiotracer peut s'avérer être un excellent candidat pour l'imagerie d'un transporteur chez certaines espèces et ne pas être utilisable chez l'Homme. Cela a été le cas du [¹⁸F]MPPF, un antagoniste des récepteurs à la sérotonine qui avait été développé comme traceur de la P-gp suite à des résultats encourageants chez le rongeur (la Fougère et al., 2010; Passchier et al., 2000). Des expériences réalisées chez le primate et *in vitro*, en utilisant des cellules transfectées par le gène de la P-gp humaine, ont cependant montré que le [¹⁸F]MPPF n'est pas transporté par la P-gp humaine (Tournier et al., 2012).

3.4.7. Exemples d'apports cliniques pour l'étude de la P-gp au niveau de la BHE

Le développement de ces traceurs a permis d'approfondir de façon considérable la connaissance du fonctionnement de la P-gp au niveau de la BHE. Malgré ses défauts principalement liés à son métabolisme, le [¹¹C]vérapamil est le plus ancien des radiotraceurs mis au point et c'est avec cette sonde qu'ont été réalisées la plupart des études cliniques à l'heure actuelle. Ce radiotracer a par exemple permis de montrer l'influence de l'âge et du sexe sur l'activité de la P-gp au niveau de la BHE (van Assema et al., 2012) ainsi que certaines altérations pathologiques de sa fonction comme dans la maladie d'Alzheimer ou l'épilepsie (Feldmann et al., 2013; Wolf et al., 2012). Pouvoir visualiser et quantifier la fonction de la P-gp au niveau cérébral ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude fonctionnelle de ce transporteur, mais aussi pour la compréhension des mécanismes qui régulent la neuropharmacocinétique des médicaments.

Les avancées récentes faites dans le développement des sondes pour l'imagerie des transporteurs membranaires permettent d'envisager l'étude de leur rôle au niveau

d'interfaces tissulaires qui restent encore inexplorées. Les enseignements tirés de l'étude de la P-gp au niveau de la BHE ont permis de progresser rapidement dans la mise au point et la valorisation clinique de ces méthodes et d'envisager l'exploration d'autres transporteurs dont l'importance en pharmacocinétique reste à démontrer. C'est le cas par exemple des transporteurs OATP, exprimés majoritairement au niveau des hépatocytes sur la membrane sinusoidale, mais également au niveau d'autres tissus. Différentes sondes pour l'imagerie des OATP ont été mises au point au niveau préclinique et certaines ont atteint le stade clinique pour l'étude de ces transporteurs *in vivo*.

3.5. Les sondes pour l'imagerie des OATP

3.5.1. Article n°1 : Imaging Probes and Modalities for the Study of Solute Carrier O (SLCO)-Transport Function *In Vivo*

Marie S, Cisternino S, Buvat I, Declèves X, Tournier N.

Journal of Pharmaceutical Sciences. Septembre 2017, 106(9):2335-2344.

(Marie et al., 2017)



Review

Imaging Probes and Modalities for the Study of Solute Carrier O (SLCO)-Transport Function *In Vivo*Solène Marie^{1,2,3}, Salvatore Cisternino^{4,5}, Irène Buvat¹, Xavier Declèves^{4,5}, Nicolas Tournier^{1,*}¹ Imagerie Moléculaire *In Vivo*, IMIV, CEA, INSERM, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris Saclay, CEA-SHFJ, Orsay, France² AP-HP, Hôpital Bicêtre, Pharmacie Clinique, Le Kremlin Bicêtre, France³ Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France⁴ Variabilité de réponse aux psychotropes, INSERM, U1144, Paris, France⁵ Faculté de pharmacie, Université Paris Descartes, UMR-S 1144, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2017

Revised 4 April 2017

Accepted 17 April 2017

Available online 25 April 2017

Keywords:

solute transporters
organic anion-transporting polypeptide transporters
imaging methods
hepatic transport

ABSTRACT

Transporters of the solute carrier O (SLCO) family, former organic anion-transporting polypeptides, are now recognized as key players in pharmacokinetics. Imaging is increasingly regarded as a relevant method to elucidate and decipher the intrinsic role of SLCO in controlling drug disposition in plasma and tissues. Current research in this representative field of translational research is based on different imaging modalities including nuclear imaging, such as single-photon emission computed tomography or positron emission tomography, and magnetic resonance imaging. Imaging modalities can be compared in terms of sensitivity, quantitative properties, spatial resolution, variety of ligands, and radiation exposure. All these approaches rely on the use of SLCO substrates that are detected using corresponding modalities. The present review aims at reporting and comparing the imaging probes that have been proposed to study SLCO-transport function, in terms of *in vitro* specificity, *in vivo* behavior, and clinical validation.

© 2017 American Pharmacists Association[®]. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Membrane transporters are now recognized as key players in pharmacokinetics (PK). Each transporter has a specific pattern of substrates and tissue expression. Transporters of the ATP-binding cassette (ABC) and solute carrier (SLC) superfamilies expressed in the intestine, liver, and kidneys have been shown to control the absorption, distribution, and elimination of many drugs and measurably affect PK. Transporter function is also assumed to account for intra- and interindividual variability in drug PK.¹ Many clinically relevant drug–drug interactions involving transporter inhibitors, inducers, and substrates have been described.² In 2007, the International Transporter Consortium, which includes members from academia, industry, and the U.S. Food and Drug Administration, was formed with the goal of determining transporters that are of emerging importance, establishing recommendations, regulatory draft guidance documents on transporter–drug interactions, and highlighting transporter-related challenges in drug development.^{1,3}

In this framework, imaging is increasingly regarded as a safe and relevant method to elucidate and decipher the intrinsic role of membrane transporters in controlling drug disposition.⁴

Transporters expressed in blood–tissue barriers have been shown to control the tissue exposure to many compounds.² These transporters may control the drug tissue distribution with limited impact on the plasma PK. In this framework, several imaging methods have been proposed to noninvasively unveil and quantify the impact of transporter function on drug exposure to non-clearance organs, such as the blood–brain barrier,^{5–7} the blood–retina barriers,⁸ or the blood–tumor barrier⁹ in animals and humans.

The Solute Carrier O Transporter Family

Among SLC transporters, the solute carrier O (SLCO) transporter family has been detected at many blood–tissue interfaces.¹⁰ SLCO were initially identified at the basolateral membrane of hepatocytes where they mediate the transport of bile salt and cholephilic anionic compounds¹⁰ (Fig. 1).

Today, 11 members of the SLCO family have been identified in human.¹¹ This superfamily was originally named organic

* Correspondence to: Nicolas Tournier (Telephone: +33-1-69-86-77-12; Fax: +33-1-69-86-77-68).

E-mail address: nicolas.tournier@cea.fr (N. Tournier).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.031>

0022-3549/© 2017 American Pharmacists Association[®]. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

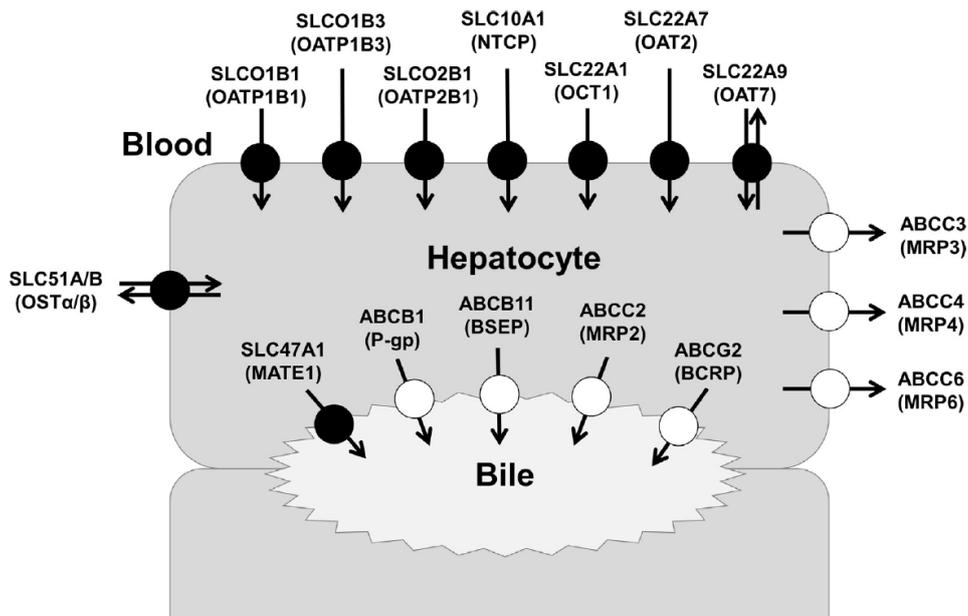


Figure 1. Membrane transporters of importance for pharmacokinetics in hepatocytes. Transporters of the SLC superfamily are shown as black circles. Transporters of the ABC superfamily are shown as open circles. Transporters are named according to the Human Genome Organization nomenclature. Their most common aliases are mentioned between parentheses. Adapted from Zamek-Gliszczyński et al.³

anion-transporting polypeptides (OATP) or SLC21A. The nomenclature of its members was then updated and standardized and the superfamily was renamed to SLCO, the SLC family of the OATP. Based on their amino acid sequence identities, the different SLCOs cluster into families, in general with >40% amino acid sequence identity¹⁰ (Table 1). The different proteins are named SLCO (Slco for the rodent proteins) followed by the family number (SLCO1, SLCO2, SLCO3, SLCO4, SLCO5, and SLCO6), the subfamily letter (e.g., SLCO1A, SLCO1B), and then a consecutive number to identify the individual members within the family (e.g., Slco1a1, SLCO1A2, and Slco1a3). The corresponding gene symbols are SLCO followed by the same number–letter–number combination in italic type (e.g., *Slco1a1*, *SLCO1A2*, and *Slco1a3*).¹²

Direct comparisons between human (SLCO) and rodent (Slco) studies are difficult, due to numerous gene duplication and divergence that occurred in this family, especially in rodents. Moreover, several aliases and former names of the different SLCO members co-exist in the literature (e.g., OATP-B, OATP8), which complicates the understanding and comparison of previously reported data (Table 1).

SLCO1B1 and SLCO1B3 have a single rodent ortholog, Slco1b2. Human SLCO1A2 has 5 rodent orthologs: Slco1a1, Slco1a3 (in rats only), Slco1a4, Slco1a5, and Slco1a6. The other human SLCOs and their respective rodent orthologs are SLCO1C1 (Slco1c1), SLCO2A1 (Slco2a1), SLCO2B1 (Slco2b1), SLCO3A1 (Slco3a1), SLCO4A1 (Slco4a1), SLCO4C1 (Slco4c1), SLCO5A1, and SLCO6A1 (Slco6a1, Slco6c1, and Slco6d1)¹² (Table 1).

The expression of SLCO transporters has been mainly detected in epithelial and endothelial cell membranes of many organs^{11,13}; some SLCO isoforms have a restricted expression and are considered as organ specific, like SLCO1B1 and SLCO1B3, that are assumed to be liver specific^{12,13} (Fig. 1). Due to their broad specificity and the number of known drug–drug interactions, liver uptake transporters SLCO1B1 and SLCO1B3 have been deemed clinically relevant by most regulatory agencies.¹ It is now mandatory to investigate SLCO1B1 and SLCO1B3 substrate or inhibitor potential of any new chemical

entity during the drug development. This systematic screening, in addition to academic research, highlighted the high prevalence of SLCO1B1/1B3 substrates from various chemical and pharmacologic families.^{12,14} This suggests that the relative importance of carrier-mediated uptake by the liver, as a prerequisite for the hepatic clearance of many drugs, may have been underestimated.¹¹

SLCO2B1 is localized at both the sinusoidal membrane of hepatocytes (Fig. 1) and apical membrane of enterocytes and mediates the absorption and the liver uptake of its substrates.^{15,16} In addition to the intestine and liver, SLCO2B1 expression was also detected in human small arteries and vein of the heart, blood–brain barrier, epithelial lung cells, ovary, myoepithelium of mammary duct, prostate, kidney, platelets, skeletal muscle, and placenta.¹⁰ Other SLCO transporters are largely expressed, such as SLCO1A2, SLCO2A1, SLCO3A1, and SLCO4A1, which have been detected in a broad number of tissues.^{12,13} SLCO1A2 might play a role in intestinal absorption. SLCO1A2 expression was also detected at the blood–brain barrier, kidney, intestine, cholangiocytes, and eye ciliary body.¹⁰

This ubiquitous distribution at many blood–tissue interfaces, not only of absorption or clearance organs, suggests a functional role for these extrahepatic SLCO transporters in controlling the access of drugs to target and/or vulnerable tissues, with consequences on drug efficacy or safety.² SLCO function may, thus, be hypothesized to account for pharmacodynamics by influencing cellular drug accumulation in relevant target tissues.

Imaging SLCO Transporter Function

Noninvasive approaches are, therefore, required to elucidate or predict the impact of SLCO-mediated transport in clearance organs on drug disposition in plasma. Moreover, imaging methods would be useful to unveil and quantify the role of nonhepatic SLCO transporter function on drug distribution in organs, as a prerequisite to the local pharmacologic/toxicologic effect. In the absence of measurable concentration in tissues, conventional PK approaches do not allow

Table 1
Human and Rodent Transporters of the SLCO Family

Human			Rodent		
Genes	Proteins	Aliases	Genes	Proteins	Aliases
<i>SLCO1A2</i>	SLCO1A2	SLC21A3, OATP-A	<i>Slco1a1</i> <i>Slco1a3</i>	Slco1a1 Slco1a3 (rat only)	Slc21a1, Slc21a3, Oatp1 Slco21a4, OAT-K1, OAT-K2, OAT-K3, OAT-K5, OAT-K6, OAT-K7; OAT-K8, OAT-K9, OAT-K11, OAT-K13, OAT-K14
<i>SLCO1B1</i> <i>SLCO1B3</i>	SLCO1B1 SLCO1B3	SLC21A6, HBLR, LST-1, OATP2, OATP-C SLC21A8, LST-2, LST-3, HBLRR, OATP8, LST-3TM13	<i>Slco1a4</i> <i>Slco1a5</i> <i>Slco1a6</i> <i>Slco1b2</i>	Slco1a4 Slco1a5 Slco1a6 Slco1b2	Slc21a5, Oatp2 Slc21a7, Oatp3 Slc21a13, Oatp5 Slc21a6, Slc21a10, Oatp4, lst-1
<i>SLCO1C1</i>	SLCO1C1	SLC21A14, OATP1, OATP-F, OATP14, OATP-RP5	<i>Slco1c1</i>	Slco1c1	Slc21a14, Oatp14, Oatpf, Bsat1
<i>SLCO2A1</i>	SLCO2A1	SLC21A2, PGT, MATR1, PHOAR2	<i>Slco2a1</i>	Slco2a1	Slc21a2, Pgt, Matr1
<i>SLCO2B1</i>	SLCO2B1	SLC21A9, OATP-B	<i>Slco2b1</i>	Slco2b1	Slc21a9, moat1
<i>SLCO3A1</i>	SLCO3A1	SLC21A11, OATP-D, OATP-RP3	<i>Slco3a1</i>	Slco3a1	Slc21a11, Anr1, MJAM
<i>SLCO4A1</i>	SLCO4A1	SLC21A12, OATP1, OATP-E, OATP-RP1, POAT	<i>Slco4a1</i>	Slco4a1	Slc21a12
<i>SLCO4C1</i>	SLCO4C1	SLC21A20, OATP-H, OATPX, OATP-M1, PRO2176	<i>Slco4c1</i>	Slco4c1	Slc21a20, Oatp-H, Oatp-M1, Oatp-R, PRO2176
<i>SLCO5A1</i>	SLCO5A1	SLCO21A15, OATP-J, OATP-RP4	<i>Slco5a1</i>	Slco5a1 (mouse only)	
<i>SLCO6A1</i>	SLCO6A1	OATP-I, OATPY, GST, CT48	<i>Slco6b1</i> <i>Slco6c1</i> <i>Slco6d1</i>	Slco6b1 Slco6c1 Slco6d1	Tst1, GST-1 GST-2 4921511105Rik

The different SLCO transporters cluster into families (SLCO1-6) and subfamilies based on their amino acid sequence identities. Human genes and their corresponding protein and known aliases are reported in the left column. Corresponding rodent orthologs (gene, protein, aliases) are reported in the right column¹⁰ (Source: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

for investigating the role of SLCO transporters at the blood–tissue interface. Data are limited to those obtained in invasive and terminal studies in animals or cellular models. However, extrapolation of results obtained from rodents to humans is difficult due to the lack of direct orthology between rodent and human SLCO isoforms^{12,17} (Table 1), together with species differences regarding substrate specificity and tissue expression.¹⁸

The development of imaging probes and methodologies dedicated to the study of SLCO-transport function *in vivo* represents a major challenge to decipher the role of this specific transporter family and address its impact for pharmacotherapy. Current research in this representative field of translational research is based on different imaging modalities (Fig. 2). This includes nuclear imaging, such as single-photon emission computed tomography (SPECT) or positron emission tomography (PET),¹⁹ and magnetic resonance imaging (MRI). All these approaches rely on the use of SLCO substrates that are detected using corresponding modalities. Imaging modalities can be compared in terms of sensitivity, quantitative properties, spatial resolution, variety of ligands, and radiation exposure (Fig. 2).

Sugiyama et al. have performed pioneer work on the use of PET imaging for the study of SLCO-transport function *in vivo*. They have paved the way for an extensive and inspiring translational research that contributed to highlight the importance of SLCO function for modern PK.^{20,21} The present review aims at reporting the current knowledge regarding imaging probes and modalities that have been proposed to study SLCO-transport function *in vivo*. The approaches are compared in terms of *in vitro* specificity, *in vivo* behavior, and clinical validation.

Imaging Probes for SPECT

SPECT uses gamma rays detected by gamma cameras that have been readily available in most nuclear medicine departments for decades. The radionuclide gamma emitter most frequently used is

metastable technetium-99 (^{99m}Tc) because of its medium energy (140 keV), relatively short half-life ($T_{1/2} = 6.0$ h), and availability through the molybdenum–technetium generator. ^{99m}Tc is a radionuclide that requires forming an organic coordination complex, limiting the possibility to radiolabel substrates without dramatic changes in their chemical and physicochemical properties.²² However, ^{99m}Tc allows for easy and kit-based preparation of radiopharmaceutical agents for human use and often provides suitable metabolic stability *in vivo*. Several other radionuclides are eligible to SPECT, including iodine-123 or indium-111.

SPECT has traditionally been deemed a nonquantitative imaging method. However, recent advances in medical physics have now made SPECT a quantitative method thanks to coupling with a computed tomography (CT) scan in hybrid SPECT/CT scanners, advances in algorithms for image reconstruction, and sophisticated compensation techniques to correct for photon attenuation and scattering.²³ Quantification with SPECT, however, remains of slightly lower performance than with PET, especially in small volume regions, due to marginally poorer image spatial resolution (typically ~7–10 mm for SPECT against ~5–8 mm for PET, depending on the image reconstruction parameters).²³ SPECT benefits from a good sensitivity, allowing for the use of tracer dose compounds, with a limited risk of toxicity (Fig. 2).

^{99m}Tc-mebrofenin

SLCO function has been studied in SPECT imaging using ^{99m}Tc-mebrofenin, an imino diacetic acid (HIDA) derivative (Fig. 3) commonly used in nuclear medicine for hepatobiliary scintigraphy. *In vitro* studies with *Xenopus laevis* oocytes^{24,25} and Chinese hamster ovary cells^{25,26} have shown that ^{99m}Tc-mebrofenin is transported by human SLCO1B1 and SLCO1B3 but not SLCO2B1.²⁵ ^{99m}Tc-mebrofenin is not either a substrate of the Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP, SLC10A1) expressed at the hepatocyte level²⁵ (Fig. 1). The critical role played by these transporters in the liver

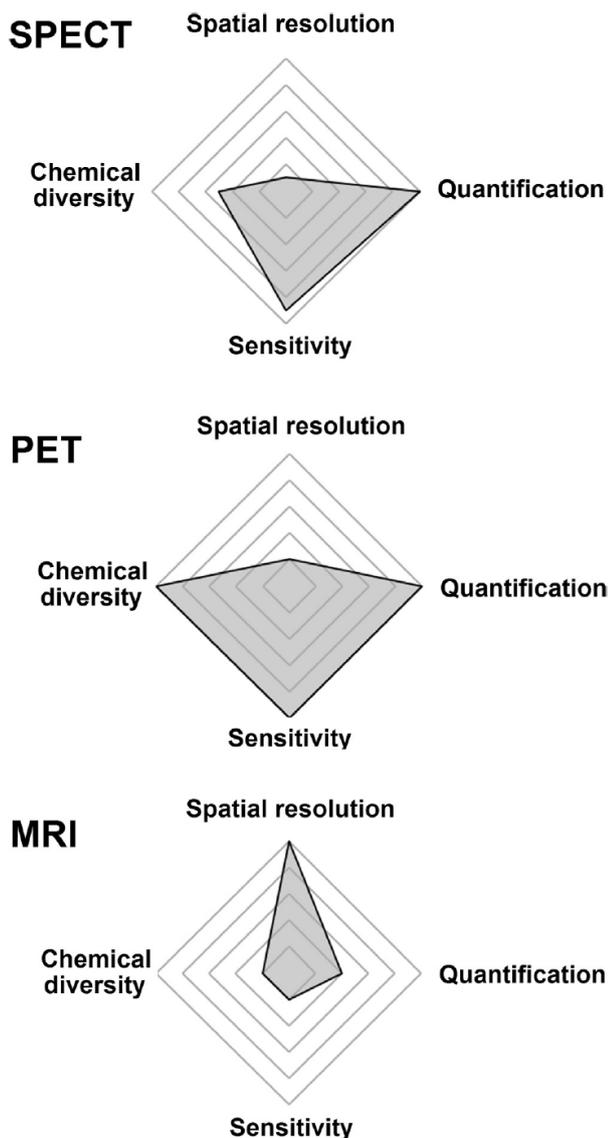


Figure 2. Comparative performances of imaging modalities proposed to study SLCO function *in vivo*.

kinetics of ^{99m}Tc -mebrofenin has been highlighted *in vivo* using Slco1a1/1b (*Slco1a^{-/-}/1b^{-/-}*) mice or using rifampicin, a potent SLCO inhibitor.²⁶ Regarding efflux transporters of the ABC superfamily, ^{99m}Tc -mebrofenin is transported by ABCC2 (multidrug resistance protein 2 [MRP2])^{24,27,28} and ABCC3 (MRP3).²⁴ Studies in *Abcc2*-deficient mice have unveiled the contribution of *Abcc2* to the biliary secretion of ^{99m}Tc -mebrofenin.²⁶ In mice, rifampicin was shown to affect both the Slco-mediated liver uptake and the *Abcc2*-mediated biliary efflux of ^{99m}Tc -mebrofenin²⁶ (Fig. 1 and Table 2).

A PK study was conducted in healthy volunteers, consisting in a model developed on blood, urine, and bile concentration–time profiles.²⁴ It unveiled the predominant biliary route of excretion, compared with the urinary route,²⁴ which represents 1% of total clearance under normal conditions. ^{99m}Tc -mebrofenin has been used for decades as an approved radiopharmaceutical agent to assess altered hepatobiliary function in patients.²⁴ However, to the best of our knowledge, the respective impact of the different SLCO

isoforms on ^{99m}Tc -mebrofenin liver kinetics in humans has not been reported.

^{99m}Tc -N-pyridoxyl-5-methyltryptophan

^{99m}Tc -N-pyridoxyl-5-methyltryptophan (^{99m}Tc -PMT) is a radiotracer among the ^{99m}Tc -pyridoxylamine family (Fig. 3). ^{99m}Tc -PMT has been approved in Japan to perform hepatobiliary scintigraphy to diagnose diseases of the hepatobiliary function and system.²⁹⁻³¹ A recent *in vitro* study aimed at elucidating the transport mechanisms involved in the hepatic uptake of ^{99m}Tc -PMT. The authors showed that ^{99m}Tc -PMT is transported by SLCO1B1 and SLCO1B3 *in vitro*.³² There was no difference in the uptake of ^{99m}Tc -PMT in SLCO2B1, SLC22A1 (organic cation transporter 1 [OCT1]), and SLC22A7 (organic anion transporter 2 [OAT2])-expressing cells compared with control cells.³² The *in vivo* importance and specificity of the SLCO transport of ^{99m}Tc -PMT have not been explored yet. ^{99m}Tc -PMT may nonetheless represent an alternative to ^{99m}Tc -mebrofenin.

^{111}In -EOB-DTPA

^{111}In -EOB-DTPA (indium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine-pentaacetic acid) is an experimental SPECT tracer derived from the MRI contrast agent Gd-EOB-DTPA (gadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine-pentaacetic acid; Fig. 3). ^{111}In -EOB-DTPA has been used in mice to validate an original gene reporter system based on the expression of *Slco1a1* by a transfected xenograft.³³ A signal enhancement was observed using both ^{111}In -EOB-DTPA and Gd-EOB-DTPA (MRI probe, see subsequent paragraphs) in *Slco1a1*-expressing xenograft compared with control xenograft, which did not express this transporter.³³

Imaging Probes for MRI

MRI is a nonirradiant imaging technique performed in radiology, using pulses of radio waves that excite the nuclear spin energy transition, and magnetic field gradients localize the signal in space. The result is pictures of anatomy and physiological process with high spatial resolution and excellent soft tissue contrast but with limited sensitivity and quantification challenges (Fig. 2). Compared with nuclear imaging, which can be performed using tracer dose of radioligands, the contrast agents used for MRI must be used at pharmacologic doses. The variety of available compounds is also limited and predominantly relies on the use of metals (e.g., gadolinium), associated with a complex chemistry (Figs. 2 and 3).

Gd-EOB-DTPA

Gd-EOB-DTPA (Fig. 3), also called gadoxetate, is a hepatobiliary MRI contrast agent based on the extracellular fluid marker gadopentetate (gadolinium-diethylenetriamine-pentaacetic acid). The introduction of the lipophilic ethoxybenzyl moiety to gadopentetate resulted in liver-specific contrast enhancement due to specific uptake into hepatocytes and biliary excretion of Gd-EOB-DTPA.³⁴ The substance benefits from a suitable complex stability *in vivo*, without any apparent biotransformation.³⁴

An *in vitro* study performed with transporter expressing *Xenopus laevis* oocytes demonstrated that Gd-EOB-DTPA is taken up by rodent *Slco1a1* but not *Slco1a2*.³⁴ The Slco-mediated uptake was inhibited by bromosulfophthalein, rifamycin, and rifampicin and was shown saturable using a high concentration of Gd-EOB-DTPA.³⁴ The uptake of Gd-EOB-DTPA, as well as ^{111}In -EOB-DTPA, was shown to correlate with *Slco1a1* expression in cells.³³ An *in vitro* study using human embryonic kidneys 293 (HEK293) cells transfected with the

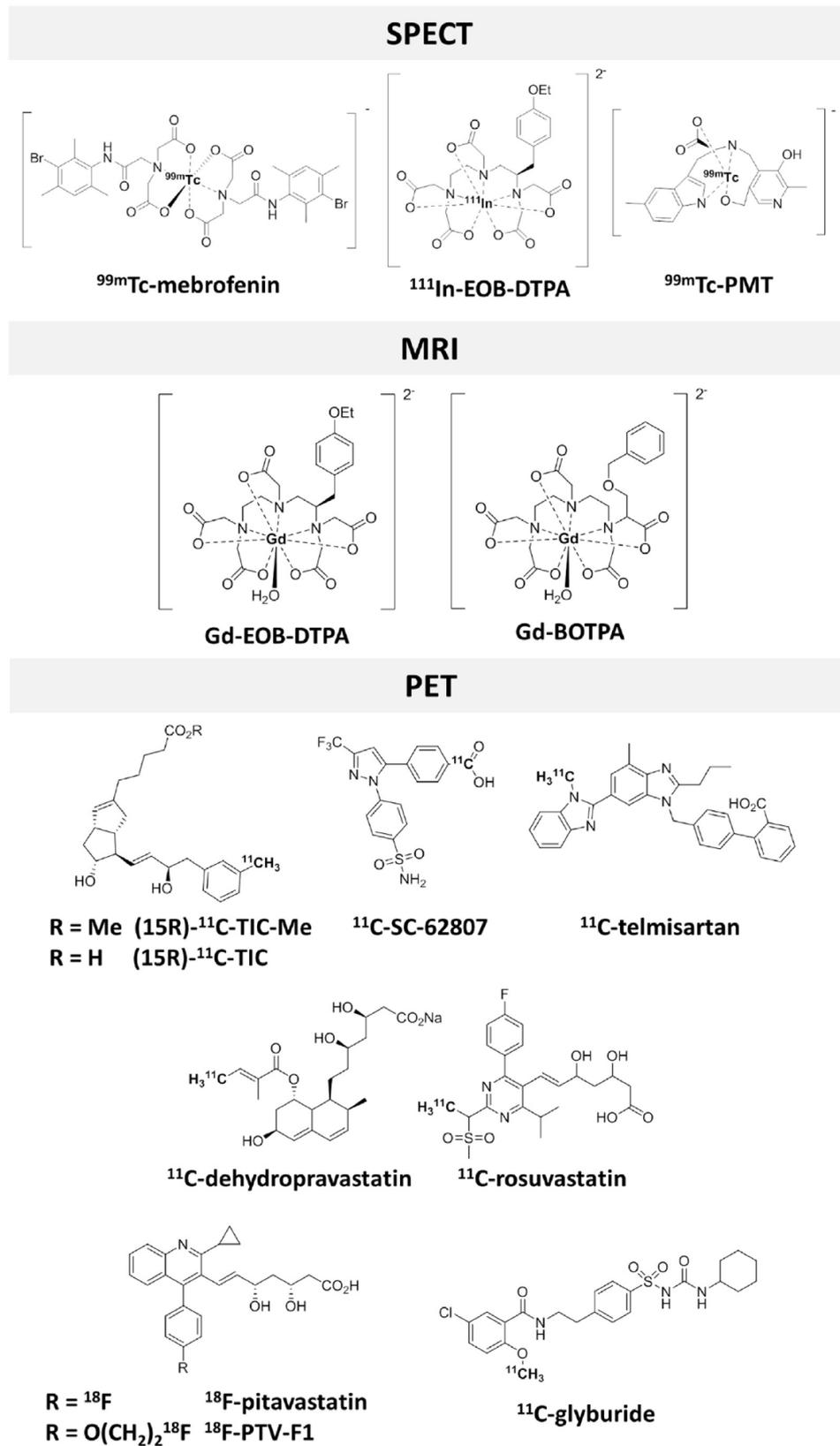
Figure 3. Chemical structures of probes used to study SLCO function *in vivo*.

Table 2
Current Imaging Probes to Study SLCO Function

Imaging Probes	SLCO-Mediated Transport <i>In Vitro</i>	SLCO-Mediated Transport in Animals	Clinical Translation
^{99m} Tc-mebrofenin	SLCO1B1, SLCO1B3 ^{24,26}	Studied in mice KO and after inhibition by rifampicin ²⁶	
^{99m} Tc-PMT	SLCO1B1, SLCO1B3 ³²		
¹¹¹ In-EOB-DTPA		Studied in mice transfected with a Slco1a1 xenograft ³³	
BOPTA	Slco1a1, Slco1a2, Slco1b2 ⁴⁰		
Gd-EOB-DTPA	Slco1a1, ³⁴ SLCO1A2, SLCO1B1, SLCO1B3 ^{35,36}	Studied in mice transfected with a Slco1a1 xenograft ³³ and in liver congestive rats with decreased Slco1a1 expression ^{37,38}	Correlation with SLCO1B1 and SLCO1B3 expression in hepatocellular carcinoma nodules ³⁹
¹¹ C-dehydropravastatin	Rifampicin inhibitable transport in isolated rat hepatocytes ⁵⁴	Studied in rats after inhibition by rifampicin ⁵⁵	
¹¹ C-glyburide	SLCO1A2, SLCO1B1, SLCO2B1 ^{64,65}	Studied in baboons after inhibition by rifampicin and cyclosporin ⁷¹	
¹⁸ F-pitavastatin	SLCO1B1, SLCO1B3, SLCO1A2, Slco1a1, Slco1b2 ⁶¹		
¹⁸ F-PTV-F1	SLCO1B1, SLCO1B3 ⁶³		
¹¹ C-rosuvastatin	SLCO1B1, SLCO1B3, SLCO2B1, SLCO1A2 ⁵⁶⁻⁵⁸	Studied in rats after inhibition by rifampicin ⁵⁹	
¹¹ C-SC-62807	SLCO1B1, SLCO1B3 ⁴⁷		
¹¹ C-telmisartan	SLCO1B3 ⁵¹	Studied in rats after inhibition by rifampicin ⁴⁹	Baseline biodistribution and radiation dosimetry ⁵⁰
(15R)- ¹¹ C-TIC-Me	SLCO1B1, SLCO1B3 ²¹		Inhibition study using rifampicin ²¹

human SLCO transporter genes showed that Gd-EOB-DTPA is a substrate and inhibitor of SLCO1B1 and SLCO1B3 but not SLCO2B1³⁵ (Table 2). Gd-EOB-DTPA is a substrate of SLCO1A1 (NTCP) which may also contribute to its liver uptake³⁵ (Fig. 1). Gd-EOB-DTPA was shown to be substrate of ABCG2,³⁶ which impacts on biliary secretion has been confirmed *in vivo* in Mrp2-deficient rats.³⁶ Gd-EOB-DTPA is also an *in vitro* substrate of SLCO1A2 (Table 2) and ABCG3 (MRP3) but not the apical sodium-dependent bile acid transporter (ABST, SLCO1A2) and organic cation transporter 3 (SLC22A3).³⁶

A decrease in Slco1a1 protein expression in congestive rat livers was shown to be correlated with a reduced signal intensity of Gd-EOB-DTPA observed in a rat model of liver congestion.³⁷ Lagadec et al.³⁸ recently reported a correlation between the hepatic extraction fraction of Gd-EOB-DTPA and the expression of Slco1a1 in a rat model of advanced liver fibrosis.

In humans, *in vitro* to *in vivo* correlation has been verified by a retrospective study in patients with hepatocellular carcinoma. Gd-EOB-DTPA MR data were compared with SLCO expression in resected hypervascular hepatocellular carcinoma. A correlation has been found between positive expression of SLCO1B1 and SLCO1B3 in pathologic liver cells and a significantly higher signal enhancement due to Gd-EOB-DTPA administration.³⁹

BOPTA

BOPTA (gadolinium benzyl-oxypropionictetraacetate; Fig. 3) is another MRI contrast agent labeled with gadolinium. *In situ* perfusion of rat livers has shown that BOPTA uptake was completely inhibited by bromosulfophthalein, thus suggesting that the sinusoidal uptake of BOPTA may involve Slco-mediated transport.⁴⁰ The identification of isoforms responsible for BOPTA hepatic uptake was performed *in vitro* in *Xenopus laevis* oocytes: BOPTA was predominantly transported by rodent Slco1a1, Slco1a2, and Slco1b2.⁴⁰ Abcc2 was shown to mediate the bile excretion of BOPTA in rats, thus highlighting that the function of both sinusoidal and canalicular transporters is important to determine the liver kinetics of BOPTA⁴⁰ (Table 2).

Imaging Probes for PET

PET is another nuclear imaging modality using β^+ -emitting isotopes. Thanks to a high sensitivity of PET scanners, radiopharmaceutical agents used for PET imaging can be administered at tracer dose. The advantages of PET over SPECT include higher sensitivity (detection efficiency), better temporal and spatial resolutions, at least in humans and large animals. PET imaging benefits from straightforward 3D quantifiable recordings (Fig. 2). The β^+ emitter most routinely used in clinic is fluorine-18 (¹⁸F, $T_{1/2}$ = 109.8 min), whereas carbon-11 (¹¹C, $T_{1/2}$ = 20.3 min) is frequently used in research. Because of their short half-lives, radiotracers involving such β^+ emitters must be synthesized, controlled, and administered quickly after the production of the radionuclide, mainly obtained from a cyclotron. Compared with isotopes used for SPECT and MR imaging contrast agents, β^+ -emitting radionuclides offer the possibility to radiolabel a wider range of molecules.¹⁹ PET imaging using radiolabeled analogs of drugs is increasingly used to elucidate the importance of transporters for tissue distribution.^{19,41} PET imaging cannot distinguish the tissue radioactivity associated with the parent radiotracer or its radiometabolites that carry the radiolabeled isotopes. The presence of radiometabolites has, thus, to be taken into account for accurate estimation of transporter function *in vivo*.⁴²

(15R)-¹¹C-TIC-Me

(15R)-¹¹C-TIC-Me ((15R)-16-*m*-tolyl-17,18,19,20-tetranorisarcabacyclin methyl ester; Fig. 3) was originally developed for PET of prostacyclin receptors in the central nervous system. (15R)-¹¹C-TIC-Me is a pro-drug and is rapidly hydrolyzed *in vivo* in its acid-active form, the (15R)-¹¹C-TIC, subjected to hepatic clearance.^{20,21} An *in vitro* study evidenced a significant and saturable increase in the accumulation of (15R)-¹¹C-TIC in SLCO1B1 and SLCO1B3-expressing cells compared with HEK293 control and SLCO2B1-expressing cells.²¹ Both transporters were involved in hepatic uptake of (15R)-¹¹C-TIC with a larger contribution of SLCO1B1 compared with

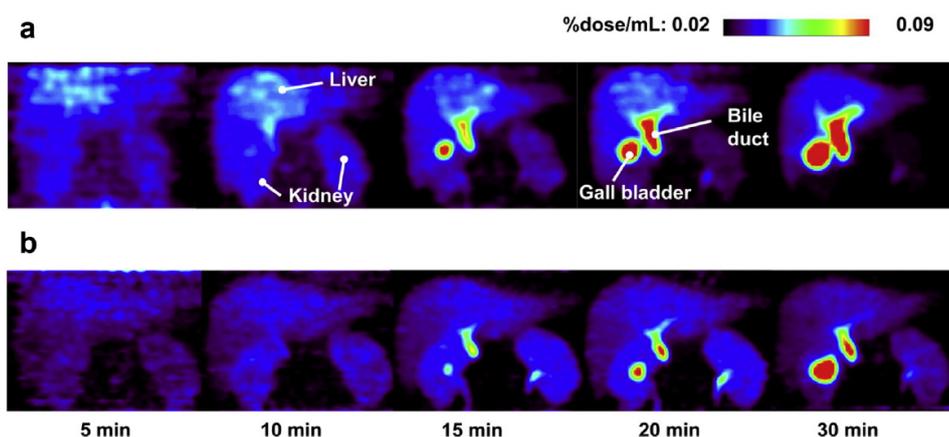


Figure 4. Color-coded PET images of abdominal region of healthy male subject after administration of (15R)- ^{11}C -TIC-Me with and without rifampicin. Coronal maximum-intensity projection PET images of radioactivity in abdominal region were captured at 5, 10, 15, 20, and 30 min after administration of (15R)- ^{11}C -TIC-Me in absence (a) or presence (b) of 600 mg of rifampicin. This research was originally published in *JNM* (Takashima et al.²¹ *J Nucl Med* 2012; 53:741-748. Copyright by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.).

SLCO1B3 (69.3% vs. 30.7%).⁴³ In rats, (15R)- ^{11}C -TIC is primarily excreted by the liver and, to a lesser extent, by the kidneys.²⁰ This hepatic transport was investigated in humans by Takashima et al.²¹ using (15R)- ^{11}C -TIC-Me PET imaging. Healthy volunteers underwent dynamic (15R)- ^{11}C -TIC-Me PET scanning before and 1 h after oral administration of rifampicin (600 mg). Liver uptake and clearance of radioactivity were decreased in subjects pretreated with rifampicin, suggesting that (15R)- ^{11}C -TIC is substrate of both the uptake (SLCO) and biliary efflux (ABCC2) transporters *in vivo* (Fig. 4). This study provided a convincing proof on the dramatic role of SLCO function in controlling the liver uptake of its substrates in humans (Table 2). However, several radiometabolites have been detected in human plasma, cultured hepatocytes as well as in blood, bile, and liver of rats.^{20,21} Alternative radioligands with improved metabolic stability are, therefore, required for accurate quantification of SLCO function *in vivo*.

^{11}C -SC-62807

SC-62807 is the main metabolite of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor. The liver metabolism of celecoxib involves 2 sequential oxidative pathways, initially to a hydroxymethyl metabolite (SC-60613), and on subsequent further oxidation to a carboxylic acid metabolite (SC-62807). The majority of celecoxib is excreted into the bile as SC-62807.⁴⁴⁻⁴⁶ Therefore, ^{11}C -celecoxib is not suitable for PET imaging because of its extensive metabolism. Intravenously administered ^{11}C -SC-62807 (Fig. 3) is rapidly eliminated in mice and rats via hepatobiliary and renal excretion without further metabolism.^{44,47} This metabolic stability makes the ^{11}C -SC-62807 an attractive PET tracer. The uptake of ^{11}C -SC-62807 was shown to be increased in HEK293 cells expressing SLCO1B1 and SLCO1B3 compared with parent cells.⁴⁷ ^{11}C -SC-62807 is known to be a substrate of the efflux transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein [BCRP]), expressed at the liver–bile interface in human^{44,47} (Fig. 1).

^{11}C -Telmisartan

Telmisartan is a non-peptide–selective angiotensin II type 1 receptor antagonist, broadly used as an antihypertensive drug.⁴⁸ Telmisartan is converted in the liver into its pharmacologically inactive acylglucuronide (telmisartan-*O*-acyl-glucuronide) by UDP-glucuronyl transferase, which is rapidly excreted in the intestine through the hepatobiliary system.^{49,50} *In vitro* studies have shown

that telmisartan and telmisartan-*O*-acyl-glucuronide are predominantly transported by the human SLCO1B3, rather than SLCO1B1.^{51,52} Telmisartan-*O*-acyl-glucuronide is a substrate of ABCB1 (P-glycoprotein [P-gp]), ABCG2 (BCRP), and ABCC2 (MRP2) expressed at the liver bile–interface⁵¹⁻⁵³ (Fig. 1).

In rats, the co-administration of rifampicin decreased the amount of radioactivity in the liver and intestine, thus confirming the importance of Slco for ^{11}C -telmisartan (Fig. 3) liver uptake.⁴⁹ ^{11}C -telmisartan has already been administered in humans for a biodistribution and radiation dosimetry study⁵⁰ (Table 2). To our knowledge, no clinical SLCO inhibition studies has been reported for this radiotracer yet.

^{11}C -dehydropravastatin

Statins are currently used to treat cholesterol and dyslipidemia. Their excretion via hepatobiliary route and known transport by different SLCO isoforms make statins interesting radiotracer candidates for the study of SLCO-transport function *in vivo*.

The first radiolabeled statin used for PET was a pravastatin derivative, the ^{11}C -dehydropravastatin⁵⁴ (Fig. 3). *In vitro*, dehydropravastatin was shown to accumulate in freshly isolated rat hepatocytes and rifampicin, a potent Slco inhibitor, dose dependently inhibited this uptake.⁵⁴ This result was confirmed *in vivo* in rats using ^{11}C -dehydropravastatin PET imaging, showing that both the accumulation of radioactivity in the liver and its excretion into the bile were decreased after injection of rifampicin.⁵⁵ This study also confirmed that Abcc2 controls the biliary efflux of ^{11}C -dehydropravastatin.⁵⁵ At least one identifiable metabolite and other metabolites of ^{11}C -dehydropravastatin were observed in plasma. Several radiometabolites could be detected in the liver and the bile, so that accurate quantification of transporter function remained difficult.⁵⁵

^{11}C -Rosuvastatin

Rosuvastatin is a hydrophilic statin that provides the advantage over the previous statin to be a market approved drug, thus facilitating its acceptance as a PET probe in humans. The hepatic transport of rosuvastatin has been widely studied and it was shown to be a substrate *in vitro* of SLCO1B1 and SLCO1B3, with a predominant contribution of SLCO1B1.^{56,57} Among SLCO transporters, rosuvastatin is also transported by SLCO2B1 and SLCO1A2.⁵⁶⁻⁵⁸

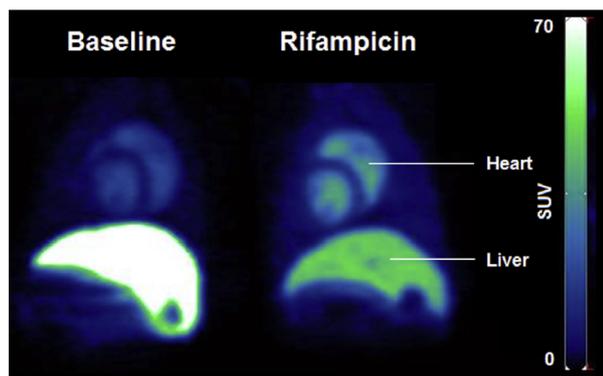


Figure 5. ^{11}C -glyburide PET images obtained in the liver of baboons in baseline conditions and after SLCO inhibition. These are summed (0–10 min) PET images normalized by injected dose and animal weight (SUV) in the absence (baseline) and the presence of SLCO inhibition (rifampicin). Corresponding experimental settings were originally reported by Tournier et al.⁷¹ SUV, standardized uptake value.

Rosuvastatin is also a substrate of SLC10A1 (NTCP), ABCG2 (MRP2), and ABCG2 (BCRP).^{56–58} ^{11}C -rosuvastatin (Fig. 3) has been studied in control rats versus Slco-inhibited rats using rifampicin. The hepatic distribution was significantly reduced in rats pretreated with rifampicin.⁵⁹ A decrease in the distribution of ^{11}C -rosuvastatin in the kidneys was also reported, suggesting a role for extrahepatic Slco function.⁵⁹ ^{11}C -rosuvastatin was shown to be metabolized in rat over the 90-min scanning and rifampicin inhibited the formation of metabolites.⁵⁹

^{18}F -Pitavastatin

^{18}F -pitavastatin (Fig. 3) is selectively taken up into the liver mainly via SLCO1B1.⁶⁰ For now, it is the only fluorine-containing pharmaceutical agent for imaging SLCO. Pitavastatin is a substrate of multiple hepatocyte transporters including the human SLCO1B1, SLCO1B3, SLCO1A2, SLC22A8 (OAT3), SLC10A1 (NTCP), and the rodent Slco1a1 and Slco1b2.⁶¹ Because of radiosynthesis issues, a new derivative, ^{18}F -PTV-F1, was recently developed, in which a ^{18}F -fluoroethoxy group is substituted for the ^{18}F -fluoro group of ^{18}F -pitavastatin.^{62,63} This new derivative was shown to be transported *in vitro* by both SLCO1B1 and SLCO1B3 as a substrate, and its relative transport activities by the transporters were almost similar to those of pitavastatin.⁶³ No troublesome metabolites could be detected for neither pitavastatin nor with PTV-F1 after 10-min incubation in human liver microsomes.⁶³

^{11}C -Glyburide

Glyburide, also called glibenclamide, a hypoglycemic agent from the sulfonylurea class, is commonly used in the treatment of noninsulin-dependent diabetes. This drug is substrate of many transporters, including SLCO isoforms. *In vitro* studies indicated that glyburide is preferentially transported by SLCO2B1,⁶⁴ SLCO1A2, and to a lesser extent, SLCO1B1.⁶⁵ Glyburide is a substrate for transporters of the ABC superfamily, expressed in hepatocytes, including ABCB1, ABCG2, ABCC1, and ABCC3^{66–71} (Fig. 1). A pre-clinical study in baboons was carried out with ^{11}C -glyburide (Fig. 5), the radiolabeled analogue of glyburide.⁷¹ The primates were pretreated either by rifampicin, the SLCO inhibitor, or by cyclosporin A, a dual P-gp and SLCO inhibitor. An increase of radioactivity was observed in the plasma of treated baboons associated with a decrease of radioactivity in the liver parenchyma. The particularity

of this study in nonhuman primates was the ability to explore other organs, such as the renal cortex, brain, myocardium, pancreas, and lungs. In the kidneys, the tissue/plasma ratio of ^{11}C -glyburide was reduced in the renal cortex of SLCO-inhibited baboons. The impact of renal SLCO function to urinary clearance and exposure to the kidney remains to be assessed. Both rifampicin and cyclosporin A similarly inhibited the uptake of the radiotracer into the myocardium, suggesting that SLCO2B1 would mediate its cardiac uptake because SLCO1B1 and SLCO1A2 are not expressed in this tissue.^{18,72} No relevant influence of SLCO inhibition was found in lungs, pancreas, and brain.⁷¹ Glyburide was slowly metabolized with 70% of parent ^{11}C -glyburide in the plasma after 60-min scanning. Interestingly, no radiometabolites could be detected after cyclosporin A or rifampicin pretreatment.⁷¹ This observation illustrates the interplay between transporter-mediated liver uptake and metabolic enzymes in controlling the liver metabolism of drugs. ^{11}C -glyburide appears to be a promising SLCO PET tracer to study SLCO2B1-mediated transport in extrahepatic organs *in vivo*.

Conclusion and Perspectives

Molecular imaging aims at developing new compounds dedicated to the study of a specific molecular target. Interestingly, current probes for SLCO imaging have often been used for decades to study hepatobiliary function in patients ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -mebrofenin SPECT imaging, Gd-EOB-DTPA MRI). The importance of SLCO-mediated transport on their hepatic uptake was discovered many years after, thus providing a molecular determinant for their predominant liver accumulation.⁷³ The main advantage of the use of radiopharmaceutical and contrast agents for the study of SLCO-transport function is their excellent availability and the possibility to perform clinical studies in most hospital radiology and/or nuclear medicine departments.

Recent PET imaging probes are derived from drugs for which SLCO-mediated transport has been evidenced once the importance of SLCO for PK has been highlighted, several years after their initial acceptance for clinical use on the market. The main advantage of PET over SPECT and MRI is the chemical diversity of the possible compounds to label (Figs. 2 and 3), which compensates for the poor availability of the radiopharmaceutical preparations that is still limited to PET research centers. Medicinal chemistry and the development of radiolabeling methods may contribute to the development of innovative SLCO probes for PET, with improved specificity, metabolic stability, and sensitivity to modulation of SLCO function.

Indeed, the presence of several SLCO isoforms in the liver and other organs suggests a differential impact and regulation of their function *in vivo*. So far, only few SLCO imaging probes have proved to be specific over a single SLCO isoform. It is possible to estimate a global SLCO-transport function, but it remains difficult to characterize the interplay between SLCO isoforms in controlling the tissue uptake of their common substrates.¹¹

Another possibility to gain specificity regarding SLCO isoforms would be the use of isoform-specific SLCO inhibitors. This strategy would be useful to highlight the respective contribution of each transport *in vivo*. Unfortunately, most safe SLCO inhibitors for clinical use (rifampicin, cyclosporin) are broad spectrum SLCO inhibitors. Specificity data can be obtained in mice, using transporter-deficient animals. However, clinical extrapolation has proved to be difficult for the study of SLCO function. So far, specificity of SLCO-imaging probes over different SLCO isoforms is assessed *in vitro* only, using human protein-expressing systems. The development of isoform-specific inhibitors of SLCO function would be an important step forward for the clinical validation of the probes, to assess their *in vivo* specificity.

It is noteworthy that imaging SLCO function offers the possibility to use different imaging modalities, including SPECT, PET, and MRI. Multimodality imaging is increasingly regarded as an innovative approach to make the best of each individual modality. Combination of imaging modalities has been successfully performed to detect Slco1a1 overexpression using ^{111}In -EOB-DTPA and Gd-EOB-DTPA as probes, thus benefiting from the high sensitivity of nuclear imaging and the excellent spatial resolution of MRI.³³ In this framework, the development of multimodal probes, that can be simultaneously detected and/or quantified using hybrid PET/MR systems, may offer new opportunities to study SLCO function *in vivo*. Indeed, such a multimodal imaging system may allow for increased time and spatial resolution with improved detection sensitivity using a single scan and a single tracer administration in animals or humans. This strategy would be useful to make sure the system of interest is probed in the exact same pathophysiological state with the 2 imaging modalities.⁷⁴

Acknowledgments

This work was funded by a grant from ANR-16-CE17-0011-001.

References

- Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(3):215-236.
- König J, Müller F, Fromm M. Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol Rev*. 2013;65(3):944-966.
- Zamek-Gliszczynski MJ, Hoffmaster KA, Tweedie DJ, Giacomini KM, Hillgren KM. Highlights from the International transporter Consortium second workshop. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(5):553-556.
- Kusuhara H. Imaging in the study of membrane transporters. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(1):33-36.
- Muzi M, Mankoff DA, Link JM, et al. Imaging of cyclosporine inhibition of P-glycoprotein activity using ^{11}C -verapamil in the brain: studies of healthy humans. *J Nucl Med*. 2009;50(8):1267-1275.
- Kreisl WC, Liow J-S, Kimura N, et al. P-glycoprotein function at the blood-brain barrier in humans can be quantified with the substrate radiotracer ^{11}C -N-desmethyl-loperamide. *J Nucl Med*. 2010;51(4):559-566.
- Pottier G, Marie S, Goutal S, et al. Imaging the impact of the P-glycoprotein (Abcb1) function on the brain kinetics of metoclopramide. *J Nucl Med*. 2016;57(2):309-314.
- Bauer M, Karch R, Tournier N, et al. Assessment of P-glycoprotein transport activity at the human blood-retinal barrier with (R)- ^{11}C -verapamil PET. *J Nucl Med*. 2017;58(4):678-681.
- Kannan P, John C, Zoghbi SS, et al. Imaging the function of P-glycoprotein with radiotracers: pharmacokinetics and *in vivo* applications. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;86(4):368-377.
- Hagenbuch B, Stieger B. The SLCO (former SCL21) superfamily of transporters. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):396-412.
- Stieger B, Hagenbuch B. Organic anion-transporting polypeptides. *Curr Top Membr*. 2014;73:205-232.
- Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SCL22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol*. 2012;165(5):1260-1287.
- Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012;52:135-151.
- Hagenbuch B, Gui C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica*. 2008;38(7-8):778-801.
- Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*. 2009;158(3):693-705.
- Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos*. 2013;34(1):45-78.
- 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):237-252.
- Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokin*. 2008;23(1):22-44.
- Mann A, Semenenko I, Meir M, Eyal S. Molecular imaging of membrane transporters' activity in cancer: a picture is worth a thousand tubes. *AAPS J*. 2015;17(4):788-801.
- Takashima T, Nagata H, Nakae T, et al. Positron emission tomography studies using (15R)-16-m-[^{11}C]tolyl-17,18,19,20-tetranorisocarbacyclin methyl ester for the evaluation of hepatobiliary transport. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;335(2):314-323.
- Takashima T, Kitamura S, Wada Y, et al. PET imaging-based evaluation of hepatobiliary transport in humans with (15R)-11C-TIC-Me. *J Nucl Med*. 2012;53(5):741-748.
- Tournier N, André P, Blondeel S, et al. Ibogaine labeling with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricarboxyl: synthesis and transport at the mouse blood-brain barrier. *J Pharm Sci*. 2009;98(12):4650-4660.
- Bailey DL, Willowson KP. An evidence-based review of quantitative SPECT imaging and potential clinical applications. *J Nucl Med*. 2013;54(1):83-89.
- Ghibellini G, Leslie E, Pollack G, Brouwer K. Use of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -mefenofin as a clinical probe to assess altered hepatobiliary transport: integration of *in vitro*, pharmacokinetic modeling, and simulation studies. *Pharm Res*. 2008;25(8):1851-1860.
- de Graaf W, Häusler S, Heger M, et al. Transporters involved in the hepatic uptake of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -mefenofin and indocyanine green. *J Hepatol*. 2011;54(4):738-745.
- Neyt S, Huisman M, Vanhove C, et al. *In vivo* visualization and quantification of (disturbed) Oatp-mediated hepatic uptake and Mrp2-mediated biliary excretion of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -mefenofin in mice. *J Nucl Med*. 2013;54(4):624-630.
- Swift B, Yue W, Brouwer KLR. Evaluation of ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)technetium-mefenofin and ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)technetium-sestamibi as specific probes for hepatic transport protein function in rat and human hepatocytes. *Pharm Res*. 2010;27(9):1987-1998.
- Bonnaventure P, Pastor CM. Quantification of drug transport function across the multiple resistance-associated protein 2 (Mrp2) in rat livers. *Int J Mol Sci*. 2014;16(1):135-147.
- Kato-Azuma M. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pyridoxylated: a new series of hepatobiliary imaging agents. *J Nucl Med*. 1982;23(6):517-524.
- Narabayashi I, Hamada T, Aoki O, Suematsu T. Small hepatocellular carcinoma visualized with technetium- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N-pyridoxyl-5-methyltryptophan. *Ann Nucl Med*. 1987;1(1):39-42.
- Narabayashi I, Sugimura K, Ishido N, Kajita A. Quantitative analysis by digital computer of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N-pyridoxyl-5-methyltryptophan ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PMT) hepatogram in diffuse parenchymal liver diseases. *Eur J Nucl Med*. 1987;13(6):285-287.
- Kobayashi M, Nakanishi T, Nishi K, et al. Transport mechanisms of hepatic uptake and bile excretion in clinical hepatobiliary scintigraphy with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N-pyridoxyl-5-methyltryptophan. *Nucl Med Biol*. 2014;41(4):338-342.
- Stephen Patrick P, Hammersley J, Loizou M, et al. Dual-modality gene reporter for *in vivo* imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(1):415-420.
- van Montfoort J, Stieger B, Meijer D, Weinmann H, Meier P, Fattinger K. Hepatic uptake of the magnetic resonance imaging contrast agent gadoxetate by the organic anion transporting polypeptide Oatp1. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;290(1):153-157.
- Leonhardt M, Keiser M, Oswald S, et al. Hepatic uptake of the magnetic resonance imaging contrast agent Gd-EOB-DTPA: role of human organic anion transporters. *Drug Metab Dispos*. 2010;38(7):1024-1028.
- Jia J, Puls D, Oswald S, et al. Characterization of the intestinal and hepatic uptake/efflux transport of the magnetic resonance imaging contrast agent gadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine-pentaacetic acid. *Invest Radiol*. 2014;49(2):78-86.
- Shimizu A, Kobayashi A, Motoyama H, et al. Features of acute liver congestion on gadoxetate disodium-enhanced MRI in a rat model: role of organic anion-transporting polypeptide 1a1. *J Magn Reson Imaging*. 2015;42(3):828-836.
- Lagadeç M, Doblaz S, Giraudeau C, et al. Advanced fibrosis: correlation between pharmacokinetic parameters at dynamic gadoxetate-enhanced MR imaging and hepatocyte organic anion transporter expression in rat liver. *Radiology*. 2015;274(2):379-386.
- Tsuboyama T, Onishi H, Kim T, et al. Hepatocellular carcinoma: hepatocyte-selective enhancement at gadoxetic acid-enhanced MR imaging—correlation with expression of sinusoidal and canalicular transporters and bile accumulation. *Radiology*. 2010;255(3):824-833.
- Planchamp C, Hadengue A, Stieger B, et al. Function of both sinusoidal and canalicular transporters controls the concentration of organic anions within hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 2007;71(4):1089-1097.
- Tournier N, Goutal S, Auvity S, et al. Strategies to inhibit ABCB1- and ABCG2-mediated efflux transport of erlotinib at the blood-brain barrier: a PET study in non-human primates. *J Nucl Med*. 2017;58(1):117-122.
- Pike VV. Pet radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(8):431-440.
- Testa A, Zanda M, Elmore C, Sharma P. PET tracers to study clinically relevant hepatic transporters. *Mol Pharmaceutics*. 2015;12(7):2203-2216.
- Takashima-Hirano M, Takashima T, Katayama Y, et al. Efficient sequential synthesis of PET probes of the COX-2 inhibitor [^{11}C]celecoxib and its major metabolite [^{11}C]SC-62807 and *in vivo* PET evaluation. *Bioorg Med Chem*. 2011;19(9):2997-3004.
- Paulson S, Zhang J, Breau A, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. *Drug Metab Dispos*. 2000;28(5):514-521.
- Paulson SK, Hribar J, Liu N, et al. Metabolism and excretion of [^{14}C]celecoxib in healthy male volunteers. *Drug Metab Dispos*. 2000;28(3):308-314.
- Takashima T, Wu C, Takashima-Hirano M, et al. Evaluation of breast cancer resistance protein function in hepatobiliary and renal excretion using PET with ^{11}C -SC-62807. *J Nucl Med*. 2013;54(2):267-276.

48. Iimori H, Hashizume Y, Sasaki M, et al. First automatic radiosynthesis of ^{111}C labeled telmisartan using a multipurpose synthesizer for clinical research use. *Ann Nucl Med*. 2011;25(5):333-337.
49. Takashima T, Hashizume Y, Katayama Y, et al. The involvement of organic anion transporting polypeptide in the hepatic uptake of telmisartan in rats: PET studies with ^{111}C telmisartan. *Mol Pharmaceutics*. 2011;8(5):1789-1798.
50. Shimizu K, Takashima T, Yamane T, et al. Whole-body distribution and radiation dosimetry of ^{111}C telmisartan as a biomarker for hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP) 1b3. *Nucl Med Biol*. 2012;39(6):847-853.
51. Ishiguro N, Maeda K, Kishimoto W, et al. Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(7):1109-1115.
52. Ishiguro N, Maeda K, Saito A, et al. Establishment of a set of double transfectants coexpressing organic anion transporting polypeptide 1B3 and hepatic efflux transporters for the characterization of the hepatobiliary transport of telmisartan acyl glucuronide. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(4):796-805.
53. Nishino A, Kato Y, Igarashi T, Sugiyama Y. Both cMOAT/MRP2 and another unknown transporter(s) are responsible for the biliary excretion of glucuronide conjugate of the nonpeptide angiotensin II antagonist, telmisartan. *Drug Metab Dispos*. 2000;28(10):1146-1148.
54. Shingaki T, Takashima T, Ijuin R, et al. Evaluation of Oatp and Mrp2 activities in hepatobiliary excretion using newly developed positron emission tomography tracer ^{111}C dehydropravastatin in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;347(1):193-202.
55. Ijuin R, Takashima T, Watanabe Y, Sugiyama Y, Suzuki M. Synthesis of ^{111}C dehydropravastatin, a PET probe potentially useful for studying Oatp1b1 and Mrp2 transporters in the liver. *Bioorg Med Chem*. 2012;20(12):3703-3709.
56. Kitamura S, Maeda K, Wang Y, Sugiyama Y. Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(10):2014-2023.
57. Ho R, Tirona R, Leake B, et al. Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1793-1806.
58. Hobbs M, Parker C, Birch H, Kenworthy K. Understanding the interplay of drug transporters involved in the disposition of rosuvastatin in the isolated perfused rat liver using a physiologically-based pharmacokinetic model. *Xenobiotica*. 2012;42(4):327-338.
59. He J, Yu Y, Prasad B, et al. Pet imaging of Oatp-mediated hepatobiliary transport of ^{111}C rosuvastatin in the rat. *Mol Pharmaceutics*. 2014;11(8):2745-2754.
60. Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311(1):139-146.
61. Fujino H, Saito T, Ogawa S-I, Kojima J. Transporter-mediated influx and efflux mechanisms of pitavastatin, a new inhibitor of HMG-CoA reductase. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(10):1305-1311.
62. Yagi Y, Kimura H, Arimitsu K, et al. The synthesis of ^{18}F pitavastatin as a tracer for hOATP using the Suzuki coupling. *Org Biomol Chem*. 2015;13(4):1113-1121.
63. Kimura H, Yagi Y, Arimitsu K, et al. Radiosynthesis of novel pitavastatin derivative (^{18}F PTV-F1) as a tracer for hepatic OATP using a one-pot synthetic procedure. *J Label Compd Radiopharm*. 2016;59(13):565-575.
64. Satoh H, Yamashita F, Tsujimoto M, et al. Citrus juices inhibit the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. *Drug Metab Dispos*. 2005;33(4):518-523.
65. Koenen A, Köck K, Keiser M, Siegmund W, Kroemer H, Grube M. Steroid hormones specifically modify the activity of organic anion transporting polypeptides. *Eur J Pharm Sci*. 2012;47(4):774-780.
66. Gedeon C, Behravan J, Koren G, Piquette-Miller M. Transport of glyburide by placental ABC transporters: implications in fetal drug exposure. *Placenta*. 2006;27(11-12):1096-1102.
67. Cygalova LH, Hofman J, Ceckova M, Staud F. Transplacental pharmacokinetics of glyburide, rhodamine 123, and BODIPY FL prazosin: effect of drug efflux transporters and lipid solubility. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331(3):1118-1125.
68. Zhou L, Naraharsetti SB, Wang H, Unadkat JD, Hebert MF, Mao Q. The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits fetal distribution of glyburide in the pregnant mouse: an obstetric-fetal pharmacology research unit network and university of Washington specialized center of research study. *Mol Pharmacol*. 2008;73(3):949-959.
69. Pollex E, Lubetsky A, Koren G. The role of placental breast cancer resistance protein in the efflux of glyburide across the human placenta. *Placenta*. 2008;29(8):743-747.
70. Hemauer SJ, Patrikeeva SL, Nanovskaya TN, Hankins GDV, Ahmed MS. Role of human placental apical membrane transporters in the efflux of glyburide, rosiglitazone, and metformin. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(4):383.e1-383.e7.
71. Tournier N, Saba W, Cisternino S, et al. Effects of selected OATP and/or ABC transporter inhibitors on the brain and whole-body distribution of glyburide. *AAFS J*. 2013;15(4):1082-1090.
72. Grube M, Köck K, Oswald S, et al. Organic anion transporting polypeptide 2b1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80(6):607-620.
73. Stieger B, Unadkat JD, Prasad B, Langer O, Gali H. Role of (drug) transporters in imaging in health and disease. *Drug Metab Dispos*. 2014;42(12):2007-2015.
74. Louie A. Multimodality imaging probes: design and challenges. *Chem Rev*. 2010;110(5):3146-3195.

3.5.2. Synthèse et actualisation de l'article

Cet article de revue présente les différentes sondes développées pour l'imagerie des transporteurs OATP. Il est intéressant de noter que ces transporteurs peuvent être étudiés par les trois principales modalités d'imagerie clinique, et plus particulièrement par l'imagerie TEP (Figure 3 de l'article n°1). Trois de ces sondes TEP sont des statines radiomarquées (^{11}C déhydropravastatine, ^{11}C rosuvastatine, ^{18}F pitavastatine) ce qui n'est pas surprenant puisque les membres de cette classe pharmacologique sont d'excellents substrats des OATP (Tableau 3), très sensibles à l'inhibition pharmacologique (Tableau 6). L'ensemble de ces sondes a été testé principalement *in vitro* sur des cellules exprimant des transporteurs OATP (ovocytes de *Xenopus laevis*, cellules rénales embryonnaires humaines HEK293, cellules ovariennes de hamster chinois CHO) et *in vivo* sur des modèles précliniques (Table 2 de l'article n°1). Ces études précliniques ont été réalisées sur des souris déficientes ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ mébrofénine), des souris transfectées avec une xéno greffe de OATP1A1 (^{111}In EOB-DTPA et Gd-EOB-

DTPA) et surtout avec des protocoles d'inhibition pharmacologique des transporteurs OATP : souris traitées par la rifampicine, médicament inhibiteur des OATP ($[^{99m}\text{Tc}]$ mébrofénine), rats traités par la rifampicine ($[^{11}\text{C}]$ déhydropravastatine, $[^{11}\text{C}]$ rosuvastatine, $[^{11}\text{C}]$ telmisartan) et babouins traités par la rifampicine et la ciclosporine ($[^{11}\text{C}]$ glyburide).

A l'époque de la publication de cet article, une seule sonde, le (15*R*)- $[^{11}\text{C}]$ TIC-Me avait été testée chez l'Homme dans un protocole d'inhibition pharmacologique utilisant la rifampicine (Takashima et al., 2012). Le (15*R*)- $[^{11}\text{C}]$ TIC-Me est en fait une prodrogue très rapidement hydrolysée *in vivo* en (15*R*)- $[^{11}\text{C}]$ TIC, dont la clairance est majoritairement hépatobiliaire. Cette étude clinique menée chez trois volontaires sains en l'absence puis en association avec une dose de rifampicine de 600 mg par voie orale a mis en évidence une diminution de la captation hépatique du (15*R*)- $[^{11}\text{C}]$ TIC et de son élimination biliaire en situation d'inhibition des transporteurs. L'ensemble des études menées avec cette sonde a néanmoins montré la présence de plusieurs radiométabolites, que ce soit dans les cultures d'hépatocytes *in vitro*, dans le sang, la bile et le foie des rats ou dans le plasma humain (Takashima et al., 2012).

Plusieurs sondes alternatives ont été testées et validées comme substrat des OATP chez l'Homme depuis la rédaction de l'article : la $[^{11}\text{C}]$ déhydropravastatine, le $[^{11}\text{C}]$ telmisartan et la $[^{11}\text{C}]$ rosuvastatine (Billington et al., 2019; Kaneko et al., 2018; Maeda et al., 2019). La $[^{11}\text{C}]$ déhydropravastatine a été testée dans trois conditions différentes : conditions basales, après administration d'une dose orale de rifampicine (600 mg) et chez des patients atteints du syndrome de Dubin-Johnson, qui est une maladie hépatique héréditaire rare associée à un déficit de l'activité d'efflux biliaire de MRP2 (Keppler, 2014). L'analyse des clairances de captation hépatique et d'élimination biliaire montrait qu'elles étaient diminuées après inhibition pharmacologique. La clairance de captation était aussi diminuée chez les patients atteints du syndrome de Dubin-Johnson (Kaneko et al., 2018). L'analyse des métabolites a également révélé la présence d'un métabolite radiomarqué qui apparaissait dans toutes les conditions au

bout de 10 minutes et dont la proportion augmentait rapidement jusqu'à 30 minutes, moment où la part de [¹¹C]déhydropravastatine inchangée devenait inférieure à 50%.

Le [¹¹C]telmisartan a lui été administré récemment à l'Homme en l'absence puis en présence de telmisartan co-administré à dose pharmacologique (80 mg) (Maeda et al., 2019). Il a résulté de cet ajout une augmentation de la clairance d'élimination biliaire du [¹¹C]telmisartan. Les auteurs expliquent cette augmentation d'efflux biliaire par le déplacement de la fixation tissulaire du [¹¹C]telmisartan par les fortes doses de telmisartan non radioactif ou encore la saturation des enzymes responsables de son métabolisme, mais la contribution relative de chacun n'est pas encore clairement élucidée à ce jour.

Dans l'étude clinique avec la [¹¹C]rosuvastatine, celle-ci est systématiquement administrée en association avec une dose pharmacologique de rosuvastatine non radiomarquée (5 mg par voie orale), afin que l'analyse de la pharmacocinétique de la [¹¹C]rosuvastatine soit la plus représentative possible de celle de la rosuvastatine lorsqu'elle est employée dans un but thérapeutique (Billington et al., 2019). Cette étude a été menée chez quatre sujets auxquels on a administré la [¹¹C]rosuvastatine en l'absence puis en présence d'une perfusion de ciclosporine (2,5 mg/kg/h). Une analyse compartimentale a permis de montrer que l'ajout de cet inhibiteur a réduit de façon significative la clairance d'efflux biliaire et a augmenté l'exposition plasmatique à la [¹¹C]rosuvastatine. La captation hépatique sinusoidale était elle aussi diminuée chez trois des quatre sujets. L'analyse compartimentale a permis en plus de déterminer la clairance d'efflux sinusoidale, qui n'était pas significativement modifiée par la ciclosporine, mais qui était très supérieure à la clairance d'efflux biliaire (16,24 mL/min et 5,08 mL/min respectivement en l'absence de ciclosporine).

L'erlotinib est un inhibiteur de tyrosine kinase fréquemment utilisé dans le cancer bronchique non à petites cellules et dans le cancer du pancréas. Son radiomarquage récent a permis de le tester comme substrat des transporteurs OATP chez la souris, le rat puis chez l'Homme (Amor et al., 2018; Bauer et al., 2018b, 2018a). La particularité

de cette sonde est qu'elle s'est révélée *in vitro* être transportée sélectivement par OATP2B1 (Bauer et al., 2018a), contrairement aux autres sondes qui étaient principalement transportées par OATP1B1 et OATP1B3, voire les trois simultanément au niveau de la membrane sinusoidale de l'hépatocyte. La première étude clinique a été menée chez des volontaires sains en administrant le [¹¹C]erlotinib seul puis en association à une dose pharmacologique d'erlotinib (300 mg par voie orale) (Bauer et al., 2018a). Le prétraitement par erlotinib non radiomarqué a entraîné une diminution significative de l'exposition hépatique au [¹¹C]erlotinib associée à une augmentation de l'exposition plasmatique. Cette saturation du transport du [¹¹C]erlotinib à travers la membrane hépatique en présence d'erlotinib non radiomarqué ainsi que les résultats obtenus *in vitro* suggéraient un caractère substrat de OATP2B1 *in vivo*. Le [¹¹C]erlotinib a ensuite été administré chez l'Homme en l'absence puis en présence d'un traitement inhibiteur par rifampicine (600 mg par voie orale) (Bauer et al., 2018b). La présence de rifampicine a diminué la captation et l'exposition hépatiques du [¹¹C]erlotinib mais de façon moins importante que lors des études précliniques menées préalablement chez le rat et la souris (Amor et al., 2018; Bauer et al., 2018b). Une étude précédente avait démontré que ce radiotracer était substrat des transporteurs d'efflux P-gp et BCRP, probablement responsables de son excrétion biliaire (Traxl et al., 2015).

A noter qu'un autre radiotracer pourrait présenter un intérêt pour l'étude *in vivo* des OATP, la [¹¹C]cholylsarcosine, un analogue de synthèse des sels biliaires qui a été radiomarqué pour l'étude de la fonction d'excrétion biliaire (Frisch et al., 2012). Les données de la littérature semblent indiquer que cette sonde entre dans le foie à la fois par les transporteurs OATP et par le transporteur de sels biliaires NTCP et qu'elle est ensuite excrétée vers la bile par BSEP (Ørntoft et al., 2017). Néanmoins, aucune étude *in vitro* n'a confirmé ce transport OATP à notre connaissance et l'interaction avec NTCP complique l'étude de cette interface par ce radiotracer.

3.5.3. La [^{99m}Tc]mébrofénine

La [^{99m}Tc]mébrofénine, ou triméthyl-bromo-IDA (acide iminodiacétique), est un médicament radiopharmaceutique utilisé depuis plusieurs dizaines d'années en médecine nucléaire pour la scintigraphie hépatobiliaire (Doo et al., 1991; Fritzberg and Klingensmith, 1982). Ce traceur présente l'avantage d'être rapidement capté par le foie puis éliminé vers la bile (Krishnamurthy and Krishnamurthy, 1989) ce qui en fait un agent d'intérêt pour l'exploration des dysfonctionnements à la fois hépatiques et biliaires.

Un certain nombre d'études *in vitro* ont permis de montrer que sa captation et son élimination étaient médiées par différents transporteurs hépatocytaires. Plusieurs études ont mis en évidence que parmi les transporteurs exprimés au niveau sinusoidal des hépatocytes, la [^{99m}Tc]mébrofénine était transportée par OATP1B1 et OATP1B3, mais pas OATP2B1, OCT1 ni NTCP (Ghibellini et al., 2008; de Graaf et al., 2011; Neyt et al., 2013). Par ailleurs, la captation par les cellules exprimant OATP1B1 et OATP1B3 était diminuée en présence de la rifampicine, inhibiteur des OATP, ce qui confirme le caractère substrat de la [^{99m}Tc]mébrofénine pour ces transporteurs (Ghibellini et al., 2008; Swift et al., 2010b). Au niveau canaliculaire, les études *in vitro* ont souligné que c'était le transporteur d'efflux MRP2 qui était l'acteur principal de l'efflux biliaire de la [^{99m}Tc]mébrofénine (Ghibellini et al., 2008; Pfeifer et al., 2013; Swift et al., 2010b). Ce transport était diminué lorsque les cellules exprimant MRP2 étaient exposées au MK571, un inhibiteur connu de MRP2 (Ghibellini et al., 2008; Swift et al., 2010b). Enfin, le transporteur d'efflux MRP3 exprimé au niveau basolatéral de l'hépatocyte a également été identifié *in vitro* comme participant au transport de la [^{99m}Tc]mébrofénine et pourrait participer à son efflux sinusoidal du foie vers le sang (Ghibellini et al., 2008). Lors de cette étude, le transport de la sonde vers les cellules transfectées avec MRP3 était fortement diminué en présence d'estradiol-17-beta-glucuronide, qui est connu pour inhiber MRP3.

Au niveau préclinique, deux études ont été menées chez le rongeur pour éclaircir *in vivo* l'intérêt de cette sonde pour l'étude des transporteurs hépatiques. Une étude réalisée avec des rats déficients en MRP2 a démontré le caractère substrat de la [^{99m}Tc]mébrofénine (Bhargava et al., 2009). En effet, la sonde était rapidement captée et éliminée par le foie des rats sains alors qu'elle s'accumulait de manière importante dans ceux des rats mutants. Cette observation a été complétée par l'ajout de ciclosporine, un médicament connu pour inhiber un certain nombre de transporteurs parmi lesquels MRP2. L'ajout de cet inhibiteur a diminué l'excrétion biliaire des rats sains, mais n'a eu aucun effet supplémentaire sur l'excrétion biliaire de la [^{99m}Tc]mébrofénine chez les rats déficients en MRP2. La deuxième étude a été réalisée chez différents groupes de souris (Neyt et al., 2013). Deux groupes étaient déficients soit en OATP soit en MRP2 et la distribution de la [^{99m}Tc]mébrofénine dans ces groupes a été comparée à celle d'un groupe témoin. Chez les souris déficientes en OATP, l'exposition hépatique était diminuée et la radioactivité détectée dans la vésicule biliaire et les intestins était très faible. L'exposition plasmatique en revanche était augmentée et une déviation rénale de l'élimination était observée. Chez les souris déficientes en MRP2, l'exposition hépatique était au contraire augmentée alors que l'exposition plasmatique était similaire à celle du groupe témoin. L'élimination de la [^{99m}Tc]mébrofénine vers la vésicule biliaire et les intestins était observée dans ce groupe mais retardée par rapport au groupe témoin. Un quatrième groupe de souris a été testé : il s'agissait de souris saines, comparables au groupe témoin, pour lesquelles une inhibition pharmacologique a été réalisée par de la rifampicine. Dans ce groupe, l'élimination biliaire a semblé ralentie avec un retard du pic hépatique, un retard de l'apparition de la radioactivité dans la vésicule biliaire et une activité moins importante que dans le groupe témoin. L'exposition plasmatique de ce groupe était également augmentée par rapport au groupe témoin, ce qui suggère que la rifampicine inhibe à la fois le transport OATP et MRP2 de la [^{99m}Tc]mébrofénine.

Au niveau clinique, la [^{99m}Tc]mébrofénine n'a pour l'instant été utilisée que dans trois études visant à étudier les transporteurs hépatiques *in vivo* chez l'Homme. Pour chacune de ces études, une modélisation pharmacocinétique a été réalisée par analyse compartimentale afin d'évaluer l'impact des différents transporteurs hépatiques. Une première étude utilisant un modèle à deux compartiments a permis de modéliser la distribution de la [^{99m}Tc]mébrofénine et ses changements dans des situations de dysfonctionnements pathologiques de la captation hépatique et/ou de l'excrétion biliaire (hyperbilirubinémie et cholestase). Cette analyse a permis de montrer que l'excrétion biliaire était la voie d'élimination principale de la [^{99m}Tc]mébrofénine, prédominante par rapport à l'efflux basolatéral (Ghibellini et al., 2008). Une autre étude clinique a été menée avec la [^{99m}Tc]mébrofénine, cette fois-ci en l'associant à du ritonavir (Pfeifer et al., 2013). Le ritonavir est un puissant inhibiteur de certains cytochromes dont le cytochrome P450 3A4, ce qui permet d'augmenter la biodisponibilité des médicaments métabolisés par cette voie (Vourvahis and Kashuba, 2007). Cependant, on connaissait mal l'impact du ritonavir sur l'activité des transporteurs hépatiques. En effet, le ritonavir est un inhibiteur *in vitro* de MRP2 mais aussi des OATP (Annaert et al., 2010; Ye et al., 2010). La [^{99m}Tc]mébrofénine, qui n'est pas métabolisée, a permis d'étudier les répercussions fonctionnelles du ritonavir sur l'activité de ces transporteurs. Le ritonavir (300 mg par voie orale 14h puis 2h avant administration de [^{99m}Tc]mébrofénine) a augmenté l'exposition plasmatique de la [^{99m}Tc]mébrofénine sans affecter l'exposition hépatique globale ni l'élimination biliaire. La modélisation compartimentale de ces données, qui a nécessité l'ajout d'un nouveau compartiment extra-hépatique, a toutefois permis d'identifier une diminution du processus de captation hépatique en présence de cet inhibiteur, mais sans altération du processus d'excrétion biliaire. Ces résultats ont été confirmés par une étude complémentaire *in vitro* qui indiquait que le ritonavir inhibait l'accumulation de [^{99m}Tc]mébrofénine dans des hépatocytes humains cultivés en sandwich et que la forte fixation du ritonavir au niveau intracellulaire limitait son interaction avec la protéine

d'efflux MRP2 et n'impactait ainsi pas son fonctionnement (Pfeifer et al., 2013). La [^{99m}Tc]mébrofénine a été utilisée plus récemment dans une étude clinique afin d'explorer l'activité des transporteurs hépatiques en situation pathologique (Ali et al., 2017). Cette étude comparait un groupe de sujets témoins, à un groupe de patients atteints de NASH, une des pathologies dans lesquelles des altérations d'expression des transporteurs hépatiques ont été identifiées (Tableau 5). Cette étude a permis d'explorer l'impact fonctionnel de ces modifications et a révélé que la NASH augmentait l'exposition hépatique et systémique à la [^{99m}Tc]mébrofénine en raison d'une diminution de la clairance biliaire et du volume du compartiment central. La modélisation a également montré que la captation hépatique était abaissée chez les patients souffrant de NASH ainsi que chez les sujets présentant un variant génotypique de OATP1B1, confirmant ainsi que ces populations sont plus vulnérables aux médicaments substrats des transporteurs OATP1B1, OATP1B3 et MRP2 (Ali et al., 2017).

3.5.4. Le [¹¹C]glyburide

Le glyburide, également connu sous le nom de glibenclamide, est un médicament hypoglycémiant de la classe des sulfonylurées, fréquemment utilisé dans le traitement du diabète de type 2. Son transport par les protéines membranaires a été bien caractérisé par plusieurs études *in vitro* qui ont montré que ce médicament était substrat à la fois des transporteurs d'efflux comme la P-gp, la BCRP, les MRP1 et MRP3, mais également des transporteurs d'influx OATP (Cygaloova et al., 2009; Gedeon et al., 2006; Hemauer et al., 2010; Pollex et al., 2008; Zhou et al., 2008). A la différence de la plupart des sondes OATP qui sont substrats principalement de OATP1B1 et OATP1B3, le [¹¹C]glyburide présente la particularité d'être transporté majoritairement par OATP2B1 et OATP1A2, et dans une moindre mesure par OATP1B1 (Koenen et al., 2012; Satoh et al., 2005). OAT2B1 et OATP1A2 étant exprimés de façon ubiquitaire, contrairement aux OATP1B1 et OATP1B3 qui sont exprimés quasiment exclusivement dans le foie, il s'agit là d'une sonde permettant d'envisager l'étude de l'impact

fonctionnel des OATP exprimés au niveau extra-hépatique. Par ailleurs, d'autres études ont montré que la perméabilité membranaire du glyburide était limitée et que le transport par les protéines membranaires était le principal mécanisme permettant son franchissement des membranes (Varma et al., 2014), ce qui pourrait être un atout pour l'étude des transporteurs membranaires.

Une étude préclinique chez le primate a été réalisée dans ce sens en utilisant une inhibition pharmacologique par de la rifampicine et de la ciclosporine (Tournier et al., 2013). Cette étude a mis en évidence une diminution de la captation hépatique du [¹¹C]glyburide associée à une augmentation de sa concentration plasmatique en présence des inhibiteurs. L'exposition hépatique était abaissée également en situation d'inhibition mais le résultat était comparable qu'il s'agisse de rifampicine, ou de ciclosporine qui était pourtant supposée inhiber la P-gp en plus des OATP. Cette sonde a permis d'observer l'impact des protocoles d'inhibition sur deux tissus supplémentaires : le myocarde et le parenchyme rénal. Cet impact a été évalué dans différents tissus par le calcul du rapport d'ASC ($ASC_R = \frac{ASC_{tissu}}{ASC_{plasma}}$) et ce ratio s'est avéré diminué significativement pour le rein et le myocarde après inhibition par la rifampicine et la ciclosporine. Cette étude a également révélé que le [¹¹C]glyburide était métabolisé assez lentement chez le primate (90% d'inchangé à 20 minutes et 70% encore à 60 minutes) et aucun radiométabolite n'a été détecté en présence de rifampicine ou de ciclosporine.

4. Conclusion

Les transporteurs membranaires sont des déterminants majeurs de la pharmacocinétique de nombreux médicaments. Il est aujourd'hui nécessaire d'identifier les médicaments qui en sont substrats afin d'anticiper un risque d'interaction médicamenteuse ou de mieux comprendre une variabilité pharmacocinétique liée à une modulation de l'activité de ces transporteurs. La plupart des médicaments sont souvent substrats de multiples transporteurs parfois ABC et SLC,

ce qui pose de grandes difficultés pour leur étude chez l'Homme. Certains médicaments substrats d'un transporteur d'influx à une interface peuvent également s'avérer être substrats de transporteurs d'efflux à cette même interface. Dans ce cas, le transport global du médicament résultera de la compétition entre les transporteurs d'influx et d'efflux, qui est difficile à prédire (Chapy et al., 2016; Taskar et al., 2017). L'hépatocyte illustre parfaitement cet exemple puisqu'un grand nombre de transporteurs SLC (OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, NTCP, OCT1, OAT2, MATE1) et ABC (P-gp, BSEP, MRP2, BCRP, MRP3, MRP4, MRP6) y est exprimé et la participation de chacun au processus d'élimination hépatobiliaire est complexe à déterminer précisément. Une autre difficulté associée aux transporteurs est la méconnaissance de leurs répercussions fonctionnelles au niveau de certaines interfaces biologiques. C'est le cas par exemple des transporteurs OATP, dont le rôle de captation a été bien identifié au niveau de l'interface sinusoidale de l'hépatocyte, mais qui sont pourtant retrouvés de manière ubiquitaire dans l'organisme et dont l'impact au niveau des autres interfaces n'est pas encore clairement élucidé.

Les méthodes d'imagerie offrent des perspectives innovantes pour l'exploration des transporteurs *in vivo*. Les avancées dans le développement de sondes d'imagerie dédiées à l'étude des transporteurs ont permis d'apporter un nouvel éclairage sur leur rôle à plusieurs interfaces tissulaires, à commencer par la BHE. L'étude des transporteurs par l'imagerie repose principalement sur l'utilisation de sondes substrats de ces transporteurs permettant de mettre en évidence leur activité. Ces sondes sont sélectionnées pour être les plus spécifiques possibles du transporteur que l'on veut étudier avec la plus importante capacité de transport possible pour générer un « contraste » suffisant entre les situations de faible et de forte activité du transporteur (Kannan et al., 2009; Wanek et al., 2015). L'utilisation de ces sondes est souvent associée à celle d'un inhibiteur spécifique du transporteur d'intérêt, permettant de révéler l'activité de ce transporteur en mesurant la différence de signal de la sonde avant et après inhibition du transporteur (Tournier et al., 2018).

Parmi les transporteurs, la famille des OATP est une classe émergente en pharmacologie. En effet, il existe un grand nombre d'OATP chez l'Homme, exprimés à de nombreuses interfaces biologiques. Leur contribution à la captation hépatique a été clairement démontrée, entre autres grâce à certaines études par l'imagerie (Hernández Lozano and Langer, 2020). Les sondes utilisées pour l'imagerie des OATP sont également substrats des transporteurs d'efflux au niveau canaliculaire. Le signal mesuré au niveau du foie ne reflète donc pas l'activité propre du transport OATP.

Le premier objectif de notre travail a été de mettre au point un protocole d'inhibition pharmacologique permettant d'améliorer la sélectivité de la [^{99m}Tc]mébrofénine vis-à-vis de son transport sinusoidal (OATP) ou canaliculaire (MRP2), afin de réaliser une imagerie moléculaire plus sélective de l'activité de transport à chaque pôle de l'hépatocyte. L'importance pharmacocinétique des OATP au niveau extra-hépatique reste mal connue. Notre deuxième objectif a donc été d'explorer pour la première fois chez l'Homme les répercussions fonctionnelles des transporteurs OATP hépatiques et extra-hépatiques grâce au [¹¹C]glyburide dans le cadre d'une étude clinique chez des volontaires sains.

Chapitre II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

1. Contexte général

L'émergence de nouvelles techniques d'imagerie a permis d'approfondir les connaissances sur l'activité des transporteurs de médicaments. Les données de la littérature suggèrent une prise en compte grandissante des transporteurs de la famille des OATP en pharmacologie. Plusieurs sondes précliniques et cliniques ont été développées et validées pour explorer cette famille de transporteurs par imagerie, avec un objectif translationnel pour évaluer leur importance chez l'Homme. Cependant, la diversité des membres de cette famille et leurs interactions étroites avec un grand nombre d'autres transporteurs, en particulier au niveau de l'hépatocyte, compliquent la mise au point des techniques et parfois l'interprétation des données d'imagerie obtenues.

Dans le cadre de ce travail de thèse, notre attention s'est portée sur deux sondes d'imagerie dont le caractère substrat des OATP avait déjà été clairement démontré par des études *in vitro* et précliniques. L'objectif général était d'en optimiser les protocoles d'utilisation et d'analyse de données cinétiques afin d'apporter de nouveaux outils permettant d'approfondir plus spécifiquement l'étude des transporteurs OATP et de mettre en évidence les répercussions pharmacocinétiques *in vivo*, tout en prenant en compte leur environnement moléculaire, avec notamment l'expression d'autres transporteurs au niveau des interfaces biologiques étudiées :

- La [^{99m}Tc]mébrofénine (partie 1) : cette sonde de scintigraphie présente l'immense avantage d'être commercialisée et disponible dans la plupart des services de médecine nucléaire. La [^{99m}Tc]mébrofénine est très majoritairement éliminée par voie hépatobiliaire et sa captation hépatique est principalement médiée par des transporteurs OATP. MRP2 joue également un rôle déterminant dans la cinétique hépatique de la [^{99m}Tc]mébrofénine car il en contrôle la sécrétion biliaire (Bhargava et al., 2009; Bonnaventure and Pastor, 2015). Des protocoles précliniques d'inhibition pharmacologique du transport de la [^{99m}Tc]mébrofénine ont été réalisés, notamment avec la rifampicine (Neyt et al., 2013). Néanmoins, cet

inhibiteur n'est pas sélectif des OATP car il inhibe également MRP2. Nous avons donc mis au point et validé des protocoles d'inhibition ciblée du transport de la [^{99m}Tc]mébrofénine permettant chez le rat d'inhiber sélectivement son transport par MRP2 sans influencer l'activité OATP hépatique.

- Le [¹¹C]glyburide (partie 2) : Cette sonde TEP a été développée et validée pour l'imagerie des OATP par une étude préclinique menée il y a quelques années au sein de notre laboratoire (Tournier et al., 2013). Ces résultats encourageants ont conduit à une étude clinique actuellement en cours dans notre centre. Dans ce travail nous avons analysé les données obtenues au cours de l'étude préclinique pour définir une méthode de quantification optimale, et applicable chez l'Homme, permettant de mettre en évidence l'importance du transport OATP à l'interface sang-tissu. Cette méthode a ensuite été utilisée pour l'analyse des premières données cliniques obtenues chez le volontaire sain avec le [¹¹C]glyburide.

2. Partie 1 - [^{99m}Tc]mébrofénine : Optimisation de la sélectivité de l'imagerie OATP ou MRP2 *in vivo*

2.1. Article n°2 : Validation of Pharmacological Protocols for Targeted Inhibition of Canalicular MRP2 Activity in Hepatocytes Using [^{99m}Tc]mefrofenin Imaging in Rats

Marie S., Hernández-Lozano I., Breuil L., Saba W., Novell A., Gennisson J.L., Langer O., Truillet C., Tournier N.

Pharmaceutics. Mai 2020, 12(6):486.

(Marie et al., 2020)

Article

Validation of Pharmacological Protocols for Targeted Inhibition of Canalicular MRP2 Activity in Hepatocytes Using [^{99m}Tc]mebrofenin Imaging in Rats

Solène Marie ^{1,2,3}, Irene Hernández-Lozano ⁴, Louise Breuil ¹, Wadad Saba ¹, Anthony Novell ¹, Jean-Luc Gennisson ¹, Oliver Langer ^{4,5,6}, Charles Truillet ¹ and Nicolas Tournier ^{1,*}

¹ Université Paris-Saclay, CEA, Inserm, CNRS, BioMaps, Service Hospitalier Frédéric Joliot, 4 place du Général Leclerc, 91401 Orsay, France; solene.marie@aphp.fr (S.M.); louise.breuil@cea.fr (L.B.); wadad.saba@cea.fr (W.S.); anthony.novell@universite-paris-saclay.fr (A.N.); jean-luc.gennisson@universite-paris-saclay.fr (J.-L.G.); charles.truillet@cea.fr (C.T.)

² Département de Pharmacie Clinique, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France

³ AP-HP, Université Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre, Pharmacie Clinique, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France

⁴ Department of Clinical Pharmacology, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria; irene.hernandezlozano@meduniwien.ac.at (I.H.-L.); oliver.langer@ait.ac.at (O.L.)

⁵ Preclinical Molecular Imaging, AIT Austrian Institute of Technology GmbH, 2444 Seibersdorf, Austria

⁶ Division of Nuclear Medicine, Department of Biomedical Imaging und Image-guided Therapy, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria

* Correspondence: nicolas.tournier@cea.fr, Tel.: +33-169-867-712

Received: 4 May 2020; Accepted: 24 May 2020; Published: 27 May 2020

Abstract: The multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) mediates the biliary excretion of drugs and metabolites. [^{99m}Tc]mebrofenin may be employed as a probe for hepatic MRP2 activity because its biliary excretion is predominantly mediated by this transporter. As the liver uptake of [^{99m}Tc]mebrofenin depends on organic anion-transporting polypeptide (OATP) activity, a safe protocol for targeted inhibition of hepatic MRP2 is needed to study the intrinsic role of each transporter system. Diltiazem (DTZ) and cyclosporin A (CsA) were first confirmed to be potent MRP2 inhibitors *in vitro*. Dynamic acquisitions were performed in rats ($n = 5–6$ per group) to assess the kinetics of [^{99m}Tc]mebrofenin in the liver, intestine and heart-blood pool after increasing doses of inhibitors. Their impact on hepatic blood flow was assessed using Doppler ultrasound ($n = 4$). DTZ (*s.c.*, 10 mg/kg) and low-dose CsA (*i.v.*, 0.01 mg/kg) selectively decreased the transfer of [^{99m}Tc]mebrofenin from the liver to the bile (k_3). Higher doses of DTZ and CsA did not further decrease k_3 but dose-dependently decreased the uptake (k_1) and backflux (k_2) rate constants between blood and liver. High dose of DTZ (*i.v.*, 3 mg/kg) but not CsA (*i.v.*, 5 mg/kg) significantly decreased the blood flow in the portal vein and hepatic artery. Targeted pharmacological inhibition of hepatic MRP2 activity can be achieved *in vivo* without impacting OATP activity and liver blood flow. Clinical studies are warranted to validate [^{99m}Tc]mebrofenin in combination with low-dose CsA as a novel substrate/inhibitor pair to untangle the role of OATP and MRP2 activity in liver diseases.

Keywords: drug-induced liver injury; drug metabolism; imaging; liver; membrane transporter; pharmacokinetics

1. Introduction

The channeling of many drugs through hepatocytes is governed by membrane transporters that work together to control hepatic uptake and subsequent biliary elimination [1,2]. Transporters located at the sinusoidal membrane of hepatocytes (blood–liver interface) are responsible for the transfer of compounds between blood and hepatocytes. Transporters located at the canalicular interface (liver–bile interface) mediate the biliary excretion of drugs and/or their metabolites [3] (Figure 1).

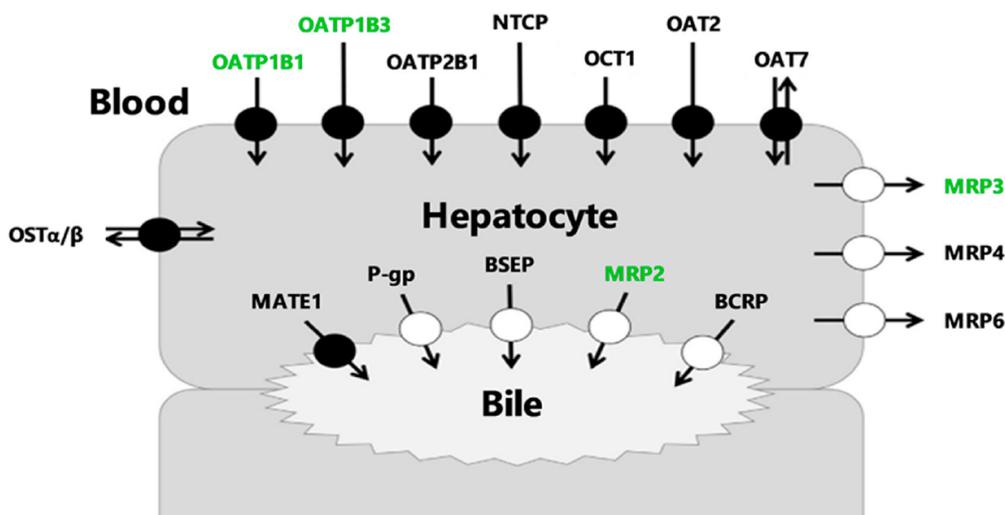


Figure 1. Membrane transporters expressed in hepatocytes. Transporters indicated in green have been described in the literature to transport [^{99m}Tc]mebrofenin. BCRP = Breast Cancer Resistance Protein, BSEP = Bile-Salt Export Pump, MATE1 = Multidrug And Toxin Extrusion Protein 1, MRP = Multidrug Resistance-Associated Protein, NTCP = Na⁺-taurocholate-cotransporting polypeptide, OAT = Organic Anion Transporter, OATP = Organic Anion-Transporting Polypeptide, OCT = Organic Cation Transporter, OST = Organic Solute Transporter, P-gp = P-glycoprotein.

Hepatocyte transporters are key determinants for pharmacokinetics (PK) since their altered activity may affect drug exposure, efficacy or safety [4]. Hepatobiliary transporter activity is increasingly considered as a mechanistic determinant for drug-induced liver injury (DILI), which has become a major challenge in drug development [4–6]. Many endogenous compounds and xenobiotics are substrates or inhibitors of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), a major efflux transporter located at the canalicular pole of hepatocytes (Figure 1) [7,8]. MRP2 is the main driving force for bile salt-independent bile flow through canalicular excretion of reduced glutathion [9]. Prolonged depletion or inhibition of MRP2 activity can cause accumulation of harmful bile constituents resulting in cholestatic liver cell damage [9]. In addition, a decrease in MRP2 activity may lead to hepatic accumulation of MRP2-substrate drugs and cause idiosyncratic hepatotoxicity [4]. Selective determination of the individual transport capacity of MRP2 apart from other hepatocyte transporters is needed to address its functional role and regulation during patho-physiological conditions [10].

In vitro hepatocytes or in situ rodent liver perfusion have convincingly demonstrated the importance of canalicular MRP2 activity in controlling the liver-to-bile gradient [11,12]. Dynamic imaging methods using transporter probe substrates are being developed to study liver transporter activity in vivo [13,14]. Ideal imaging probes have to survive hepatic metabolism to avoid the generation of radiolabeled metabolites, which may confound the interpretation of the imaging data [14]. Moreover, sufficient initial liver uptake, which often involves uptake transport, is required to

obtain a quantifiable imaging signal in the liver and bile. Radiolabeled compounds that fulfill these criteria are rare. [^{99m}Tc]mebrofenin is a readily available radiopharmaceutical used in nuclear medicine for hepatobiliary scintigraphy [15]. [^{99m}Tc]mebrofenin undergoes neither metabolism nor conjugation [16–18] and has gained interest as a transporter imaging probe because its sinusoidal uptake is highly dependent on organic anion-transporting polypeptide (OATP) influx transporters [17,19,20] and its biliary excretion is predominantly mediated by MRP2 [21–23]. In vitro studies have shown that [^{99m}Tc]mebrofenin is also transported by the sinusoidal efflux transporter MRP3, which may impact its liver kinetics in vivo [17] (Figure 1). [^{99m}Tc]mebrofenin benefits from an extensive hepatic extraction and a fast blood clearance. However, fast clearance from the liver volume and rapid accumulation of radioactivity in the bile makes [^{99m}Tc]mebrofenin more suitable to assess biliary function rather than liver extraction [24].

The most effective way to study in vivo the activity of a transporter with a radiolabeled transporter substrate is the use of a specific transporter inhibitor [25,26]. The difference in pharmacokinetic parameters from scans acquired in the presence or absence of a transporter inhibitor unveils transport capacity. An example is the combination of OATP substrate radiotracers (such as [¹¹C]dehydropravastatin) with the OATP inhibitor rifampicin (RIF) to study OATP activity in the liver [27]. The possibility of following a similar approach for the imaging of MRP2 activity in the liver using [^{99m}Tc]mebrofenin critically depends on the availability of a clinically applicable MRP2 inhibitor which shows negligible interaction with sinusoidal uptake transporters.

There are limited data regarding the impact of transporter inhibitors on the liver kinetics of [^{99m}Tc]mebrofenin in vivo. RIF is a potent in vitro inhibitor of OATP [28], MRP2 [8] and MRP3 [29]. In vivo experiments in rats and mice showed that RIF inhibited both the liver uptake and canalicular efflux of [^{99m}Tc]mebrofenin to a similar extent [21,30]. Diltiazem (DTZ) is a potent in vitro inhibitor of MRP2 [8], but not of OATP1B1 and OATP1B3 [28]. Cyclosporin (CsA) is a potent in vitro inhibitor of MRP2 [8] and MRP3 [31] but is also known to inhibit OATP [28]. The aim of the present study was to test different doses of DTZ and CsA in rats to come up with an effective and safe imaging protocol, which can be potentially applied in a clinical setting to selectively assess MRP2 activity in the liver with [^{99m}Tc]mebrofenin.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Radiochemicals

For in vitro assays, calcein-AM, RIF, DTZ and CsA were obtained from Sigma-Aldrich. For in vivo experiments, commercial drugs were used for RIF (Rifadine[®], Sanofi, France), DTZ (Tildiem[®], Sanofi, France) and CsA (Sandimmun[®], Novartis, France). Commercial kits of mebrofenin (Cholediam[®]) were a gift from Mediam (France). Each kit was labeled with a sodium [^{99m}Tc]pertechnetate (Na [^{99m}Tc]TcO₄) eluate (750 MBq/mL) obtained from a sterile [⁹⁹Mo]/[^{99m}Tc] generator (Drytec[®] and Tekcis[®], GE Healthcare, France) followed by quality control according to the manufacturer's recommendations.

2.2. Animals

[^{99m}Tc]mebrofenin imaging experiments were performed in a total of 54 male rats (Wistar, weight: 313 ± 74 g). Doppler ultrasound imaging was performed in an additional 12 male rats (Wistar, 346 ± 67 g). All animal experiments were in accordance with the recommendations of the European Community (2010/63/UE) and the French National Committees (law 2013-118) for the care and use of laboratory animals. The experimental protocol was approved by a local ethics committee for animal use (CETEA) and by the French ministry of agriculture (APAFIS#7466-20 1611 04 1 7049220 v2). Animals were housed in a controlled environment with access to food and water ad libitum.

2.3. In Vitro Inhibition Assays

We used an in vitro assay to compare the MRP2-inhibitory potency of RIF, DTZ and CsA. Stably transfected MDCK-II-MRP2 cells overexpressing human MRP2 were a kind gift from A. Schinkel (National Cancer Institute, The Netherlands). Cells were cultured in a controlled atmosphere at 37 °C, 5% CO₂. The culture medium was composed of DMEM Glutamax (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4.5 g/L D-glucose, pyruvate) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin 5000 U/mL). MRP2-mediated transport was assessed using the calcein-AM assay [32]. Cells were seeded in 24-well plates (30,000 cells per well) in 500 µL of culture medium. Three days later the medium was removed and replaced by the tested inhibitor (RIF, DTZ and CsA) at selected concentrations ranging from 0 (solvent, 1% DMSO) to 1 mM in 200 µL of incubation buffer (10% HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) + CaCl₂ + MgCl₂, 1 mM pyruvate, 10 mM HEPES, 1 µM calcein-AM). After 30 min at 37 °C, the incubation buffer was removed and cell monolayers were rapidly washed with 300 µL of ice-cold buffer (Dulbecco's phosphate buffered saline + CaCl₂ + MgCl₂). Cells were then lysed by 10 min of incubation with 500 µL of NaOH (10 mM). A total of 200 µL was collected from each well (*n* = 4 wells per condition) and intracellular fluorescence was determined using a Mithras® detector (Berthold, France, wavelength excitation 485 nm/detection 535 nm). For each inhibitor, uptake data were normalized to describe the extent of inhibition from 0 to maximal (100%) inhibition. Nonlinear regression was performed to estimate the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of each inhibitor (GraphPad Prism software, version 8.4, San Diego, CA, USA).

2.4. [^{99m}Tc]mebrofenin Scintigraphy

Rats were anesthetized with isoflurane (3.5% and 1.5–2% in oxygen for induction and maintenance, respectively). [^{99m}Tc]mebrofenin scintigraphy was performed using a clinical SPECT-CT camera (Symbia®, Siemens, Knoxville, TN, USA) with a Low Energy High Resolution (LEHR) collimator. In each session, 3 rats were placed in a row on the scanner bed and catheters were inserted in the caudal vein. Experiments were performed for control conditions or after injection of the different transporter inhibitors. RIF (40 mg/kg intravenously, i.v.) was injected immediately before [^{99m}Tc]mebrofenin as previously described [33]. The PK of subcutaneously (s.c.) injected DTZ (20 mg/kg) has been reported in rats with plasma concentration > 10 µg/mL (25 µM) obtained 60 min after injection [34], consistent with the potency of DTZ to inhibit MRP2, assessed in vitro in the present study. A dose range of DTZ (10, 20 or 40 mg/kg s.c.) was therefore administered 60 min before [^{99m}Tc]mebrofenin. CsA was injected i.v. 5 min before [^{99m}Tc]mebrofenin, starting from a high clinical dose which was further decreased (5, 1, 0.5, 0.1, 0.01 mg/kg, i.v.). The number of rats used for each condition is reported in Table 1. Rats were injected with [^{99m}Tc]mebrofenin (39 ± 4 MBq, i.v.) followed by dynamic planar acquisitions. Acquisitions were terminated by a X-ray CT scan. Dynamic images were reconstructed as 20, 10, 20, and 4 frames with a duration of 15, 30, 60 and 120 s respectively, to provide time-activity curves (TACs) in selected organs.

2.5. Analysis of [^{99m}Tc]mebrofenin Scintigraphy Data

Images were analyzed with PMOD® software (version 3.9, PMOD Technologies LLC). Regions of interest (ROI) were manually drawn on the liver, intestine, heart (= image-derived blood curve) and urinary bladder. Corresponding TACs were generated by plotting the mean radioactivity amount in each ROI normalized to the injected dose in each animal (cps/MBq) versus time. For descriptive pharmacokinetic analysis, the maximum total amount (X_{\max} , cps/MBq), the time to reach X_{\max} (T_{\max} , min) and the area under the TAC from 0 to 30 min ($AUC_{0-30\text{min}}$) were determined for each ROI. The distribution of [^{99m}Tc]mebrofenin from blood to the liver was assessed by determining the liver to blood AUC ratio (AUCR) from 0 to 3 min ($AUCR_{\text{liver/blood}} = \frac{AUC_{\text{liver},0-3\text{min}}}{AUC_{\text{blood},0-3\text{min}}}$). The distribution of [^{99m}Tc]mebrofenin from the liver to the intestine was assessed by calculating $AUCR_{\text{intestine/liver}}$ from 10 to 25 min ($AUCR_{\text{intestine/liver}} = \frac{AUC_{\text{intestine},10-25\text{min}}}{AUC_{\text{liver},10-25\text{min}}}$). The urinary clearance (CL_{urine}) of

[^{99m}Tc]mebrofenin was calculated using the equation $CL_{urine} = \frac{X_{bladder,30min}}{AUC_{blood,0-30min}}$ where $X_{bladder,30min}$ represents the amount of [^{99m}Tc]mebrofenin in the bladder at 30 min after the tracer injection.

2.6. Pharmacokinetic Modeling of [^{99m}Tc]mebrofenin Hepatobiliary Distribution and Elimination

The uptake clearance of [^{99m}Tc]mebrofenin from blood to the liver (CL_{uptake}) was estimated using the integration plot method [33,35] from 0 to 3 min (linear part) after [^{99m}Tc]mebrofenin injection using the following equation: $\frac{X_{liver,t}}{C_{blood,t}} = CL_{uptake} \times \left(\frac{AUC_{blood,0-t}}{C_{blood,t}} \right) + V_E$. $X_{liver,t}$ represents the total amount of [^{99m}Tc]mebrofenin in the liver at the time t , $C_{blood,t}$ represents the concentration of [^{99m}Tc]mebrofenin in the blood at time t (derived from the heart ROI). $C_{blood,t}$ was calculated as the amount of [^{99m}Tc]mebrofenin in the blood ($X_{blood,t}$) divided by the mean volume of the heart ROI (V_{heart}), which was measured on the X-ray CT scan ($V_{heart} = 2.55 \pm 0.36$ mL). $AUC_{blood,0-t}$ represents the area under the blood TAC from time 0 to t . CL_{uptake} corresponds to the slope of the linear regression plot. V_E represents the initial distribution volume in the liver at time 0. The transfer of [^{99m}Tc]mebrofenin from liver to bile could not be estimated using integration plot analysis as plots were not linear at any time point of the kinetics.

A previously developed four-compartment model [36] was implemented in order to estimate the rate constants that describe the transfer of [^{99m}Tc]mebrofenin between blood and hepatocytes (k_1 , and k_2 , min^{-1}), from hepatocytes to intrahepatic bile ducts (k_3 , min^{-1}), and from the intrahepatic bile ducts to the intestine (k_5 , min^{-1}) (Figure S1). The processes defined by k_1 , k_2 , and k_3 may involve active transport through the basolateral or canalicular membranes of hepatocytes. The liver volume of interest defined in the model consists of well-mixed compartments of blood, hepatocytes and intrahepatic bile ducts. The additional compartment represents the extrahepatic bile ducts and intestines. Compartment volumes are estimated by hepatic anatomical characteristics and physiological processes as previously described [36,37]. In addition, the model includes a flow-weighted dual blood input function that accounts for the tracer delivery to the liver via both the hepatic artery and the portal vein. The radioactivity concentration in the hepatic artery corresponded to the image-derived TACs from the ROI in the heart-blood pool divided by V_{heart} , while the concentration in the portal vein was mathematically estimated from the arterial blood concentration and the liver and intestine TACs during the modeling process [36]. The final dual-input concentration was calculated as the flow-weighted input concentrations of hepatic artery and portal vein using a hepatic arterial flow fraction of 0.17 [38].

2.7. Assessment of Liver Perfusion with Doppler Ultrasound

The impact of inhibitors on the hepatic blood flow was assessed using Doppler ultrasound imaging (US). Flow measurements were performed in three hepatic vessels (portal vein, hepatic vein and hepatic artery). Rats were anesthetized with isoflurane (3.5% and 1.5–2% in oxygen for induction and maintenance, respectively) and Doppler US imaging was performed by using an ultrafast ultrasound device (Aixplorer Ultimate®, V12.3, Supersonic Imagine). The US probe (SLH20-6®, Supersonic Imagine) was positioned on the shaved abdomen of each rat. Flow in the three vessels was measured before (= baseline) and 5 min after injection of maximal dose of the tested inhibitors to allow for paired measurements, without moving the US probe, over a limited time period. Therefore, all three inhibitors, including DTZ, had to be injected i.v. to enable rapid detection of drug-induced changes in blood flow within a single session. RIF was administered 40 mg/kg i.v. ($n = 4$) and CsA was administered 5 mg/kg i.v. ($n = 4$). For DTZ, it was not technically possible to match the conditions used for [^{99m}Tc]mebrofenin scintigraphy and wait for 60 min after s.c. administration. Intravenous injection of 40 mg/kg dose of DTZ was lethal ($n = 3$). DTZ was therefore administered at the maximal i.v. dose reported in the literature in rats (3 mg/kg i.v.; $n = 4$) [39]. Blood flow in each vessel was estimated from the flow speed measured in Doppler, normalized to the size of each vessel.

2.8. Statistical Analysis

[^{99m}Tc]mebrofenin scintigraphy data are reported as mean ± standard deviation (SD). Differences between multiple groups were analyzed by one-way ANOVA followed by a Bonferroni multiple-comparison test and between two groups (Doppler US measurements) with a paired *t*-test. The level of statistical significance was set to a *p* value of less than 0.05.

3. Results

3.1. In Vitro Inhibition Assays

The calcein-AM assay was performed to compare the MRP2 inhibitory potency of selected compounds in vitro (Figure 2). Full MRP2 inhibition was achieved only using high concentrations of RIF (>500 μM). The IC₅₀ of RIF was 210 μM (95% confidence interval: 175–254 μM). The IC₅₀ for DTZ and CsA was 4.4 μM (95% confidence interval: 1.7–10.4 μM) and 1.7 μM (95% confidence interval: 1.0–2.7 μM), respectively, suggesting a higher MRP2-inhibition potency. CsA appeared to be the most potent MRP2 inhibitor with the lowest IC₅₀. Concentrations of CsA > 30 μM could not be tested due to cell toxicity.

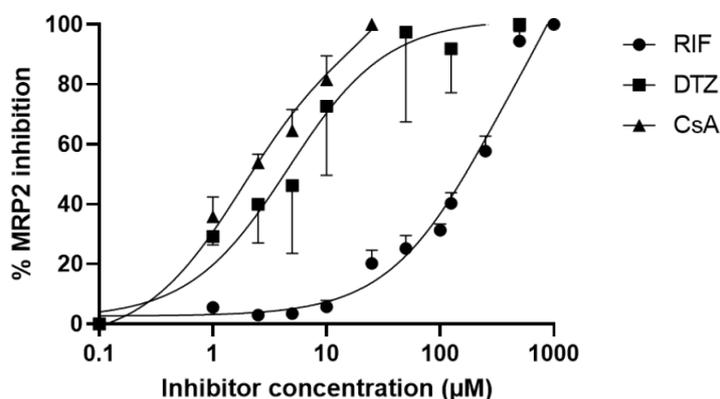


Figure 2. In vitro inhibition of MRP2 activity by rifampicin (RIF), diltiazem (DTZ) and cyclosporin (CsA). MRP2 activity was assessed with the calcein-AM efflux assay using MDCK-II-MRP2 cells incubated with increasing concentrations of tested inhibitors. Data are mean ± S.D. (*n* = 4) and lines show the nonlinear regression fit.

3.2. Impact of Inhibitors on the Kinetics of [^{99m}Tc]mebrofenin In Vivo

[^{99m}Tc]mebrofenin kinetics were first measured after treatment with the well-characterized OATP/MRP2 inhibitor RIF. Figure 3 shows representative planar images obtained in a control rat and a RIF-treated rat. Under control conditions, [^{99m}Tc]mebrofenin was rapidly transferred to the liver within seconds and then gradually moved to the intestine. The liver uptake of [^{99m}Tc]mebrofenin was markedly reduced by RIF with less radioactivity in the intestine at later time points.

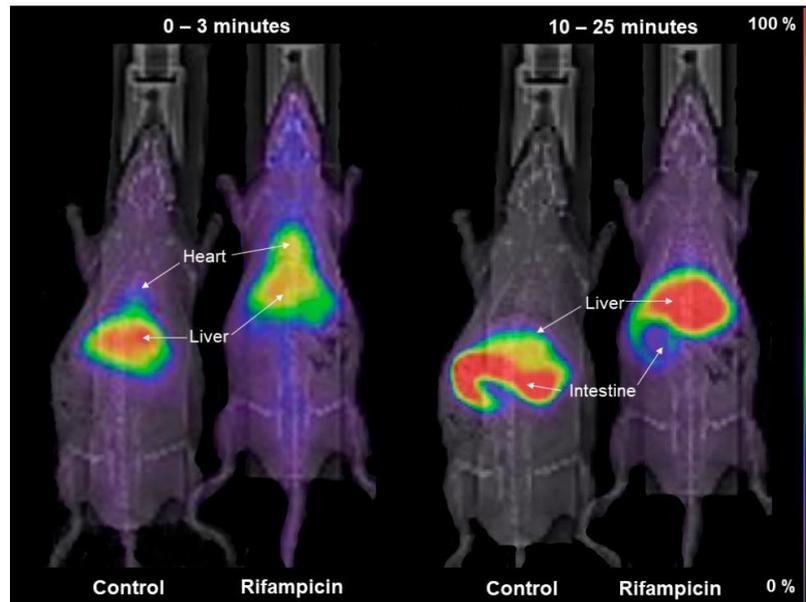


Figure 3. Representative planar scintigraphy images of the distribution of [^{99m}Tc]mebrofenin in a control and RIF-treated rat (40 mg/kg i.v.). Shown are summed frames from 0 to 3 min (to depict hepatic uptake) and summed frames from 10 to 25 min (to depict biliary excretion).

Figure 4 shows the mean TACs obtained for each tested condition. Descriptive pharmacokinetic data are reported in Table 1. Unlike RIF, DTZ and CsA increased the liver $\text{AUC}_{0-30\text{min}}$ (with a maximum of +51% for 1 mg/kg CsA) while decreasing $\text{AUC}_{0-30\text{min}}$ in the intestine (from -23% to -47% with 0.01 and 0.1 mg/kg CsA, respectively). $X_{\text{max,liver}}$ was significantly increased by the lowest dose of CsA (0.01 mg/kg) only and $T_{\text{max,liver}}$ was significantly delayed by CsA in a dose-dependent manner (+4.8 min with CsA 5 mg/kg). $\text{AUC}_{\text{blood}}$ showed a pronounced dose-dependent increase after CsA, suggesting lower plasma clearance. Radioactivity in the intestine was significantly decreased in all tested conditions except for the lowest dose of CsA (0.01 mg/kg, Table 1).

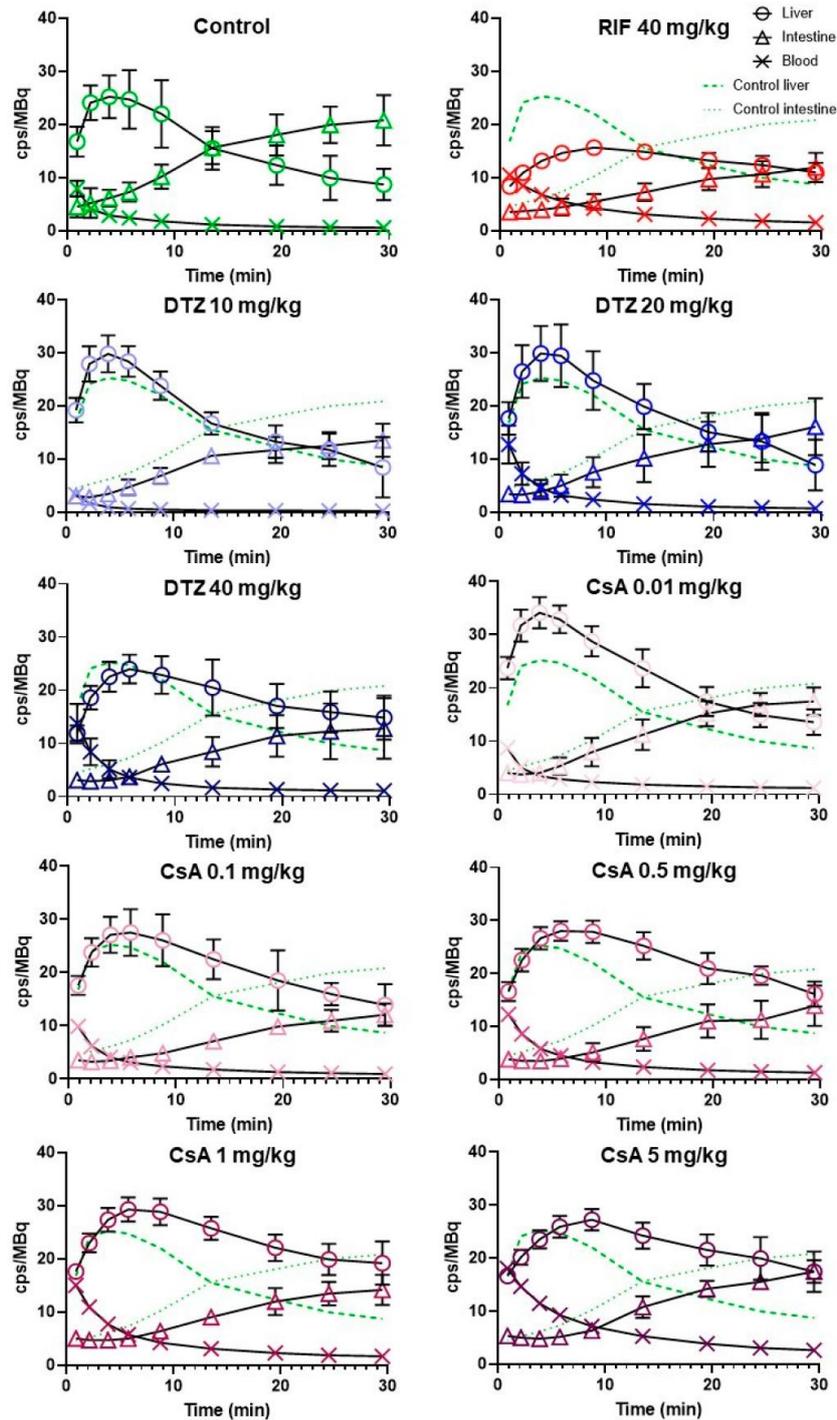


Figure 4. Mean (\pm SD) time-activity curves in the liver, intestine and blood for control animals and animals treated by rifampicin (RIF), diltiazem (DTZ) or cyclosporin A (CsA) with $n = 5$ for control, RIF, DTZ 10 mg/kg, DTZ 20 mg/kg, DTZ 40 mg/kg, CsA 0.1 mg/kg groups and $n = 6$ for CsA 0.01 mg/kg, CsA 0.1 mg/kg, CsA 0.5 mg/kg, CsA 1 mg/kg, CsA 5 mg/kg groups. Activity is expressed as the number of counts per second (cps) normalized to the injected dose (MBq).

Table 1. Descriptive pharmacokinetic parameters of [^{99m}Tc]mebrofenin under each tested condition.

Group	AUC _{0-30min} Blood ([cps/MBq].min)	AUC _{0-30min} Liver ([cps/MBq].min)	X _{max} Liver (cps/MBq)	T _{max} Liver (min)	AUC _{0-30min} Intestine ([cps/MBq].min)
Control (n = 5)	51 ± 14	461 ± 109	26.5 ± 5.1	4.3 ± 1.7	424 ± 85
RIF (n = 5)	109 ± 12 *	385 ± 28	16.0 ± 0.9 *	9.6 ± 0.8 *	223 ± 54 *
DTZ 10mg/kg (n = 5)	47 ± 4	520 ± 61	30.1 ± 3.2	4.3 ± 0.7	271 ± 30 *
DTZ 20mg/kg (n = 5)	72 ± 23	562 ± 96	31.1 ± 5.8	5.4 ± 1.6	286 ± 102 *
DTZ 40mg/kg (n = 5)	84 ± 30 *	543 ± 95	24.3 ± 3.0	6.4 ± 0.8	238 ± 76 *
CsA 0.01mg/kg (n = 6)	71 ± 9	660 ± 61 *	34.6 ± 3.0 *	4.0 ± 0.6	327 ± 61
CsA 0.1mg/kg (n = 5)	72 ± 11	601 ± 105 *	27.9 ± 4.0	5.7 ± 1.9	223 ± 26 *
CsA 0.5mg/kg (n = 6)	97 ± 9 *	668 ± 48 *	28.9 ± 2.1	7.6 ± 2.1 *	239 ± 64 *
CsA 1mg/kg (n = 6)	124 ± 9 *	695 ± 40 *	29.9 ± 2.5	7.4 ± 1.3 *	275 ± 38 *
CsA 5mg/kg (n = 6)	188 ± 18 *	648 ± 66 *	27.6 ± 2.1	9.1 ± 1.3 *	314 ± 30 *

Data are given as mean ± SD (n = 5 for control, RIF, DTZ 10 mg/kg, DTZ 20 mg/kg, DTZ 40 mg/kg, CsA 0.1 mg/kg groups and n = 6 for CsA 0.01 mg/kg, CsA 0.5 mg/kg, CsA 1 mg/kg, CsA 5 mg/kg groups). Asterisk (*) indicates significant differences (p < 0.05) in animals treated by rifampicin (RIF), diltiazem (DTZ) or cyclosporin A (CsA) compared with the control group (one-way ANOVA with a Bonferroni multiple-comparison test).

The liver uptake of [^{99m}Tc]mebrofenin was estimated by AUCR_{liver/blood} from 0 to 3 min (early uptake phase, Figure 5). Compared to the control group (AUCR_{liver/blood} = 2.95 ± 0.47) there was a dose-dependent decrease in liver uptake with increasing doses of DTZ and CsA. The highest doses of DTZ and CsA induced an approximately 3-fold decrease in AUCR_{liver/blood}, reaching similar levels as in RIF-treated animals. The lowest doses of DTZ and CsA (10 mg/kg and 0.01 mg/kg, respectively) did not affect the initial liver uptake of [^{99m}Tc]mebrofenin. Biliary excretion was estimated by calculating AUCR_{intestine/liver}. A time-frame from 10 to 25 min was selected for this analysis, which corresponds to the elimination phase observed in the TACs under all tested conditions. AUCR_{intestine/liver} was significantly decreased in all tested conditions compared with the control group (Figure 5). Differences between tested conditions were not significant. Nevertheless, CsA appeared to be more potent than DTZ in decreasing AUCR_{intestine/liver}.

The urinary bladder could be observed on the [^{99m}Tc]mebrofenin images with higher signals in animals which received the highest doses of the inhibitors. However, CL_{urine} values were not significantly different among all tested conditions (Figure 5).

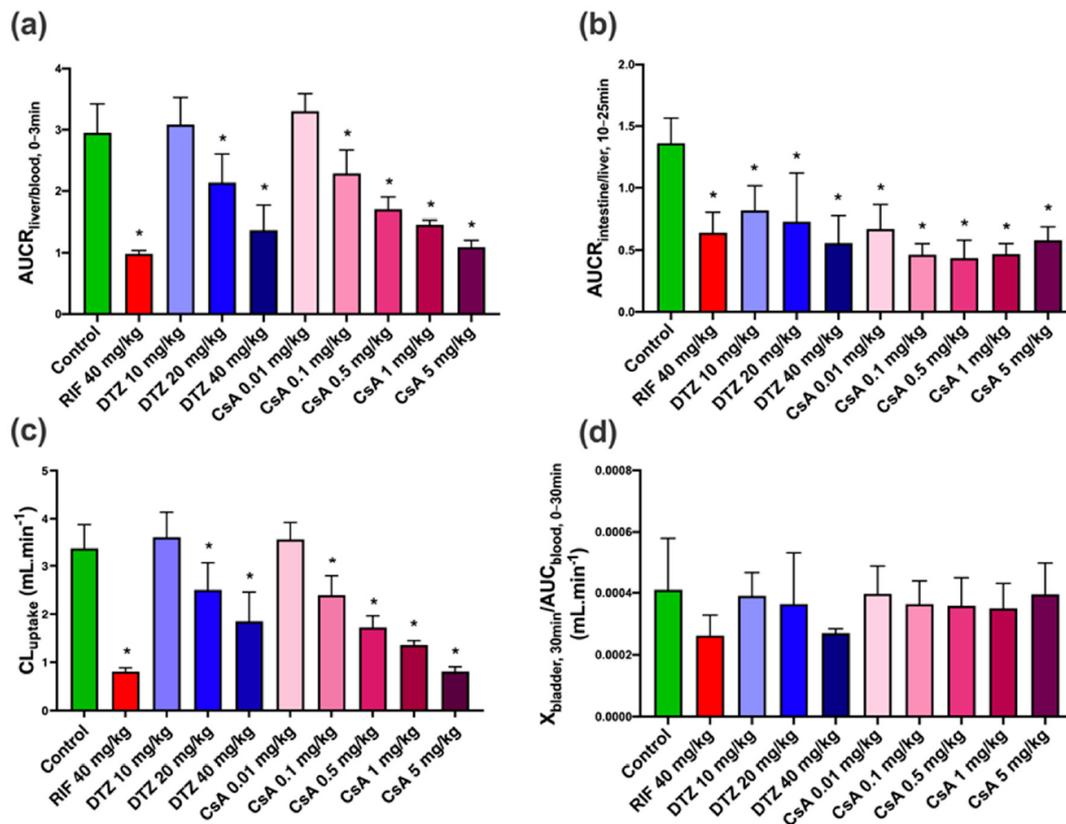


Figure 5. Mean descriptive pharmacokinetic parameters for control animals and animals treated by rifampicin (RIF), diltiazem (DTZ) and cyclosporin A (CsA). (a) $AUCR_{liver/blood, 0-3min}$ (indicative of uptake of $[^{99m}Tc]$ mebrofenin from blood into liver), (b) $AUCR_{intestine/liver, 10-25min}$ (indicative of excretion of $[^{99m}Tc]$ mebrofenin from the liver into the intestine), (c) CL_{uptake} values calculated from the integration plot analysis and (d) $X_{bladder, 30min} / AUC_{blood, 0-30min}$ (corresponding to CL_{urine}). Data are means with error bars representing SD ($n = 5$ for control, RIF, DTZ 10 mg/kg, DTZ 20 mg/kg, DTZ 40 mg/kg, CsA 0.1 mg/kg groups and $n = 6$ for CsA 0.01 mg/kg, CsA 0.5 mg/kg, CsA 1 mg/kg, CsA 5 mg/kg groups). *, $p < 0.05$ compared to control, one-way ANOVA with a Bonferroni multiple-comparison test.

3.3. Pharmacokinetic Modeling

The liver uptake of $[^{99m}Tc]$ mebrofenin was also estimated with integration plot analysis [33,35] (Figure S2). Compared to the control group ($CL_{uptake} = 3.38 \pm 0.49 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), the potent OATP inhibitor RIF significantly decreased the liver uptake ($CL_{uptake} = 0.81 \pm 0.08 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) (Figure 5). A dose-dependent decrease in CL_{uptake} was observed with increasing doses of DTZ and CsA. The maximal decrease was observed with 5 mg/kg CsA, reaching similar levels as in RIF-treated animals ($CL_{uptake} = 0.81 \pm 0.10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). The highest dose of DTZ only partially reduced CL_{uptake} ($1.85 \pm 0.60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ for 40 mg/kg DTZ). The lowest dose of DTZ (10 mg/kg) and CsA (0.01 mg/kg) did not decrease CL_{uptake} , suggesting a negligible impact on the liver extraction of $[^{99m}Tc]$ mebrofenin. The initial distribution volume in the liver (V_E) was similar across all tested conditions ($V_E = 1.64 \pm 0.38 \text{ mL}$) (Figure S2).

We used a previously developed four-compartment PK model which provided good fits (Figure S3) for both the liver and the intestine ROI. Precision of the obtained parameters was acceptable (low percentage coefficient of variation, %CV) in almost all the analyzed subjects (Table S1). Compartmental kinetic modeling showed that the transfer rate constant of $[^{99m}Tc]$ mebrofenin from blood into hepatocytes k_1 (Figure S1) was significantly decreased by RIF ($k_1 = 0.89 \pm 0.09 \text{ min}^{-1}$) and, to a lesser extent, by the highest doses of DTZ ($k_1 = 2.76 \pm 0.89 \text{ min}^{-1}$) and CsA ($k_1 = 2.82 \pm 0.86 \text{ min}^{-1}$)

as compared with the control group ($k_1 = 7.37 \pm 1.62 \text{ min}^{-1}$) (Figure 6). A dose-dependent decrease in k_1 was observed with increasing doses of DTZ and CsA, with no effect observed for 10 mg/kg DTZ and 0.01 mg/kg CsA. The backflux of [^{99m}Tc]mebrofenin from hepatocytes into blood k_2 (Figure S1) was dose-dependently decreased by DTZ and CsA (Figure 6). k_2 was not decreased by the lowest dose of DTZ and CsA. The transfer of [^{99m}Tc]mebrofenin from the hepatocyte into the intrahepatic bile ducts k_3 (Figure S1), which reflected MRP2-mediated excretion, was significantly decreased in all tested groups to a similar extent (Figure 6) except for animals receiving 5 mg/kg CsA, for whom a high variability in k_3 was observed ($k_3 = 0.15 \pm 0.08 \text{ min}^{-1}$). Statistically significant differences remained the same for k_2 and k_3 after excluding outlier data. However, the significance is lost in some of the groups when removing the outlier value for k_3 (0.29 min^{-1}) in the control group. In this situation, only the 20 mg/kg DTZ, and all the CsA groups except the 5 mg/kg group show a significant decrease in the k_3 value as compared to the control group. No differences between groups could be observed in the k_5 parameter, which describes the transfer of [^{99m}Tc]mebrofenin from the intrahepatic bile ducts into the intestine (Figure 6).

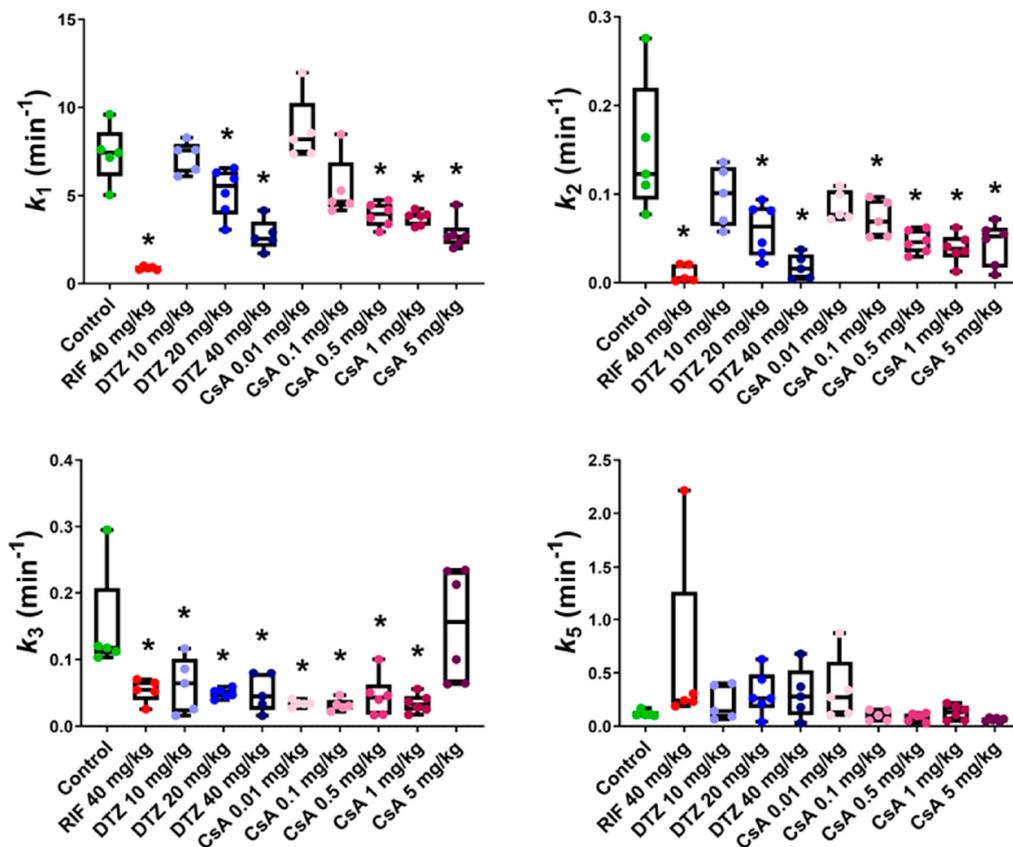


Figure 6. Outcome parameters for [^{99m}Tc]mebrofenin hepatobiliary distribution obtained with the four-compartment pharmacokinetic model for control animals and animals treated by rifampicin (RIF), diltiazem (DTZ) and cyclosporin A (CsA). k_1 represents the transfer of [^{99m}Tc]mebrofenin from blood into the hepatocytes, k_2 the backflux of [^{99m}Tc]mebrofenin from the hepatocytes into blood, k_3 the transfer from the hepatocytes into the intrahepatic bile ducts and k_5 from the intrahepatic bile duct to the intestine ($n = 5$ for control, RIF, DTZ 10 mg/kg, DTZ 20 mg/kg, DTZ 40 mg/kg, CsA 0.1 mg/kg groups and $n = 6$ for CsA 0.01 mg/kg, CsA 0.5 mg/kg, CsA 1 mg/kg, CsA 5 mg/kg groups). *, $p < 0.05$ compared to control, one-way ANOVA with a Bonferroni multiple-comparison test.

3.4. Assessment of Liver Perfusion with Doppler Ultrasound

Individual blood flow values measured in three hepatic vessels in rats before and after the i.v. injection of each inhibitor (40 mg/kg RIF, 3 mg/kg DTZ, 5 mg/kg CsA) are shown in Figure 7. Higher doses of DTZ than 3 mg/kg could not be tested due to poor tolerance. None of the tested inhibitors affected the hepatic vein blood flow. A significant decrease in the portal vein blood flow was observed after injection of RIF and DTZ. Moreover, a significant decrease in the hepatic artery blood flow was observed after injection of DTZ. CsA did not affect the blood flow in any hepatic vessel (Figure 7).

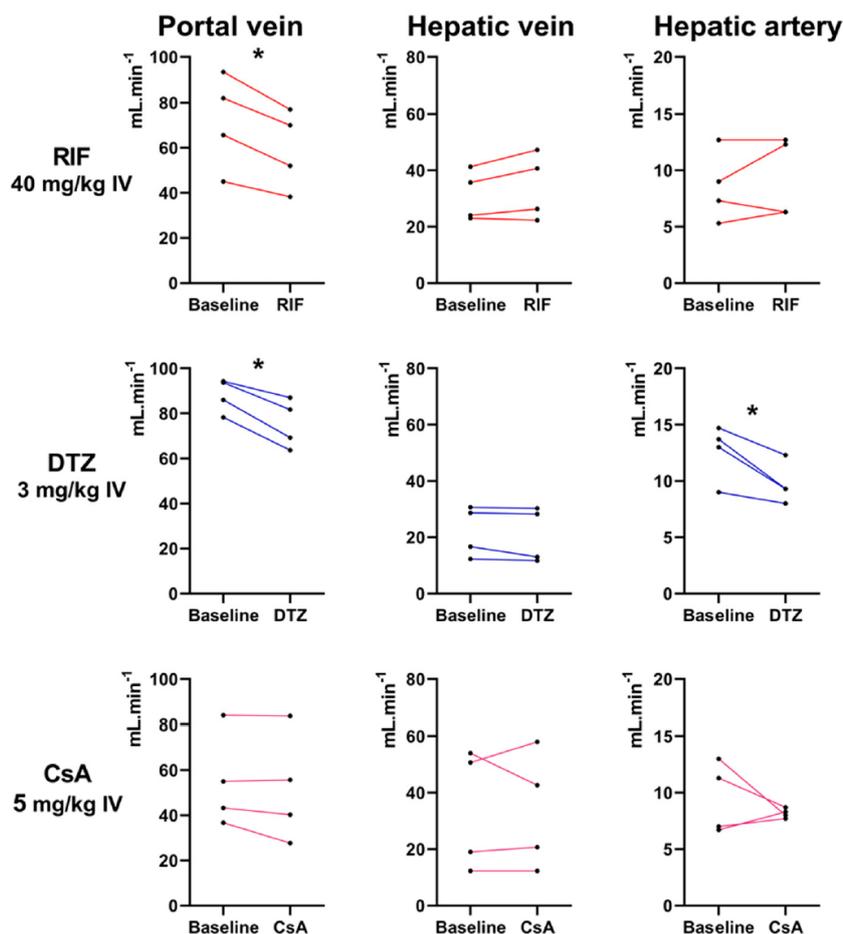


Figure 7. Blood flow (mL/min) of the portal vein, hepatic vein and hepatic artery measured with Doppler ultrasound in 4 rats before and after injection of rifampicin (RIF), diltiazem (DTZ) and cyclosporin A (CsA), respectively. *, $p < 0.05$, paired t -test.

4. Discussion

Hepatocyte transporters play a key role in the hepatobiliary clearance of many endogenous and exogenous compounds. Efforts are being made to develop imaging protocols for selective determination of the respective importance of each transporter system in vivo [40]. Several small-molecule probes for Positron Emission Tomography (PET) have been proposed to study OATP transporter activity and to assess the interplay between sinusoidal uptake and canalicular efflux in vivo [13,19,40]. However, imaging protocols for selective determination of MRP2 activity at the canalicular interface are currently not available. The availability of such an imaging protocol would

be of high interest to predict MRP2-mediated DILI in drug development [41] and to study the effect of genetic polymorphisms or liver disease on hepatic MRP2 activity [42].

In vitro, [^{99m}Tc]mebrofenin is predominantly transported by sinusoidal OATP1B1 and OATP1B3 and by the efflux transporters MRP2 and MRP3 [17,19,20,22] (Figure 1). In vivo studies using either OATP- or MRP2-deficient mice provided evidence for the transport of [^{99m}Tc]mebrofenin by these transporters [30]. RIF is recommended as a prototypical OATP transporter inhibitor to investigate OATP-mediated drug–drug interactions in clinical pharmacokinetic studies [5,43]. RIF has also been used to characterize different OATP-imaging probes in animals and humans [19]. However, our rat data confirmed previous results obtained in mice showing that RIF inhibited both the OATP-mediated uptake and the MRP2-mediated biliary excretion of [^{99m}Tc]mebrofenin [30]. Neyt and colleagues have tested the impact of RIF on the liver kinetics of [^{99m}Tc]mebrofenin in mice [30]. The lowest tested dose (12.5 mg/kg i.v. followed by 3.12 mg/kg intraperitoneal) did not impact the liver uptake of [^{99m}Tc]mebrofenin, but only moderate inhibition of biliary excretion was observed (−25% in AUCR_{bile/liver}). Higher doses of RIF inhibited both the OATP-mediated uptake (AUCR_{liver/blood}) and the biliary excretion (−94% in AUCR_{bile/liver}). Of note, liver kinetics of [^{99m}Tc]mebrofenin in RIF-treated mice did not resemble those obtained in MRP2 deficient mice [30], suggesting that RIF inhibits liver OATPs and MRP2 to a similar extent. DTZ is a potent inhibitor in vitro of MRP2 [8], but not of OATP1B1 and OATP1B3 [28]. CsA is a potent MRP2 inhibitor [8] but is also known to inhibit OATPs in vitro [28]. We hypothesized that CsA may show substantially different potency to inhibit MRP2 versus OATP in vivo [21,28]. Our in vitro data (Figure 2) showed that the potency of DTZ and CsA to inhibit MRP2 was much higher than that of RIF.

Both DTZ and CsA induced a dose-dependent decrease in the liver uptake of [^{99m}Tc]mebrofenin. However, the lowest tested doses of DTZ (10 mg/kg) and CsA (0.01 mg/kg) did not impact the liver uptake of [^{99m}Tc]mebrofenin, estimated as AUCR_{liver/blood}, CL_{uptake} or k_1 , suggesting that these doses did not affect liver OATP activity in vivo. All tested doses of DTZ and CsA inhibited biliary excretion (estimated as AUCR_{intestine/liver} or k_3) to a similar extent, although DTZ appeared slightly less efficient than RIF and CsA.

DTZ is a calcium channel blocker and we hypothesized that the decrease in the liver uptake of [^{99m}Tc]mebrofenin induced by high-dose DTZ may reflect its impact on hepatic blood flow [36]. For technical reasons, it was not possible to test the impact of DTZ 40 mg/kg s.c. on liver perfusion. However, DTZ (3 mg/kg i.v.) was shown to induce a modest but significant decrease in blood flow in both the portal vein and hepatic artery (Figure 7). In contrast, the highest dose of CsA (5 mg/kg i.v.) did not impact the blood flow in any hepatic vessel, suggesting that the effects of CsA on hepatic [^{99m}Tc]mebrofenin kinetics reflected changes in transporter activity rather than changes in liver perfusion. We showed that high-dose RIF significantly reduced the blood flow in the portal vein, which is not likely to occur at the doses used in clinical studies (approximately 9 mg/kg) [44,45]. However, it cannot be excluded that changes in portal perfusion induced by high-dose RIF may have influenced to some extent the liver kinetics of [^{99m}Tc]mebrofenin in our experiments.

Different clinical imaging modalities have been used to study liver transporter activity in vivo, including magnetic resonance imaging, PET and gamma-scintigraphy [19]. In contrast to PET radioligands, [^{99m}Tc]mebrofenin is readily available at most nuclear medicine departments. [^{99m}Tc]mebrofenin imaging protocols typically involve dynamic planar acquisition for semi-quantitative estimation of the transfer of radioactivity between tissues [46]. We mimicked these clinical protocols in our set-up, which enabled us to perform compartmental pharmacokinetic modeling with our data. Results obtained for inhibitor-induced changes in the influx and efflux rate constants (k_1 and k_3) were consistent with results obtained for AUCR or CL_{uptake}. However, compartmental modeling provided additional information suggesting that the backflux (k_2) from the liver into the blood may influence the liver kinetics of [^{99m}Tc]mebrofenin. This could be due to transport of [^{99m}Tc]mebrofenin by the sinusoidal efflux transporter MRP3 [17] (Figure 1), consistent with the in vitro potency of RIF and CsA to inhibit MRP3 [29,31], although the impact of DTZ on MRP3 has not been reported to our knowledge. Inhibitors dose-dependently decreased k_2 , which

suggests that the effects of high-dose RIF, DTZ and CsA may not only be restricted to OATP and MRP2 inhibition [8].

Dynamic in vivo data using a metabolically stable probe offers the possibility to investigate the pharmacokinetic impact of targeted MRP2 inhibition [47]. Interestingly, selective inhibition of the biliary excretion did not affect plasma exposure while increasing liver exposure (Table 1). This observation is consistent with the kinetics of [^{99m}Tc]mebrofenin obtained in MRP2-deficient mice [30]. This suggests that MRP2 activity is not a rate-limiting factor for the plasma clearance of this prototypical OATP/MRP2 substrate. MRP2 inhibition may thus drastically affect the liver exposure of MRP2 substrates with negligible impact on plasma kinetics, in agreement with the extended clearance concept [48]. Compared with non-treated rats ($AUCR_{\text{intestine/liver}} = 1.36 \pm 0.20$), the decrease in biliary excretion obtained using low-dose CsA ($AUCR_{\text{intestine/liver}} = 0.67 \pm 0.19$) was nearly maximal because higher doses and other tested MRP2 inhibitors did not further decrease it. It is noteworthy that the baseline biliary excretion of [^{99m}Tc]mebrofenin reported in mice was much higher (calculated $AUCR_{\text{bile/liver}} \sim 28$) [30]. The impact of MRP2-deficiency was consistently much more pronounced, with a ~10-fold decrease in $AUCR_{\text{bile/liver}}$ [30]. This observation suggests a species difference in the importance of MRP2 in controlling the biliary excretion of [^{99m}Tc]mebrofenin between rats and mice. In rats, tested inhibitors did not influence the urinary clearance of [^{99m}Tc]mebrofenin, thus supporting the assumption that urinary elimination of [^{99m}Tc]mebrofenin does not involve carrier-mediated transport [17].

Clinical validation of in vivo inhibitors of membrane transporters is a cornerstone for translational pharmacokinetics [49–51]. In this framework, imaging techniques are useful to address the specificity and efficacy of compounds to inhibit drug transporters at certain biological interfaces. DTZ doses used to achieve selective MRP2 inhibition in the liver (10 mg/kg s.c.) were much higher than those clinically used in humans (0.3 mg/kg i.v.) and may additionally alter hepatic blood flow. In contrast, low-dose CsA (0.01 mg/kg), validated in this work, represents a much lower dose than clinical immunosuppressant doses of CsA (up to 15 mg/kg/day) and offers a readily available, simple and safe strategy to inhibit the MRP2-mediated biliary efflux of [^{99m}Tc]mebrofenin. Thus, low-dose CsA may be useful both for a selective determination of MRP2 activity and for an improved measurement of OATP activity. Low-dose CsA therefore enriches the toolbox of available inhibitors for pharmacokinetic studies [41].

From a nuclear medicine perspective, our data suggest that patients undergoing treatment with CsA may show substantial inhibition of the biliary excretion of [^{99m}Tc]mebrofenin, which may confound the estimation of biliary transporter activity for diagnostic purposes. On the other hand, low-dose CsA may be useful to enhance and prolong the [^{99m}Tc]mebrofenin signal in the liver and preferentially study the hepatic uptake activity rather than biliary excretion as a clinical index of liver function in patients.

5. Conclusions

This work shows for the first time that targeted inhibition of MRP2 activity with negligible impact on OATP activity in hepatocytes can be achieved in vivo. [^{99m}Tc]mebrofenin in combination with low-dose CsA provides a novel substrate/inhibitor pair to discriminate the canalicular transport capacity from the OATP-mediated uptake in vivo. Clinical studies are warranted to validate this protocol in humans and untangle the intrinsic role of OATP and MRP2 activity in different pathophysiological states and address consequences for PK and liver exposure.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/1999-4923/12/6/486/s1, Figure S1: Four-compartment pharmacokinetic model: k_1 and k_2 describe the transfer of [^{99m}Tc]mebrofenin between blood and hepatocytes, k_3 from hepatocytes into the intrahepatic bile ducts and k_5 from the intrahepatic bile ducts to the intestine. ROI means Region of Interest, eBD means Extrahepatic bile duct. Figure S2: Integration plots for all investigated groups to estimate the uptake clearance of [^{99m}Tc]mebrofenin from blood into the liver for control animals and animals treated by rifampicin (RIF), diltiazem (DTZ) and cyclosporin A (CsA). CL_{uptake} and V_e correspond to the slope of the linear regression line and the Y-interception respectively, Figure S3: Time activity curves (cps: counts per second) of observed and fitted data in one representative subject of each study group for

control animals and animals treated by rifampicin (RIF), diltiazem (DTZ) and cyclosporin A (CsA), Table S1: Pharmacokinetic parameters obtained with the four-compartment model for the different study groups.

Author Contributions: Conceptualization, S.M. and N.T.; Methodology, S.M., N.T., I.H.-L., A.N. and J.-L.G.; Validation, N.T., O.L. and J.-L.G.; Formal Analysis, S.M., I.H.-L. and A.N.; Investigation, S.M., L.B., W.S., C.T. and A.N.; Resources, C.T. and N.T.; Data Curation, N.T.; Writing—Original Draft Preparation, S.M., N.T. and I.H.-L.; Writing—Review & Editing, S.M., N.T., O.L., I.H.-L., W.S., C.T., J.-L.G. and A.N. and; Supervision, N.T.; Project Administration, N.T.; Funding Acquisition, N.T.

Funding: This work was performed on a platform of *France Life Imaging* network partly funded by grant ANR-11-INBS-0006.

Acknowledgments: We thank Alfred Schinkel (The National Cancer Institute, NKI-AVL, The Netherlands) for providing MRP2-transfected cells and Mediam Pharma for providing kits to prepare [^{99m}Tc]mebrofenin. Maud Goislard provided helpful technical assistance for imaging experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Patel, M.; Taskar, K.; Zamek-Gliszczyński, M. Importance of hepatic transporters in clinical disposition of drugs and their metabolites. *J. Clin. Pharmacol.* **2016**, *56*, S23–S39, doi:10.1002/jcph.671.
- Marin, J. Plasma membrane transporters in modern liver pharmacology. *Scientifica* **2012**, *2012*, doi:10.6064/2012/428139.
- Giacomini, K.; Galetin, A.; Huang, S. The international transporter consortium: Summarizing advances in the role of transporters in drug development. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2018**, *104*, 766–771, doi:10.1002/cpt.1224.
- Evers, R.; Piquette-Miller, M.; Polli, J.; Russel, F.; Sprowl, J.A.; Tohyama, K.; Ware, J.; de Wildt, S.; Xie, W.; Brouwer, K. Disease-associated changes in drug transporters may impact the pharmacokinetics and/or toxicity of drugs: A white paper from the international transporter consortium. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2018**, *104*, 900–915, doi:10.1002/cpt.1115.
- Kalliokoski, A.; Niemi, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 693–705, doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00430.x.
- Zamek-Gliszczyński, M.; Taub, M.; Chothe, P.; Chu, X.; Giacomini, K.M.; Kim, R.; Ray, A.; Stocker, S.; Unadkat, J.; Wittwer, M.; et al. Transporters in drug development: 2018 ITC recommendations for transporters of emerging clinical importance. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2018**, *104*, 890–899, doi:10.1002/cpt.1112.
- Nishino, A.; Kato, Y.; Igarashi, T.; Sugiyama, Y. Both cMOAT/MRP2 and another unknown transporter(s) are responsible for the biliary excretion of glucuronide conjugate of the nonpeptide angiotensin II antagonist, telmisartan. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 1146–1148.
- Matsson, P.; Pedersen, J.; Norinder, U.; Bergström, C.; Artursson, P. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 1816–1831, doi:10.1007/s11095-009-9896-0.
- Pauli-Magnus, C.; Meier, P. Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis. *Hepatology* **2006**, *44*, 778–787, doi:10.1002/hep.21359.
- Thakkar, N.; Slizgi, J.; Brouwer, K. Effect of Liver disease on hepatic transporter expression and function. *J. Pharm. Sci.* **2017**, *106*, 2282–2294, doi:10.1016/j.xphs.2017.04.053.
- Bonnaventure, P.; Pastor, C. Quantification of drug transport function across the multiple resistance-associated protein 2 (Mrp2) in rat livers. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 135–147, doi:10.3390/ijms16010135.
- Ghibellini, G.; Leslie, E.; Brouwer, K. Methods to evaluate biliary excretion of drugs in humans: An updated review. *Mol. Pharm.* **2006**, *3*, 198–211, doi:10.1021/mp060011k.
- Hernández Lozano, I.; Langer, O. Use of imaging to assess the activity of hepatic transporters. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2020**, *16*, 149–164, doi:10.1080/17425255.2020.1718107.
- Tournier, N.; Stieger, B.; Langer, O. Imaging techniques to study drug transporter function in vivo. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *189*, 104–122, doi:10.1016/j.pharmthera.2018.04.006.
- Loberg, M.; Cooper, M.; Harvey, E.; Callery, P.; Faith, W. Development of new radiopharmaceuticals based on n-substitution of iminodiacetic acid. *J. Nucl. Med.* **1976**, *17*, 633–638.
- Krishnamurthy, S.; Krishnamurthy, G. Technetium-99m-iminodiacetic acid organic anions: Review of biokinetics and clinical application in hepatology. *Hepatology* **1989**, *9*, 139–153, doi:10.1002/hep.1840090123.

17. Ghibellini, G.; Leslie, E.; Pollack, G.; Brouwer, K. Use of Tc-99m mebrofenin as a clinical probe to assess altered hepatobiliary transport: Integration of in vitro, pharmacokinetic modeling, and simulation studies. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1851, doi:10.1007/s11095-008-9597-0.
18. Ryan, J.; Cooper, M.; Loberg, M.; Harvey, E.; Sikorski, S. Technetium-99m-Labeled N-(2,6-Dimethylphenylcarbamoylmethyl) Iminodiacetic Acid (Tc-99m HIDA): A new radiopharmaceutical for hepatobiliary imaging studies. *J. Nucl. Med.* **1977**, *18*, 997–1004.
19. Marie, S.; Cisternino, S.; Buvat, I.; Declèves, X.; Tournier, N. Imaging probes and modalities for the study of solute carrier O (SLCO)-transport function in vivo. *J. Pharm. Sci.* **2017**, *106*, 2335–2344, doi:10.1016/j.xphs.2017.04.031.
20. de Graaf, W.; Häusler, S.; Heger, M.; van Ginhoven, T.; van Cappellen, G.; Bennink, R.; Kullak-Ublick, G.; Hesselmann, R.; van Gulik, T.; Stieger, B. Transporters involved in the hepatic uptake of 99mTc-mebrofenin and indocyanine green. *J. Hepatol.* **2011**, *54*, 738–745, doi:10.1016/j.jhep.2010.07.047.
21. Bhargava, K.; Joseph, B.; Ananthanarayanan, M.; Balasubramaniyan, N.; Tronco, G.; Palestro, C.; Gupta, S. Adenosine triphosphate-binding cassette subfamily c member 2 is the major transporter of the hepatobiliary imaging agent 99mTc-mebrofenin. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 1140–1146, doi:10.2967/jnumed.109.062448.
22. Hendrikse, N.; Kuipers, F.; Meijer, C.; Havinga, R.; Bijleveld, C.; van der Graaf, W.; Vaalburg, W.; de Vries, E. In vivo imaging of hepatobiliary transport function mediated by multidrug resistance associated protein and P-glycoprotein. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2004**, *54*, 131–138, doi:10.1007/s00280-004-0793-2.
23. Hendrikse, N.H.; Franssen, E.J.F.; van der Graaf, W.T.A.; Vaalburg, W.; de Vries, E.G.E. Visualization of multidrug resistance in vivo. *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, *26*, 283–293, doi:10.1007/s002590050390.
24. de Graaf, W.; Bennink, R.; Veteläinen, R.; van Gulik, T. Nuclear imaging techniques for the assessment of hepatic function in liver surgery and transplantation. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 742–752, doi:10.2967/jnumed.109.069435.
25. Kannan, P.; John, C.; Zoghbi, S.S.; Halldin, C.; Gottesman, M.M.; Innis, R.B.; Hall, M.D. Imaging the function of P-Glycoprotein with radiotracers: Pharmacokinetics and in vivo applications. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2009**, *86*, 368–377.
26. Wanek, T.; Kuntner, C.; Bankstahl, J.; Bankstahl, M.; Stanek, J.; Sauberer, M.; Mairinger, S.; Strommer, S.; Wacheck, V.; Löscher, W.; et al. A comparative small-animal PET evaluation of [11C]tariquidar, [11C]elacridar and (R)-[11C]verapamil for detection of P-glycoprotein-expressing murine breast cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*, 149–159, doi:10.1007/s00259-011-1941-7.
27. Kaneko, K.; Tanaka, M.; Ishii, A.; Katayama, Y.; Nakaoka, T.; Irie, S.; Kawahata, H.; Yamanaga, T.; Wada, Y.; Miyake, T.; et al. A clinical quantitative evaluation of hepatobiliary transport of [11C]Dehydropravastatin in humans using positron emission tomography. *Drug Metab. Dispos.* **2018**, *46*, 719–728, doi:10.1124/dmd.118.080408.
28. Karlgren, M.; Vildhede, A.; Norinder, U.; Wisniewski, J.; Kimoto, E.; Lai, Y.; Haglund, U.; Artursson, P. Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): Influence of protein expression on drug–drug interactions. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4740–4763, doi:10.1021/jm300212s.
29. Te Brake, L.; Russel, F.; van den Heuvel, J.; de Knegt, G.; de Steenwinkel, J.; Burger, D.; Aarnoutse, R.; Koenderink, J. Inhibitory potential of tuberculosis drugs on ATP-binding cassette drug transporters. *Tuberculosis* **2016**, *96*, 150–157, doi:10.1016/j.tube.2015.08.004.
30. Neyt, S.; Huisman, M.; Vanhove, C.; Man, H.; Vliegen, M.; Moerman, L.; Dumolyn, C.; Mannens, G.; Vos, F. In vivo visualization and quantification of (disturbed) oatp-mediated hepatic uptake and mrp2-mediated biliary excretion of 99mTc-mebrofenin in mice. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 624–630, doi:10.2967/jnumed.112.108233.
31. Köck, K.; Ferslew, B.; Netterberg, I.; Yang, K.; Urban, T.J.; Swaan, P.W.; Stewart, P.; Brouwer, K. Risk Factors for development of cholestatic drug-induced liver injury: Inhibition of hepatic basolateral bile acid transporters multidrug resistance-associated proteins 3 and 4. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 665–674, doi:10.1124/dmd.113.054304.
32. Wen, X.; Joy, M.; Aleksunes, L.M. In vitro transport activity and trafficking of MRP2/ABCC2 Polymorphic variants. *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 1637–1647, doi:10.1007/s11095-017-2160-0.
33. Amor, D.; Goutal, S.; Marie, S.; Caillé, F.; Bauer, M.; Langer, O.; Auvity, S.; Tournier, N. Impact of rifampicin-inhibitable transport on the liver distribution and tissue kinetics of erlotinib assessed with PET imaging in rats. *EJNMMI Res.* **2018**, *8*, 81, doi:10.1186/s13550-018-0434-0.

34. Yeung, P.; Alcos, A.; Tang, J.; Tsui, B. Pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in rats: Comparing single vs. repeated subcutaneous injections in vivo. *Biopharm. Drug Dispos.* **2007**, *28*, 403–407, doi:10.1002/bdd.568.
35. Takashima, T.; Kitamura, S.; Wada, Y.; Tanaka, M.; Shigihara, Y.; Ishii, H.; Ijuin, R.; Shiomi, S.; Nakae, T.; Watanabe, Y.; et al. PET imaging-based evaluation of hepatobiliary transport in humans with (15R)-11C-TIC-Me. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 741–748, doi:10.2967/jnumed.111.098681.
36. Hernández Lozano, I.; Karch, R.; Bauer, M.; Blaickner, M.; Matsuda, A.; Wulkersdorfer, B.; Hacker, M.; Zeitlinger, M.; Langer, O. Towards improved pharmacokinetic models for the analysis of transporter-mediated hepatic disposition of drug molecules with positron emission tomography. *AAPS J.* **2019**, *21*, 61, doi:10.1208/s12248-019-0323-0.
37. Ørntoft, N.; Munk, O.; Frisch, K.; Ott, P.; Keiding, S.; Sørensen, M. Hepatobiliary transport kinetics of the conjugated bile acid tracer 11C-CSar quantified in healthy humans and patients by positron emission tomography. *J. Hepatol.* **2017**, *67*, 321–327, doi:10.1016/j.jhep.2017.02.023.
38. Davies, B.; Morris, T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1093–1095, doi:10.1023/a:1018943613122.
39. Lee, Y.; Lee, M.; Shim, C. Pharmacokinetics of diltiazem and deacetyldiltiazem in rats. *Int. J. Pharm.* **1991**, *76*, 71–76, doi:10.1016/0378-5173(91)90345-O.
40. Kusuhara, H. Imaging in the study of membrane transporters. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2013**, *94*, 33–36, doi:10.1038/clpt.2013.85.
41. Kenna, J.; Waterton, J.; Baudy, A.; Galetin, A.; Hines, C.; Hockings, P.; Patel, M.; Scotcher, D.; Sourbron, S.; Ziemian, S.; et al. Noninvasive preclinical and clinical imaging of liver transporter function relevant to drug-induced liver injury. In *Drug-Induced Liver Toxicity*; Chen, M., Will, Y., Eds.; Methods in Pharmacology and Toxicology; Springer: New York, NY, USA, 2018; pp. 627–651, ISBN 978-1-4939-7677-5.
42. Woillard, J.; Debord, J.; Benz-de-Bretagne, I.; Saint-Marcoux, F.; Turlure, P.; Girault, S.; Abraham, J.; Choquet, S.; Marquet, P.; Barin-Le Guellec, C. A Time-dependent model describes methotrexate elimination and supports dynamic modification of MRP2/ABCC2 activity. *Ther. Drug Monit.* **2017**, *39*, 145–156, doi:10.1097/FTD.0000000000000381.
43. Giacomini, K.M.; Huang, S.-M.; Tweedie, D.J.; Benet, L.Z.; Brouwer, K.L.R.; Chu, X.; Dahlin, A.; Evers, R.; Fischer, V.; Hillgren, K.M.; et al. Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 215–236, doi:10.1038/nrd3028.
44. Tournier, N.; Saba, W.; Cisternino, S.; Peyronneau, M.; Damont, A.; Goutal, S.; Dubois, A.; Dollé, F.; Scherrmann, J.; Valette, H.; et al. Effects of selected OATP and/or ABC transporter inhibitors on the brain and whole-body distribution of glyburide. *AAPS J.* **2013**, *15*, 1082–1090, doi:10.1208/s12248-013-9514-2.
45. He, J.; Yu, Y.; Prasad, B.; Link, J.; Miyaoka, R.; Chen, X.; Unadkat, J. PET imaging of oatp-mediated hepatobiliary transport of [11C]rosuvastatin in the rat. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 2745–2754, doi:10.1021/mp500027c.
46. Doo, E.; Krishnamurthy, G.; Eklem, M.; Gilbert, S.; Brown, P. Quantification of hepatobiliary function as an integral part of imaging with technetium-99m-mebrofenin in health and disease. *J. Nucl. Med.* **1991**, *32*, 48–57.
47. König, J.; Müller, F.; Fromm, M. Transporters and drug-drug interactions: Important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 944–966, doi:10.1124/pr.113.007518.
48. Patilea-Vrana, G.; Unadkat, J. Transport vs. metabolism: What determines the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of drugs? Insights from the extended clearance model. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2016**, *100*, 413–418, doi:10.1002/cpt.437.
49. Muzi, M.; Mankoff, D.A.; Link, J.M.; Shoner, S.; Collier, A.C.; Sasongko, L.; Unadkat, J.D. Imaging of cyclosporine inhibition of P-Glycoprotein activity using 11C-verapamil in the brain: Studies of healthy humans. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 1267–1275, doi:10.2967/jnumed.108.059162.
50. Kreisl, W.; Boellaard, R.; Morse, C.; Woock, A.; Zoghbi, S.; Shetty, H.; Pike, V.; Innis, R. Increased permeability-glycoprotein inhibition at the human blood-brain barrier can be safely achieved by performing PET during peak plasma concentrations of tariquidar. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56*, 82–87, doi:10.2967/jnumed.114.146894.
51. Tournier, N.; Bauer, M.; Pichler, V.; Nics, L.; Klebermass, E.-M.; Bamminger, K.; Matzner, P.; Weber, M.; Karch, R.; Caille, F.; et al. Impact of P-glycoprotein function on the brain kinetics of the weak substrate 11C-metoclopramide assessed with PET imaging in humans. *J. Nucl. Med.* **2019**, *60*, 985–991, doi:10.2967/jnumed.118.219972.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Supplementary Materials: Validation of Pharmacological Protocols for Targeted Inhibition of Canalicular MRP2 Activity in Hepatocytes Using [^{99m}Tc]mebrofenin Imaging in Rats

Solène Marie, Irene Hernández-Lozano, Louise Breuil, Wadad Saba, Anthony Novell, Jean-Luc Gennisson, Oliver Langer, Charles Truillet And Nicolas Tournier

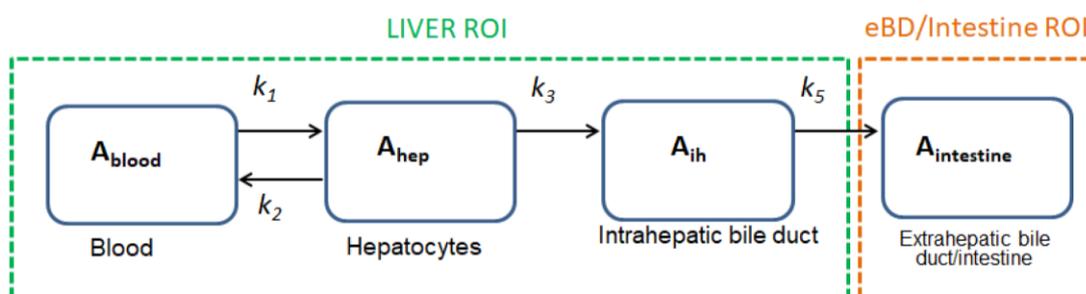


Figure S1. Four-compartment pharmacokinetic model. k_1 and k_2 describe the transfer of [^{99m}Tc]mebrofenin between blood and hepatocytes, k_3 from hepatocytes into the intrahepatic bile ducts and k_5 from the intrahepatic bile ducts to the intestine. ROI means Region of Interest, eBD means Extrahepatic bile duct.

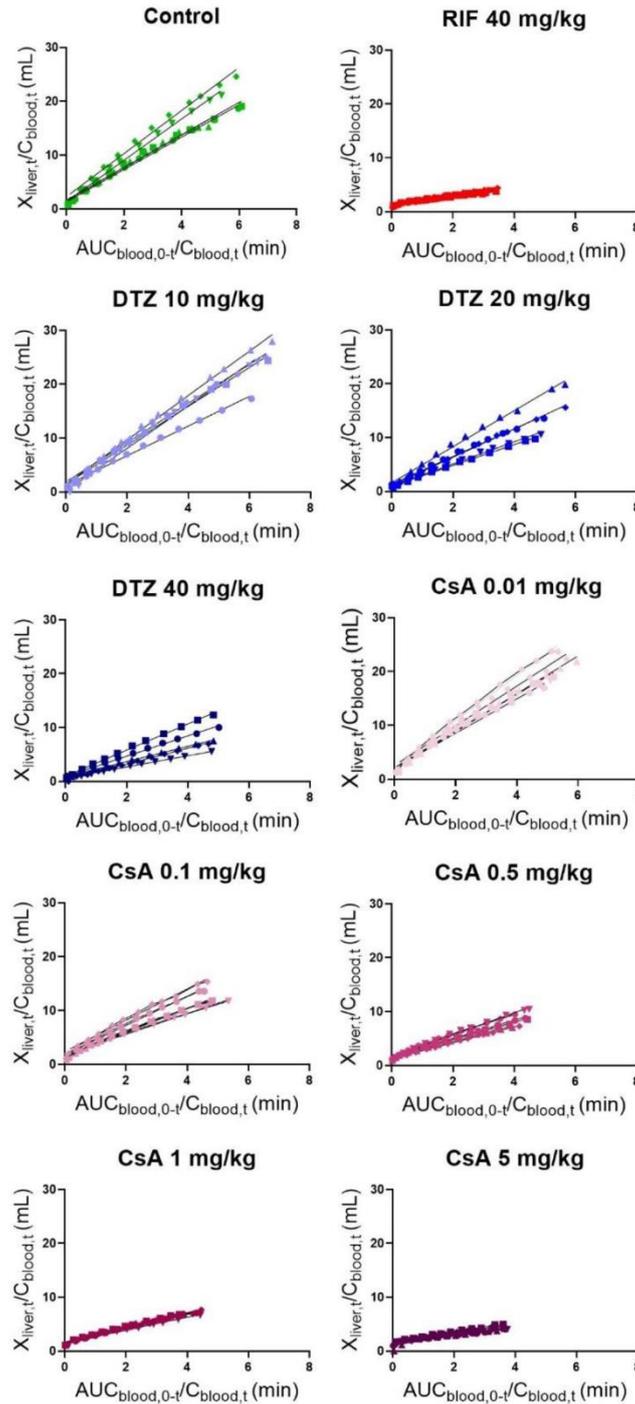


Figure S2. Integration plots for all investigated groups to estimate the uptake clearance of $[^{99m}\text{Tc}]$ mebrofenin from blood into the liver for control animals and animals treated by rifampicin (RIF), diltiazem (DTZ) and cyclosporin A (CsA). CL_{uptake} and V_E correspond to the slope of the linear regression line and the Y-interception respectively.

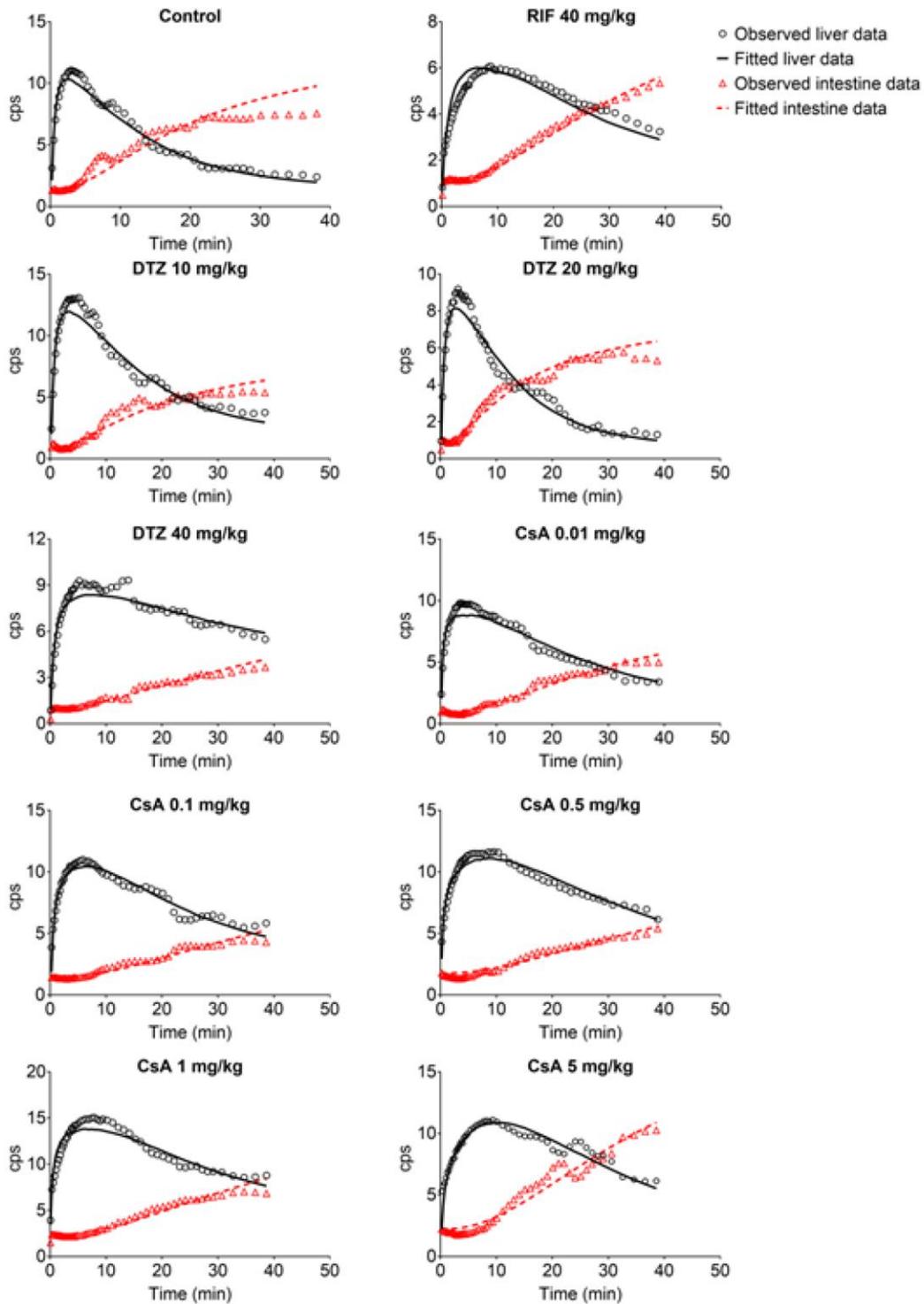


Figure S3. Time activity curves (cps: counts per second) of observed and fitted data in one representative subject of each study group for control animals and animals treated by rifampicin (RIF), diltiazem (DTZ) and cyclosporin A (CsA).

Table S1. Pharmacokinetic parameters obtained with the four-compartment model for the different study groups.

Group	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	k_3 (min ⁻¹)	k_5 (min ⁻¹)
Control	7.37 ± 1.62 (4.8 - 16.0)	0.15 ± 0.08 (7.2 - 30.8)	0.15 ± 0.08 (3.9 - 11.9)	0.12 ± 0.03 (2.4 - 12.5)
RIF (40mg/kg)	0.89 ± 0.09 * (3.6 - 7.6)	0.01 ± 0.01 * (28.7 - 125.7)	0.05 ± 0.02 * (2.4 - 12.7)	0.64 ± 0.88 (13.6 - 31.7)
DTZ (10 mg/kg)	7.20 ± 0.90 (2.7 - 10.2)	0.10 ± 0.04 (3.1 - 16.2)	0.06 ± 0.04 * (1.6 - 6.7)	0.22 ± 0.16 (4.1 - 15.9)
DTZ (20 mg/kg)	5.21 ± 1.35 * (2.4 - 9.8)	0.06 ± 0.03 * (3.6 - 25.8)	0.05 ± 0.01 * (1.3 - 29.1)	0.31 ± 0.20 (5.2 - 27.8)
DTZ (40 mg/kg)	2.76 ± 0.8 9* (2.6 - 10.2)	0.02 ± 0.01 * (6.1 - 74.2)	0.06 ± 0.03 * (1.9 - 10.9)	0.31 ± 0.24 (6.9 - 27.1)
CsA (0.01 mg/kg)	8.69 ± 1.90 (1.6 - 4.8)	0.09 ± 0.02 (3.1 - 7.9)	0.03 ± 0.01 * (1.6 - 7.8)	0.34 ± 0.31 (6.2 - 18.5)
CsA (0.1 mg/kg)	5.43 ± 1.75 (1.2 - 6.3)	0.07 ± 0.02 * (3.0 - 11.7)	0.03 ± 0.01 * (2.9 - 11.4)	0.10 ± 0.05 (6.7 - 13.6)
CsA (0.5 mg/kg)	3.90 ± 0.67 * (1.4 - 5.7)	0.05 ± 0.01 * (3.6 - 17.7)	0.05 ± 0.03 * (6.5 - 9.8)	0.09 ± 0.04 (5.8 - 19.3)
CsA (1 mg/kg)	3.73 ± 0.39 * (2.2 - 4.6)	0.04 ± 0.02 * (3.8 - 25.5.)	0.03 ± 0.02 * (3.2 - 22.4)	0.13 ± 0.07 (5.7 - 21.9)
CsA (5 mg/kg)	2.81 ± 0.86 * (2.2 - 10.6)	0.04 ± 0.02 * (10.4 - 37.0)	0.15 ± 0.08 (6.8 - 37.6)	0.06 ± 0.02 (2.2 - 42.5)

Parameter values are given as the mean ± SD (n = 5 for control, RIF, DTZ 10 mg/kg, DTZ 20 mg/kg, DTZ 40 mg/kg, CsA 0.1 mg/kg groups and n = 6 for CsA 0.01 mg/kg, CsA 0.5 mg/kg, CsA 1 mg/kg, CsA 5 mg/kg groups). Values in parentheses express the range in percent coefficient of variation (%CV) of the parameters, which determines parameter precision. k_1 and k_2 are the rate constants for the transfer of [^{99m}Tc]mebrofenin between blood and liver tissue, k_3 is the transfer rate constant from liver tissue to the intrahepatic bile ducts, and k_5 is the transfer rate constant from the intrahepatic bile ducts to the extrahepatic biliary ducts and intestine. * $p < 0.05$, one-way ANOVA against a reference group (control) followed by a Bonferroni multiple-comparison test.

2.2. Contexte et objectifs

L'élimination hépatobiliaire des médicaments est médiée par tout un ensemble de transporteurs exprimés au niveau de l'hépatocyte (Figure 6). La plupart de ces composés sont captés par des transporteurs d'influx SLC, parmi lesquels on retrouve OATP1B1, OATP1B3 et OATP2B1, qui assurent leur transfert du sang vers le compartiment intracellulaire au niveau de la membrane sinusoidale de l'hépatocyte. Les xénobiotiques et/ou leurs métabolites sont ensuite transportés par des transporteurs d'efflux de la famille ABC qui permettent leur efflux biliaire au niveau de l'interface canaliculaire (P-gp, BSEP, MRP2, BCRP) ou leur transfert retour vers le sang (MRP3, MRP4, MRP6) (Patel et al., 2016). Ces transporteurs jouent un rôle déterminant en pharmacocinétique puisqu'une modification de leur fonction altère l'élimination de leurs substrats et donc potentiellement leur efficacité et leur toxicité (Evers et al., 2018). Il est donc important de définir la contribution intrinsèque de chacun de ces transporteurs dans le processus d'élimination hépatobiliaire. Cela permettrait de prendre en compte d'éventuelles interactions médicamenteuses au niveau de ces transporteurs et de prévenir la survenue de certaines DILI (Giacomini et al., 2018; Zamek-Gliszczyński et al., 2018). A ce jour, les sondes phénotypiques spécifiques d'un ou d'une famille de transporteurs sont rares, car il existe un important recouvrement des substrats et inhibiteurs de ces protéines.

La revue de la littérature préliminaire à ce travail expérimental (Marie et al., 2017) nous a permis d'identifier un certain nombre de sondes substrats des OATP permettant d'étudier ces transporteurs par imagerie. Ces sondes sont toutes substrats de transporteurs d'efflux exprimés au niveau de l'hépatocyte. Ainsi, le signal enregistré dans le foie résulte à la fois de l'activité des transporteurs d'influx et d'efflux sur cette sonde.

Parmi ces sondes, la [^{99m}Tc]mébrofénine a retenu notre attention pour différentes raisons. Il s'agit d'un médicament radiopharmaceutique largement utilisé depuis plusieurs dizaines d'années dans les services de médecine nucléaire pour la

scintigraphie hépatobiliaire. Le vecteur non radioactif est commercialisé sous le nom de Cholediam[®] (Mediam) et le marquage au technétium-99m peut être réalisé en radiopharmacie de façon extemporanée grâce au générateur de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. Cette sonde présente d'excellentes qualités pharmacocinétiques, avec une extraction hépatique et une élimination biliaire rapides sous forme inchangée, sans subir de métabolisme hépatique (Ghibellini et al., 2008; Krishnamurthy and Krishnamurthy, 1989). Son transport à travers l'hépatocyte est relativement spécifique puisqu'il est médié par OATP1B1 et OATP1B3 (Ghibellini et al., 2008; de Graaf et al., 2011) avec une excrétion canaliculaire principalement médiée par MRP2 (Bhargava et al., 2009; Bonnaventure and Pastor, 2015). Le transport de la [^{99m}Tc]mébrofénine par MRP3 a également été décrit *in vitro* (Ghibellini et al., 2008) ce qui implique que la [^{99m}Tc]mébrofénine pourrait aussi être effluée de l'hépatocyte vers le sang par ce transporteur. Une étude *in vivo* de la [^{99m}Tc]mébrofénine avait été menée chez la souris en l'absence et en présence de rifampicine (Neyt et al., 2013). L'ajout de rifampicine modulait fortement la cinétique hépatique de la [^{99m}Tc]mébrofénine à la fois au niveau de sa captation hépatique, médiée par les OATP, qu'au niveau de son excrétion biliaire par MRP2. Par ailleurs, la cinétique observée n'avait rien de comparable à celle obtenue chez des souris KO MRP2 réalisées dans la même étude, pour lesquelles l'ASC de la [^{99m}Tc]mébrofénine dans le foie et sa concentration maximale étaient bien plus élevées que lors de l'ajout de rifampicine. La plus faible des doses de rifampicine administrées (12,5 mg/kg intra-veineux (IV) suivie de 3,12 mg/kg intra-péritonéal) a permis de ne pas modifier la captation hépatique de la [^{99m}Tc]mébrofénine tout en inhibant son excrétion biliaire, mais cette inhibition était partielle puisque le rapport d'ASC de la bile sur le foie n'était diminué que de 25% par rapport au groupe contrôle. A titre de comparaison, une diminution de 91% avait été obtenue chez les souris déficientes en MRP2 (Neyt et al., 2013).

Pour révéler l'activité de ces transporteurs *in vivo*, les sondes sont généralement administrées chez l'animal et chez l'Homme en l'absence puis en présence d'inhibiteurs

de transporteurs, afin de comparer leur distribution tissulaire dans ces deux situations. L'inhibiteur le plus fréquemment employé pour ces études était la rifampicine dont le puissant pouvoir inhibiteur des OATP est connu (Karlgrén et al., 2012). Le potentiel d'inhibition de la rifampicine n'est pas limité uniquement aux transporteurs d'influx puisqu'elle inhibe également le transporteur d'efflux MRP2, présent dans l'hépatocyte (Matsson et al., 2009; Te Brake et al., 2016). Lors de l'association de ces sondes à la rifampicine, le signal enregistré en situation d'inhibition ne reflétait donc pas uniquement l'inhibition des transporteurs OATP mais aussi l'inhibition de MRP2, responsable de l'efflux biliaire depuis l'hépatocyte si la sonde emprunte ce transporteur, ce qui est souvent le cas. Compte tenu du profil de transport de la [^{99m}Tc]mébrofénine et des résultats prometteurs obtenus chez des animaux déficients en transporteurs OATP et MRP2 (Bhargava et al., 2009; Neyt et al., 2013), nous avons fait l'hypothèse qu'une inhibition ciblée du transport sinusoidal ou canaliculaire de la [^{99m}Tc]mébrofénine pourrait être obtenue *in vivo*, ouvrant ainsi des perspectives translationnelles d'utilisation de cette sonde chez l'Homme pour étudier plus spécifiquement le transport OATP ou MRP2.

Nos recherches se sont tout d'abord portées vers des inhibiteurs sélectifs des OATP, sans impact sur MRP2, mais la recherche bibliographique n'a pas été concluante. Nous avons identifié deux médicaments utilisés en routine clinique et connus pour inhiber MRP2, au moins *in vitro*. Le diltiazem a été décrit *in vitro* comme un inhibiteur puissant de MRP2 (Matsson et al., 2009) mais pas de OATP1B1 ni OATP1B3 (Karlgrén et al., 2012). Malgré ces données, les très fortes doses utilisées lors de nos premières expérimentations chez le rat (40 mg/kg SC) ont entraîné une inhibition de la captation OATP de la [^{99m}Tc]mébrofénine. La réduction des doses injectées de diltiazem à 20 mg/kg puis 10 mg/kg a permis de diminuer puis lever cette inhibition OATP, tout en maintenant une inhibition efficace de l'efflux canaliculaire médié par MRP2. Cette observation nous a incité à tester un autre inhibiteur puissant de MRP2 *in vitro* (Matsson et al., 2009), la ciclosporine A, et à utiliser la dose injectée comme variable

pour gagner en sélectivité. En effet, la ciclosporine A est un inhibiteur connu des transporteurs OATP hépatiques (Karlgrén et al., 2012). Nous avons donc fait l'hypothèse qu'à certaines doses, la ciclosporine A pourrait inhiber MRP2 sans influencer l'activité OATP. Ce protocole permettrait alors de « dissocier » pharmacologiquement les activités de transport OATP et MRP2 lors de la scintigraphie à la [^{99m}Tc]mébrofénine. L'imagerie refléterait alors principalement l'activité de transport OATP et permettrait d'étudier la réserve de transport MRP2 à l'interface hépatobiliaire.

2.3. Données complémentaires à l'article

2.3.1. Acquisition des données scintigraphiques

L'étude a été réalisée sur des rats anesthésiés afin de pouvoir les maintenir immobiles pendant l'ensemble de la procédure. L'administration d'isoflurane à ces rats sur une durée prolongée (> 1 heure) pose la question de l'influence de cette anesthésie sur les transporteurs. Il a été montré par exemple que l'isoflurane peut influencer l'activité de la P-gp au niveau de la BHE (Wanek et al., 2015). Nous avons donc utilisé un protocole d'anesthésie à l'isoflurane identique à chaque manipulation, afin de permettre la comparaison des résultats obtenus entre les différentes conditions. Ce même protocole a également été utilisé pour les expériences de mesure de la perfusion hépatique par échographie Doppler.

Les acquisitions ont été réalisées sur une caméra SPECT-CT clinique (Symbia[®], Siemens). Cela a été possible car la résolution de cette caméra (5 mm) était en adéquation avec la taille des régions d'intérêt étudiées (diamètre du foie de rat entre 3 et 8 cm selon les dimensions (Vdoviaková et al., 2016)). La taille du champ des détecteurs permettait l'acquisition de séries de trois rats allongés côte à côte. La [^{99m}Tc]mébrofénine était injectée au moment du déclenchement de la caméra afin de réaliser une acquisition planaire dynamique d'une durée de 30 minutes (20 fenêtres de 15 secondes, 10 fenêtres de 30 secondes, 20 fenêtres de 60 secondes). Pour les groupes de rats traités, le médicament inhibiteur était injecté avant la [^{99m}Tc]mébrofénine. La

rifampicine (40 mg/kg IV) et la ciclosporine (0,01, 0,1, 0,5, 1 et 5 mg/kg IV) étaient injectées dans les 5 minutes précédant l'injection de [^{99m}Tc]mébrofénine. Nos résultats montrent que l'administration IV de ces inhibiteurs permettait une inhibition très rapide des transporteurs étudiés. Le diltiazem en revanche a été administré par voie sous-cutanée (SC, dans la nuque des animaux) car la voie IV provoquait une mort rapide de l'animal à des doses supérieures à 5 mg/kg. La voie SC a permis l'administration de doses plus importantes que par voie IV (10, 20, 40 mg/kg). En revanche la phase de distribution associée à cette voie a contraint à réaliser ces injections une heure avant l'administration de [^{99m}Tc]mébrofénine, afin d'atteindre les concentrations maximales, comme cela a été montré précédemment (Yeung et al., 2007).

2.3.2. Analyse des données scintigraphiques

Des régions d'intérêt (ROI) ont été dessinées sur le cœur, le foie, l'intestin et la vessie en sélectionnant et sommant les fenêtres d'acquisition pendant lesquelles chaque tissu présentait le plus de contraste (première minute pour le cœur, 2 à 10 minutes pour le foie et 15 à 30 minutes pour l'intestin et la vessie). Du fait de l'acquisition planaire, les ROI étaient dessinées sur des images à deux dimensions et une attention particulière était portée aux zones de potentiel chevauchement entre les tissus (cœur/foie ou foie/intestin en particulier). Ces zones étaient exclues des ROI afin de ne pas fausser la quantification du tissu. L'imagerie scintigraphique ne permettant pas d'obtenir des valeurs absolues (en Bq) de la radioactivité volumique, les cinétiques ont été obtenues pour chaque ROI en corrigeant les valeurs mesurées dans chacune par la dose injectée (cps/MBq). La réalisation de prélèvements répétés au cours de l'examen est difficile à mettre en œuvre chez le petit animal. Les TAC obtenues dans la région du cœur ont donc été utilisées comme données de fonction d'entrée dérivées de l'image pour l'analyse des résultats, profitant ainsi de la stabilité métabolique de la [^{99m}Tc]mébrofénine et permettant d'éliminer des biais quantitatifs liés à la qualité et la reproductibilité des prélèvements et des comptages. Le coefficient de variation (CV :

écart-type/moyenne) de l'ASC_{sang} des mesures de la radioactivité dans le pool sanguin est d'ailleurs relativement faible, allant de 7 à 36% selon les conditions testées. La distribution de la [^{99m}Tc]mébrofénine vers le foie puis les intestins a été décrite et évaluée par différentes méthodes expliquées dans l'article.

Enfin, une modélisation compartimentale a aussi été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec une doctorante de l'Université de Vienne (Irene Hernández-Lozano), à partir d'un modèle qu'elle avait développé pour étudier le transport hépatique de radiotraceurs TEP (Hernández Lozano et al., 2019). Par rapport à l'analyse graphique, la modélisation compartimentale a permis d'estimer les constantes de transfert de la [^{99m}Tc]mébrofénine au niveau des différentes interfaces. Les constantes k_1 et k_2 évaluent le transfert entre le sang et les hépatocytes, k_3 des hépatocytes vers les voies biliaires intrahépatiques, et k_5 des voies biliaires intrahépatiques vers les intestins. Ce modèle permet de prendre en compte la double perfusion hépatique du foie qui participe à la distribution de la [^{99m}Tc]mébrofénine vers cet organe. Sa concentration dans l'artère hépatique était dérivée de l'image (TAC obtenue par la ROI dessinée sur le cœur) et sa concentration dans la veine porte était estimée mathématiquement à partir des valeurs mesurées dans les différentes ROI. Cette approche avait pour objectif d'apporter une nouvelle lecture de l'influence des transporteurs sur la cinétique hépatique de la [^{99m}Tc]mébrofénine, en prenant en compte les spécificités des différentes interfaces et systèmes de transporteurs hépatocytaires (Pauli-Magnus and Meier, 2006).

2.3.3. Etude comparative du potentiel d'inhibition de MRP2 *in vitro*

Certaines données de la littérature *in vitro* nous ont permis d'envisager l'utilisation de la rifampicine, du diltiazem et de la ciclosporine comme inhibiteurs de MRP2 (Matsson et al., 2009). Le potentiel d'inhibition de MRP2 de ces médicaments en fonction de la concentration avait déjà été comparé pour la rifampicine et la ciclosporine (Förster et al., 2008). Cependant, nous avons décidé de réaliser une étude comparative de ces trois

inhibiteurs dans les mêmes conditions, sur un même modèle de lignées cellulaires surexprimant le transporteur MRP2 humain (cellules transfectées MDCK-II-MRP2).

Dans une phase préliminaire, la [^{99m}Tc]mébrofénine a été envisagée comme substrat pour l'étude du transport MRP2 sur ces cellules. La [^{99m}Tc]mébrofénine était préparée de façon extemporanée pour ces manipulations puis ajoutée à une solution tampon (HBSS, Hank's Balanced Salt Solution) dans laquelle était ajoutée la rifampicine, seul inhibiteur testé à cette étape. Les étapes suivantes (mise du tampon au contact des cellules, incubation, lyse) étaient identiques à celles décrites dans l'article, à la différence de la quantification de l'accumulation de la [^{99m}Tc]mébrofénine dans les cellules qui se faisait par comptage gamma, compte tenu des émissions radioactives du technétium-99m (compteur Cobra[®]). Ces premières expérimentations se sont avérées non concluantes avec une très grande variabilité des résultats. Différents paramètres ont été modifiés afin d'améliorer le protocole. Le temps d'incubation a d'abord été changé et des manipulations ont été réalisées avec une mise en contact de la [^{99m}Tc]mébrofénine pendant des temps différents selon les puits (10, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes) afin de déterminer un temps optimal. Des essais ont ensuite été réalisés avec des puits permettant le transport bidirectionnel (Transwell[®] Permeable Supports, Corning). Malgré ces différentes tentatives, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence le pouvoir d'inhibition de la rifampicine en utilisant la [^{99m}Tc]mébrofénine comme substrat. Cela est probablement lié à une faible capacité de la [^{99m}Tc]mébrofénine à pénétrer dans le milieu intracellulaire des cellules MDCK-MRP2 et ce, quel que soit le niveau d'activité de MRP2. Cette hypothèse est cohérente avec le mécanisme d'entrée de la [^{99m}Tc]mébrofénine dans les hépatocytes qui est principalement médié par le transport d'influx OATP avec un faible passage lorsque ceux-ci sont inhibés. Cela suggère une très faible perméabilité membranaire par diffusion passive de la [^{99m}Tc]mébrofénine.

Les expériences de transport *in vitro* ont donc été réalisées avec de la calcéine-AM (acétoxyméthyl-calcéine), qui est largement utilisée comme sonde pour l'étude par

fluorescence des transporteurs ABC dont MRP2 (Vadlapatla et al., 2011). La calcéine-AM est régulièrement utilisée *in vitro* pour cette propriété dans des tests d'accumulation cellulaire afin d'évaluer la capacité de transport MRP2 ou de détecter de potentielles interactions médicamenteuses au niveau de ce transporteur (Vriend et al., 2018; Wen et al., 2017). La calcéine-AM n'est pas fluorescente et pénètre dans les cellules par diffusion passive (en subissant toutefois un efflux par la P-gp endogène des cellules) (Essodaïgui et al., 1998). Ce dérivé d'ester est métabolisé par des estérases intracellulaires en calcéine fluorescente qui est substrat de MRP2 (Vadlapatla et al., 2011). Les cellules étaient mises en contact avec des concentrations croissantes d'inhibiteurs (0 jusqu'à 1000 μM) et le transport MRP2 de ces cellules était évalué par mesure de la fluorescence de la calcéine-AM accumulée dans les cellules. Bien que tous les inhibiteurs aient été testés sur la même gamme de concentrations, il s'est avéré que chaque inhibiteur avait sa propre concentration maximale au-delà de laquelle ils induisaient une toxicité cellulaire et les résultats n'étaient plus exploitables. Les concentrations maximales observées pour la rifampicine et la ciclosporine étaient d'ailleurs comparables à celles de l'étude ayant déjà testé le pouvoir d'inhibition MRP2 de ces médicaments (Förster et al., 2008). Afin de pouvoir comparer les résultats, les données de chaque inhibiteur ont été normalisées pour décrire le pouvoir d'inhibition de 0 jusqu'à son maximum, défini comme 100%. Une régression non linéaire a ensuite été réalisée pour déterminer la concentration permettant d'inhiber 50% (IC_{50}) du transport pour chaque inhibiteur.

2.3.4. Effets des inhibiteurs de MRP2 sur la perfusion hépatique

L'injection du diltiazem, un inhibiteur calcique, à des doses supérieures à leurs doses pharmacologiques interroge sur son éventuel retentissement sur la perfusion hépatique. Un tel effet pouvait alors introduire un biais dans l'interprétation des modifications cinétiques observées par imagerie en présence d'inhibiteurs. Afin d'évaluer l'impact de ces inhibiteurs sur la perfusion hépatique des rats, une étude complémentaire par échographie Doppler a été réalisée. Le choix s'est tourné vers cette

technique d'imagerie qui permet des mesures répétées, avant et après traitement, sur un même animal. Les rats étaient anesthésiés avec le même protocole que celui utilisé pour la scintigraphie et les images étaient réalisées en positionnant la sonde d'échographie sur l'abdomen rasé des rats. Pour chaque animal, le débit des trois vaisseaux hépatiques (veine porte, veine hépatique, artère hépatique) était mesuré avant et 5 minutes après l'injection d'une forte dose d'inhibiteur. La rifampicine et la ciclosporine ont été administrées aux mêmes doses que lors de la scintigraphie (40 mg/kg IV et 5 mg/kg IV respectivement). Pour le diltiazem en revanche, la position des rats sur le dos et la nécessité de procéder à ces deux mesures de façon rapprochée ne permettait pas son administration SC dans des conditions identiques à la scintigraphie, c'est-à-dire dans la nuque des animaux 60 minutes avant l'acquisition. La plus forte dose administrée dans l'étude scintigraphique (40 mg/kg) s'est avérée létale en IV. Il a donc été décidé pour cette étude d'utiliser la plus forte dose IV décrite dans la littérature (3 mg/kg). Les résultats dans chaque groupe (n = 4) ont été analysés par un *t*-test apparié.

2.4. Synthèse des résultats

Les essais *in vitro* ont montré que des concentrations importantes de rifampicine étaient nécessaires pour inhiber le transport MRP2 ($IC_{50} = 210 \mu M$ [175 – 254]) contrairement au diltiazem et à la ciclosporine dont les IC_{50} étaient beaucoup plus faibles ($IC_{50} = 4,4 \mu M$ [1,7 – 10,4] et $1,7 \mu M$ [1,0 – 2,7] respectivement). Cela a permis de confirmer que les activités molaires d'inhibition du diltiazem et de la ciclosporine sur MRP2 étaient nettement plus importantes que celle de la rifampicine. Par ailleurs, l'effet maximal de l'inhibition était obtenu à des concentrations très différentes pour chaque molécule : $30 \mu M$ pour la ciclosporine, $500 \mu M$ pour le diltiazem et $1000 \mu M$ pour la rifampicine.

Concernant l'étude *in vivo* par scintigraphie, l'analyse réalisée a permis de confirmer l'inhibition de MRP2 par les 3 inhibiteurs. L' $ASC_{R, intestin/foie}$ évaluant l'excrétion biliaire de la [^{99m}Tc]mébrofénine et la constante k_3 évaluant son transfert des hépatocytes vers les

voies biliaires étaient tous les deux significativement diminués par rapport au groupe contrôle, avec une intensité comparable quel que soit l'inhibiteur. En revanche, les résultats des paramètres évaluant la captation hépatique de la [^{99m}Tc]mébrofénine ($\text{ASC}_{\text{R,foie/sang}}$, clairance de captation et constante k_1 de transfert du sang vers les hépatocytes) étaient différents en fonction de l'inhibiteur associé à la [^{99m}Tc]mébrofénine et de sa dose. Par rapport au groupe contrôle, les $\text{ASC}_{\text{R,foie/sang}}$ du groupe rifampicine étaient significativement abaissés. Les $\text{ASC}_{\text{R,foie/sang}}$ étaient également abaissés pour les plus fortes doses de diltiazem et de ciclosporine (40 mg/kg SC et 5 mg/kg IV respectivement). Cependant un effet dose-dépendant a été observé pour chacun de ces paramètres lors de la réduction des doses de diltiazem et de ciclosporine et les résultats obtenus avec les plus faibles doses (10 mg/kg SC pour le diltiazem et 0,01 mg/kg IV pour la ciclosporine) n'étaient pas significativement différents de ceux obtenus pour le groupe contrôle. Les faibles doses de diltiazem et de ciclosporine ont donc permis d'inhiber sélectivement le transport d'efflux biliaire de la [^{99m}Tc]mébrofénine, médié par MRP2, sans inhiber sa captation hépatique par OATP1B1 et OATP1B3.

La modélisation compartimentale a également permis d'affiner l'analyse de ces données en révélant certains autres aspects du transport de la [^{99m}Tc]mébrofénine à travers l'hépatocyte. La constante k_2 , qui évalue le transfert retour de la [^{99m}Tc]mébrofénine des hépatocytes vers le sang, s'est elle aussi avérée impactée de manière dose-dépendante par les différents inhibiteurs, d'une manière parallèle à k_1 . Il s'agit là de la première mise en évidence *in vivo* du transport d'efflux sinusoidal de la [^{99m}Tc]mébrofénine. Un autre aspect intéressant de ce modèle est qu'il permet de comparer l'intensité de chacun des systèmes de transport de la [^{99m}Tc]mébrofénine. On observe que la constante de transfert du sang vers les hépatocytes est la plus importante quelles que soient les conditions. Il est tout de même intéressant de noter qu'en condition basale la valeur de la constante d'efflux k_2 (hépatocyte vers le sang) est identique à la constante d'efflux k_3 de l'hépatocyte vers la bile ($0,15 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ et

$0,15 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$ respectivement). Cela suggère qu'il existe une compétition entre la sécrétion biliaire et la recirculation de la $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ mébrofénine en situation basale. En revanche, les valeurs de ces deux constantes diffèrent lors de l'ajout d'inhibiteurs puisque k_3 est diminuée de façon dose-dépendante et parallèle à k_1 .

La modélisation pharmacocinétique a également permis d'étudier l'inhibition des OATP par la ciclosporine sur une large fenêtre de doses (de 0,01 mg/kg à 5 mg/kg). Cela a permis d'établir une relation entre la valeur du k_1 , qui reflète l'activité des OATP, et la dose injectée. Ainsi, nous avons pu estimer une dose inhibitrice 50% (DI_{50}) des OATP par la ciclosporine à 0,16 mg/kg chez le rat (Figure 15). Cette démarche montre l'intérêt de tester plusieurs doses d'inhibiteur plutôt qu'une seule afin de mieux en apprécier les répercussions sur l'activité des transporteurs *in vivo*.

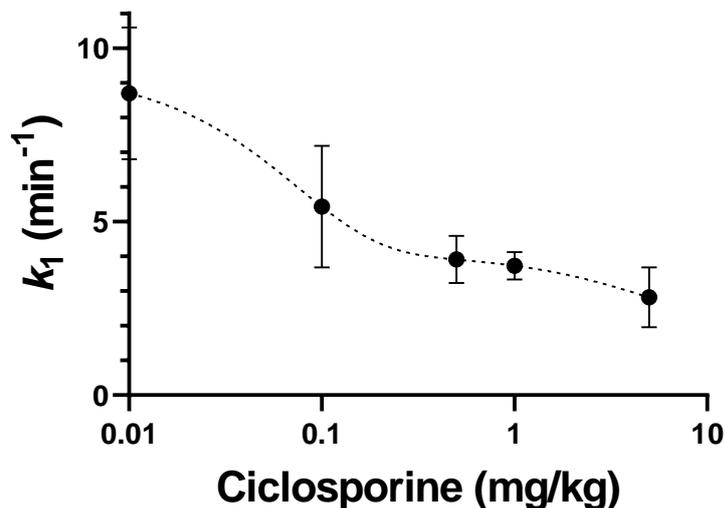


Figure 15 : Valeurs des constantes de transfert k_1 (sang vers le foie) de la $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ mébrofénine en fonction des concentrations croissantes de ciclosporine.

L'étude par échographie Doppler visait à vérifier que ces modifications observées dans la distribution hépatique de la $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ mébrofénine n'étaient pas simplement dues à une modification de la perfusion hépatique générée par l'injection du médicament inhibiteur. En effet, cette étude a révélé que l'injection de fortes doses de diltiazem

diminuait effectivement le débit sanguin de la veine porte et de l'artère hépatique. Une légère diminution du débit de la veine porte était également retrouvée lors de l'injection de rifampicine. Il est important de préciser que ces deux inhibiteurs étaient utilisés dans cette étude à des doses très supérieures à celles utilisées dans la pratique clinique. Dans ce travail, seules les doses utilisées pour la ciclosporine sont transposables chez l'Homme pour inhiber sélectivement MRP2. De plus, aucune modification significative du débit de perfusion n'est attendue pour la ciclosporine dans une large fenêtre de doses.

2.5. Conclusion et perspectives

Le transport de la [^{99m}Tc]mébrofénine avait été mis en évidence par des études *in vitro* sur les transporteurs d'influx OATP1B1 et OATP1B3 et les transporteurs d'efflux MRP2 et MRP3 (Ghibellini et al., 2008; de Graaf et al., 2011; Neyt et al., 2013; Pfeifer et al., 2013; Swift et al., 2010b) et également par des études *in vivo* chez des rongeurs déficients MRP2 ou OATP (Bhargava et al., 2009; Hendrikse et al., 2004; Neyt et al., 2013). L'effet de la rifampicine observé sur le transport de la [^{99m}Tc]mébrofénine dans cette étude confirme des données précédemment publiées dans la littérature chez la souris où la rifampicine inhibait à la fois la captation hépatique et l'efflux biliaire de la [^{99m}Tc]mébrofénine (Neyt et al., 2013).

L'étude réalisée *in vitro* a permis de confirmer que le diltiazem et la ciclosporine présentent tous les deux un pouvoir d'inhibition de MRP2 ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$) plus élevé que la rifampicine. Cela a permis de diminuer considérablement les doses administrées aux rats pour ne plus inhiber les OATP tout en maintenant une inhibition efficace et ciblée du transport d'efflux MRP2 de la [^{99m}Tc]mébrofénine. La modélisation pharmacocinétique a révélé que le transport d'efflux sinusoidal de la [^{99m}Tc]mébrofénine était également inhibé de manière dose dépendante par le diltiazem et la ciclosporine. Ce résultat *in vivo* est en accord avec le transport de la [^{99m}Tc]mébrofénine par les transporteurs d'efflux sinusoidaux comme MRP3 (Ghibellini et al., 2008). Les constantes de transfert obtenues en conditions basales suggèrent que

l'intensité du transport d'efflux MRP2 et MRP3 de l'hépatocyte vers la bile et le sang respectivement seraient comparables. Cependant les résultats indiquent que ce transport d'efflux MRP3 est moins sensible que MRP2 à l'inhibition par le diltiazem et la ciclosporine. Cela pourrait s'expliquer par la forte concentration de ces inhibiteurs dans la bile, qui permettrait une inhibition plus efficace au pôle canaliculaire qu'au pôle basolatéral. L'administration de ces faibles doses d'inhibiteurs permet donc d'inhiber sélectivement le transport d'efflux de la [^{99m}Tc]mébrofénine médié par MRP2 sans en altérer sa captation et son efflux sinusoidal. Ces deux protocoles permettent ainsi d'envisager pour la première fois de réaliser avec la [^{99m}Tc]mébrofénine de l'imagerie sélective du transport sinusoidal de l'hépatocyte, pour lequel le transport d'influx OATP (OATP1B1 et OATP1B3) semble franchement prédominant par rapport au transport d'efflux MRP3 ($k_1 = 7,37 \pm 1,62 \text{ min}^{-1}$ et $k_2 = 0,15 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$ dans le groupe contrôle). L'influence des inhibiteurs de transporteurs sur le débit de perfusion hépatique n'est souvent pas connue. Notre étude a montré que de fortes doses de rifampicine et de diltiazem pouvaient diminuer le débit sanguin de certains vaisseaux hépatiques. Toutefois, les doses employées pour cette étude (40 mg/kg IV pour la rifampicine et 3 mg/kg IV pour le diltiazem) correspondent aux plus fortes doses utilisées chez l'animal dans la littérature (He et al., 2014b; Lee et al., 1991). Ces doses sont très supérieures à celles employées chez l'Homme lors des études cliniques (rifampicine généralement 600 mg et diltiazem jusqu'à 0,3 mg/kg/h) (Takashima et al., 2012). Seule la ciclosporine était administrée dans cette étude à une dose transposable en clinique (5 mg/kg IV) et cette dose n'a eu aucun effet significatif sur la perfusion hépatique. Le protocole d'inhibition par ciclosporine faible dose (0,01 mg/kg IV) est donc le meilleur des protocoles testés pour inhiber sélectivement le transport MRP2 tout en garantissant une sécurité d'utilisation. Les résultats obtenus avec ce protocole sur la cinétique de la [^{99m}Tc]mébrofénine sont d'ailleurs très proches de ceux observés sur les rongeurs déficients en MRP2 (Bhargava et al., 2009; Neyt et al., 2013). Cette approche permet ainsi de reproduire les conditions obtenues chez les animaux déficients par un

protocole pharmacologique. Cette stratégie permettrait de surcroit de ne pas subir l'influence de phénomènes de compensation observés pour de nombreuses souches d'animaux déficients en transporteurs. En effet, une étude réalisée avec les mêmes rats déficients en MRP2 que ceux utilisés lors de l'étude avec la [^{99m}Tc]mébrofénine a en effet démontré par Western-Blot de grandes différences entre ces rats et un groupe de rats contrôle en terme d'expression protéique des transporteurs hépatocytaires (Figure 16). Ces modèles d'animaux déficients ne reflètent donc pas exactement la réalité du transport *in vivo* et des interactions qui peuvent se produire entre transporteurs.

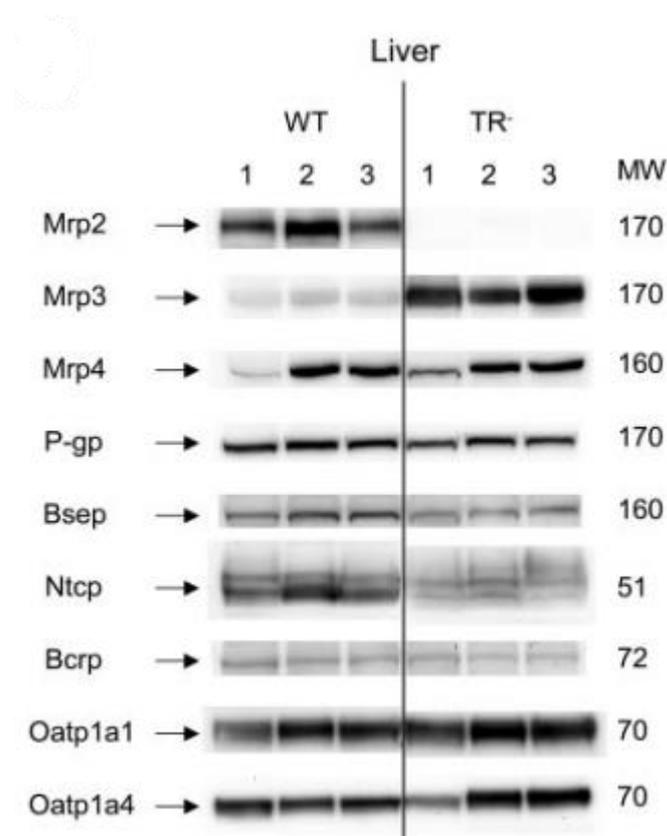


Figure 16 : Western-Blot d'homogénats de foies de rats contrôles (WT : wild type) et déficients en MRP2 (TR⁻ : transport déficient).

(Johnson et al., 2006)

De plus, la faible dose de ciclosporine utilisée, très inférieure à celle utilisée lors de son utilisation thérapeutique, permet d'envisager la transposition clinique de ce protocole

facilement et en toute sécurité. Néanmoins, l'efficacité de ce protocole chez l'Homme ou chez d'autres espèces animales que le rat, nécessitera une validation qui pourra être effectuée par imagerie à la [^{99m}Tc]mébrofénine.

La combinaison de la [^{99m}Tc]mébrofénine, radiotraceur substrat, et de la ciclosporine à faible dose, médicament inhibiteur, élargit le champ des perspectives de l'imagerie des transporteurs hépatiques. Ce protocole, une fois transposé à l'Homme pourrait permettre d'une part de réaliser de l'imagerie moléculaire des transporteurs OATP sinusoidaux et la quantification sélective de leur activité. D'autre part, ce protocole offre la possibilité d'explorer de manière dissociée l'activité MRP2, plus difficile d'accès par les méthodes pharmacocinétiques usuelles.

MRP2 est un acteur majeur de l'excrétion biliaire des composés à la fois endogènes et exogènes. Les observations faites avec la [^{99m}Tc]mébrofénine illustrent le fait qu'une diminution de cette activité d'efflux, bien que non détectée au niveau du plasma, peut conduire à une augmentation importante de l'exposition hépatique aux substrats MRP2. Ce genre d'interaction pourrait être à l'origine de phénomène d'accumulation hépatique ou de cholestase, pouvant mener parfois à des DILI (Fu et al., 2019). Ce protocole d'imagerie, simple à mettre en œuvre, constitue un outil supplémentaire pour l'étude de ces processus pharmacocinétiques complexes.

L'objectif initial de ce projet était d'utiliser la [^{99m}Tc]mébrofénine comme sonde d'imagerie moléculaire pour permettre une imagerie sélective de l'activité des transporteurs OATP, qui ne soit pas influencée par l'activité d'autres transporteurs hépatocytaires. Notre travail montre que l'inhibition ciblée de MRP2 modifie la cinétique hépatique de la [^{99m}Tc]mébrofénine en augmentant ses concentrations (C_{max}) et l'exposition globale (AUC_{foie}). Nos résultats montrent néanmoins que la quantification du transport OATP, estimée par la constante k_1 , la clairance de transfert CL_{uptake} et l' $AUC_{R,foie/sang}$ n'était pas influencée par l'inhibition de MRP2 *in vivo*. Cela s'explique par le fait que la quantification s'effectue à partir des temps précoces, avant que la sécrétion biliaire ne joue un rôle dans le contrôle des concentrations hépatiques

de la [^{99m}Tc]mébrofénine. Ainsi, ce travail montre donc qu'une mesure de l'activité OATP par la [^{99m}Tc]mébrofénine peut être réalisée *in vivo*, indépendamment du niveau d'activité des transporteurs canaliculaires comme MRP2.

3. Partie 2 - [¹¹C]glyburide : Validation d'une nouvelle sonde clinique pour l'imagerie OATP

Les différentes études évoquées précédemment, en particulier celles par l'imagerie, ont permis de bien caractériser le rôle des transporteurs OATP au niveau hépatique. Leur implication pharmacocinétique est désormais reconnue. Cependant, l'expression de certains membres de la famille OATP a été retrouvée dans d'autres tissus où ils pourraient jouer un rôle physiologique, et/ou sur la distribution tissulaire locale de xénobiotiques. Parmi les transporteurs OATP ubiquitaires, OATP2B1 présente un intérêt grandissant puisqu'il participe à différentes étapes pharmacocinétiques, principalement l'absorption intestinale et la captation hépatique de composés endogènes et exogènes (Chen et al., 2020). Les connaissances sur ce transporteur sont encore limitées mais un nombre grandissant de publications mettent en évidence son rôle dans des phénomènes d'interactions médicamenteuses (McFeely et al., 2019).

Plusieurs de ces études ont montré des variations dans le fonctionnement de ces transporteurs comme par exemple des modifications associées du pH du milieu où ils sont exprimés. Le mécanisme à l'origine de ce phénomène n'est pas clairement identifié mais la modulation de l'activité de transport des OATP2B1 par le pH est différente selon les substrats (McFeely et al., 2019). La pravastatine, par exemple, semble transportée par OATP2B1 seulement en conditions acides alors que le transport de la rosuvastatine est indépendant du pH (Varma et al., 2011). D'autres études ont également souligné des modifications de la pharmacocinétique de certains médicaments lorsqu'ils étaient administrés avec des inhibiteurs des transporteurs OATP2B1, qui pouvaient être médicamenteux (inhibiteurs de protéases) ou alimentaires (certains jus de fruits en particulier) (McFeely et al., 2019) (Tableau 8).

Tableau 8 : Exemples d'interactions relevées au niveau des transporteurs OATP2B1.

(McFeely et al., 2019)

Intestinal OATP2B1 interaction ^a				
Substrate	Substrate dose ^b	Inhibitor	Inhibitor dose ^b	AUCR
aliskiren	150 mg	apple juice	200 mL [TID, 5 days]	0.37
		grapefruit juice	200 mL [TID, 5 days]	0.39
		orange juice	200 mL [TID, 5 days]	0.38
atenolol	50 mg	apple juice	1200 mL (total)	0.17–0.21
			600 mL (total)	0.41
celiprolol	100 mg	grapefruit juice	200 mL [TID, 3 days]	0.16–0.25
	1200 µg	grapefruit juice	200 mL [TID, 3 days]	0.57
fexofenadine	60 mg	apple juice	1200 mL (total)	0.15
			600 mL	0.39
			300 mL	0.62
(R)-fexofenadine ^c	60 mg	apple juice	400 mL	0.47
(S)-fexofenadine ^c	60 mg	grapefruit juice	250 mL	0.59
		apple juice	400 mL	0.35
glyburide	300 µg	grapefruit juice	250 mL	0.43
	20 mg	grapefruit juice	200 mL [TID, 3 days]	0.55
rosuvastatin	250 µg	epigallocatechin gallate	300 mg	0.84
	10 mg	grapefruit juice	200 mL [TID, 3 days]	0.70
	10 mg	ronacaleret	400 mg [QD, 10 days]	0.51
sulfasalazine	300 µg	grapefruit juice	200 mL [TID, 3 days]	0.66
sumatriptan	600 µg	grapefruit juice	200 mL [TID, 3 days]	0.73
talinolol	100 mg	quercetin	20 mg [BID, 7 days]	0.77
			500 mg [TID, 7 days]	0.79
ticlopidine	250 mg	ergoloid mesylates	1.5 mg [TID, 3.5 days]	0.70
voxilaprevir	100 mg	grapefruit juice	300 mL	0.98
	200 mg	sofosbuvir/velpatasvir	400 mg / 100 mg [QD, 4 days]	0.39
Hepatic OATP2B1 Interaction ^{a,d}				
Substrate	Substrate Dose ^a	Inhibitor	Inhibitor Dose ^a	AUCR
asunaprevir	200 mg	rifampin	600 mg	14.82
montelukast	10 mg	gemfibrozil	600 mg [BID, 3 days]	4.54
rosuvastatin	10 mg	asunaprevir	200 mg [BID, 11 days]	1.41

^a Current research supports that these interactions are likely driven by inhibition of intestinal or hepatic OATP2B1, however it cannot be ruled out that other unidentified could be contributing to the observed changes in AUC.

^b Administered as a single oral dose unless otherwise noted.

^c Administered as a racemic mixture.

^d It is likely that the hepatic interactions are primarily driven by inhibition of OATP1B1/1B3, with minor contribution from OATP2B1. For rifampin and gemfibrozil, the IC₅₀ OATP1B1 are approximately half that of OATP2B1 indicating that inhibition of OATP1B1 is more likely the primary interaction given the estimated liver inlet concentrations. The AUCR indicates that inhibition of hepatic uptake is the dominant interaction over intestinal inhibition of OATP2B1, however the magnitude of the hepatic interaction could be decreased absorption. Data retrieved from the UW DIB 02 Jan 2018.

Un certain nombre de médicaments sont substrats d'OATP extra-hépatiques et en particulier de OATP2B1 (Tableau 3). Les interactions médicamenteuses actuellement observées sur ce transporteur sont plutôt au niveau intestinal et hépatique où OATP2B1 est majoritairement exprimé (Tableau 8). Cependant, l'expression protéique de OATP2B1 dans de nombreux autres tissus (Figure 5) peut laisser penser que de telles interactions pourraient également se produire à leur niveau. Le développement de sondes d'imagerie permettrait de répondre à cette problématique en offrant de nouveaux outils d'étude clinique de ces transporteurs. Pendant ce travail de thèse, une première sonde TEP destinée à l'imagerie OATP2B1 a été validée : le [¹¹C]erlotinib. L'erlotinib présente la particularité d'être transportée par OATP2B1 mais pas par OATP1B1 ni OATP1B3 (Bauer et al., 2018a). Toutefois, la captation de cette sonde à

travers les membranes n'est pas uniquement dépendante du transporteur OATP2B1 puisqu'elle présente une captation hépatique importante, même lorsque les transporteurs sont inhibés par la rifampicine (Figure 17) ou lors d'un prétraitement par des doses pharmacologiques d'erlotinib (300 mg par voie orale) (Bauer et al., 2018a).

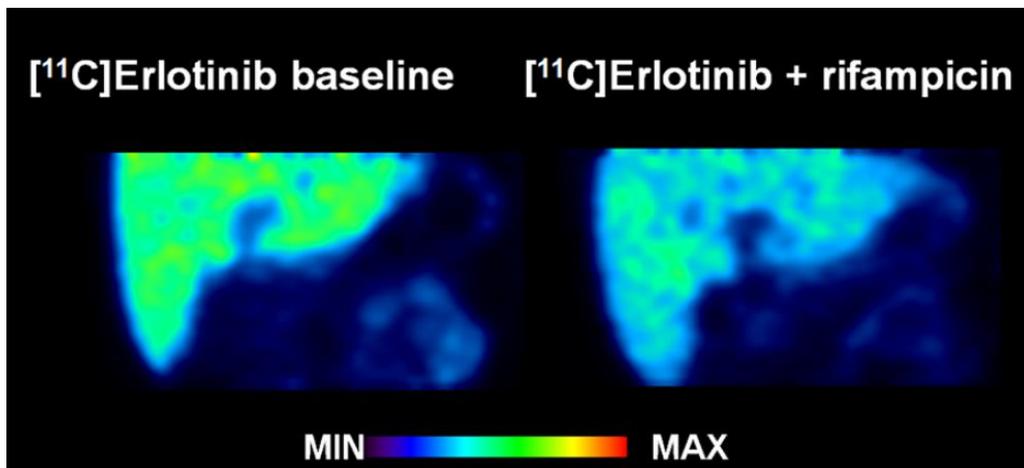


Figure 17 : Distribution du $[^{11}\text{C}]$ erlotinib dans le foie en condition basale et après inhibition des transporteurs OATP par rifampicine.

(Bauer et al., 2018b)

Le faible contraste entre les situations basales et d'inhibition n'est probablement pas suffisant pour explorer un éventuel impact de l'inhibition dans les tissus où l'expression d'OATP2B1 est plus faible (McFeely et al., 2019). Pour ces raisons, notre choix pour l'étude fonctionnelle des transporteurs extra-hépatiques s'est tourné vers le $[^{11}\text{C}]$ glyburide. Ce radiotracer n'est pas spécifique de OATP2B1, car une étude *in vitro* sur différents transporteurs OATP a montré que le glyburide était également transporté par OATP1A2, qui est lui aussi retrouvé un quantité importante au niveau extra-hépatique (Figure 5), et dans une moindre mesure par OATP1B1 dont l'expression est considérée comme exclusivement limitée au foie (Koenen et al., 2012). Le transport par OATP1B3 en revanche n'était pas significatif. Ainsi, le $[^{11}\text{C}]$ glyburide offre la possibilité de détecter et de mesurer l'importance de transporteurs OATP exprimés au niveau d'autres interfaces biologiques que le foie. Une étude préclinique réalisée chez le

primate a d'ailleurs permis de relever des différences significatives de distribution tissulaire dans plusieurs tissus extra-hépatiques (myocarde, parenchyme rénal) en présence de rifampicine et de ciclosporine (Tournier et al., 2013). Cependant, la quantification du transport OATP par le [¹¹C]glyburide n'avait pas été optimisée dans l'objectif d'une transposition clinique.

3.1. Validation préclinique des méthodes de quantification du [¹¹C]glyburide

3.1.1. Contexte et objectif

L'objectif principal de l'article publié en 2013 (Tournier et al., 2013) était d'étudier le passage cérébral du [¹¹C]glyburide chez le primate non-humain. En effet, le glyburide est actuellement évalué comme traitement neuroprotecteur dans la prise en charge des atteintes du système nerveux central (King et al., 2018; Sheth et al., 2016). Néanmoins, dans le cadre de ce projet, deux babouins avaient participé à des protocoles d'acquisition corps-entier permettant d'apprécier sa biodistribution dans les différents organes dont le foie. Le [¹¹C]glyburide avait été administré à des babouins en situation basale ainsi que dans deux situations d'inhibition pharmacologique des transporteurs OATP avec des doses cliniques de rifampicine (8,6 mg/kg IV) et de ciclosporine (15 mg/kg/h IV). Cette étude a permis de montrer que le métabolisme du [¹¹C]glyburide chez le primate est lent (~70% d'inchangé à 60 minutes), et inhibé par le prétraitement avec des inhibiteurs OATP. Ce travail avait surtout permis de révéler un contraste important dans ce tissu entre la situation physiologique et les situations d'inhibition, confirmant le transport du [¹¹C]glyburide par les OATP au niveau de l'interface sinusoidale de l'hépatocyte. La particularité de cette étude est que l'ajout de ces inhibiteurs a permis également et pour la première fois de détecter une sensibilité à l'inhibition OATP d'autres tissus que le foie : le parenchyme rénal et le myocarde. L'objectif de ce travail a donc été de définir une méthode d'analyse optimisée permettant de détecter et de quantifier de la façon la plus précise possible une

variation de distribution tissulaire de [¹¹C]glyburide avant et après inhibition pharmacologique des transporteurs.

3.1.2. Matériels et méthodes

3.1.2.1. Acquisition des données

Les acquisitions TEP dynamiques, permettant d'apprécier la cinétique du radiotracer, sont généralement réalisées sur un seul pas de lit, ce qui ne permet pas d'avoir un aperçu global de la cinétique dans l'ensemble des organes du corps. Dans la cadre de cette étude préclinique, il a été fait le choix de réaliser une acquisition TEP dynamique corps-entier. Des balayages corps-entier ont été réalisés pour chacune des conditions (fenêtres de 2,5 à 5 minutes pour une durée totale d'acquisition de 60 minutes). Tout au long de l'acquisition, des prélèvements de sang artériel ont été réalisés afin d'évaluer la pharmacocinétique plasmatique du [¹¹C]glyburide et d'identifier ses éventuels radiométabolites par HPLC.

3.1.2.2. Application des méthodes d'analyse quantitative

Des volumes d'intérêt (VOI) ont été dessinés sur les différents tissus dans lesquels la distribution du [¹¹C]glyburide a été étudiée : foie, rein, myocarde, cerveau et poumon. Les cinétiques du [¹¹C]glyburide ont été obtenues dans chacun de ces VOI ainsi que dans le plasma grâce aux prélèvements artériels réalisés et ces cinétiques ont permis de générer des TAC. Deux méthodes ont été testées pour analyser ces données et évaluer la distribution tissulaire du [¹¹C]glyburide chez ces babouins :

- Le calcul des rapports d'aires sous la courbe pour estimer la captation du [¹¹C]glyburide dans chacun des tissus : $ASC_R = \frac{ASC_{tissu}}{ASC_{plasma}}$. L'ASC des TAC de chaque tissu était rapportée à l'ASC de la cinétique plasmatique. Ce rapport était calculé sur la période de 0 à 15 minutes qui correspondait à la phase de captation hépatique du [¹¹C]glyburide.
- L'intégration plot analysis pour évaluer le transfert du [¹¹C]glyburide du sang vers chacun des tissus en déterminant leur clairance de captation (CL) du [¹¹C]glyburide,

estimée par le calcul : $\frac{X_{\text{tissu},t}}{C_{\text{plasma},t}} = CL * \left(\frac{AUC_{\text{plasma},0-t}}{C_{\text{plasma},t}} \right) + V_E$. Ce calcul a été réalisé de 0 à 12 minutes, période qui correspondait à la partie linéaire de l'analyse sur l'ensemble des organes étudiés.

Pour ces deux méthodes, la réponse à l'inhibition était déterminée pour chaque animal par le pourcentage de changement de l'ASC_R et de la CL de captation induit par la rifampicine et la ciclosporine.

3.1.3. Résultats

Le métabolisme du [¹¹C]glyburide observé lors de l'étude préclinique était lent (Figure 18). La part de fraction inchangée était supérieure à 90% de 0 à 15 minutes dans toutes les conditions (absence et présence d'inhibiteur). L'analyse quantitative a donc pu être réalisée sur cet intervalle de temps avec la garantie que les données analysées étaient peu influencées par un éventuel métabolite radiomarqué du [¹¹C]glyburide.

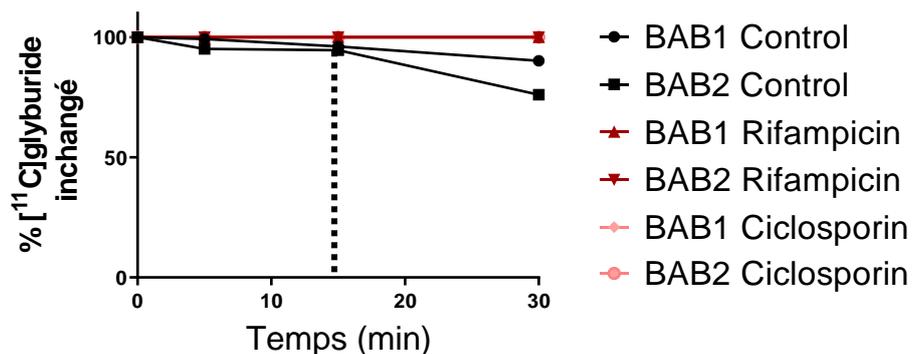


Figure 18 : Métabolisme du [¹¹C]glyburide chez le primate en l'absence et en présence d'inhibiteurs des transporteurs (n = 2 dans chaque condition).

L'ajout des inhibiteurs lors de l'administration du [¹¹C]glyburide a provoqué une diminution importante de l'ASC_R dans le foie (88% et 90% pour la rifampicine, 94% et 90% pour la ciclosporine), les reins (52% et 71% pour la rifampicine, 76% et 71% pour la ciclosporine) et le myocarde (28% et 60% pour la rifampicine, 18% et 69% pour la

ciclosporine) (Figure 19). L'ASC_R était en revanche très faible dans le cerveau et les poumons et aucun impact n'a été détecté dans ces organes.

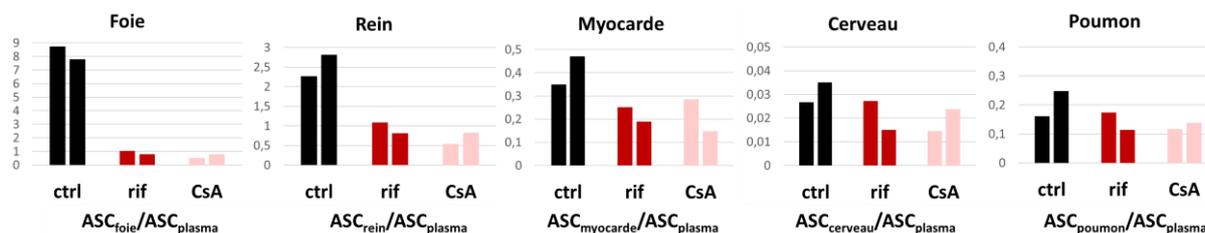


Figure 19 : ASC_R du [¹¹C]glyburide en l'absence (ctrl) et en présence d'inhibiteurs des transporteurs (rif = rifampicine, CsA = ciclosporine) dans les différents tissus analysés chez le primate de 0 à 15 minutes (n = 2 dans chaque condition).

Une diminution de la CL de captation a également été observée dans le foie (93% et 93% pour la rifampicine, 96% et 94% pour la ciclosporine) et le rein (53% et 71% pour la rifampicine, 87% et 81% pour la ciclosporine) (Figure 20). Pour les autres tissus (myocarde, cerveau et poumons) le transfert de [¹¹C]glyburide du sang vers ces tissus était trop faible pour réussir à déterminer leur CL de captation avec précision.

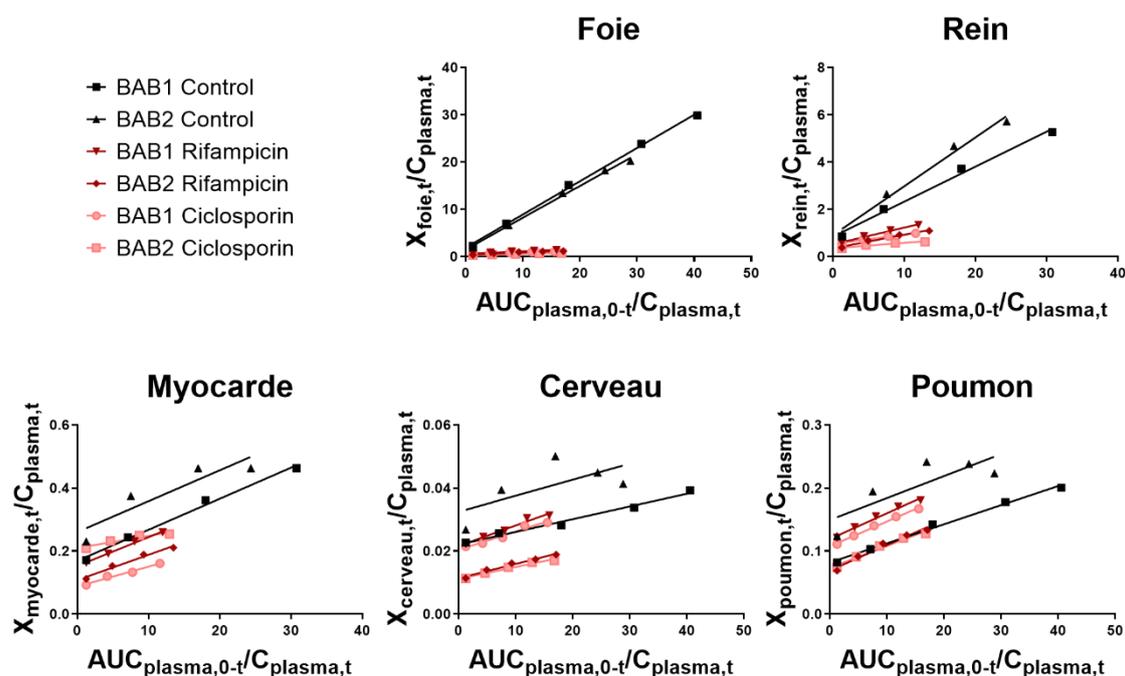


Figure 20 : Transfert du $[^{11}\text{C}]$ glyburide chez le primate du sang vers chacun des tissus évalué de 0 à 12 minutes en l'absence et en présence d'inhibiteurs des transporteurs (n = 2 dans chaque condition).

La clairance de captation (CL) est déterminée par le calcul de la pente de chacune des droites de régression linéaire.

3.1.4. Conclusion et perspectives

Les données obtenues chez le babouin montrent que le $[^{11}\text{C}]$ glyburide est une sonde métaboliquement stable dans sa phase de captation, indépendamment de la présence d'inhibiteurs des OATP. La résolution temporelle limitée de l'acquisition corps-entier n'a pas permis une estimation précise de la clairance de captation dans les organes présentant une captation physiologique faible. Cependant, la détermination de l' ASC_R sur la période de stabilité métabolique (15 premières minutes) semble être une méthode simple et efficace pour quantifier simultanément la distribution du $[^{11}\text{C}]$ glyburide vers plusieurs tissus et ainsi comparer le fonctionnement des OATP à différentes interfaces de l'organisme. Ces résultats confirment que l'implication des OATP dans la distribution tissulaire des médicaments est majoritaire au niveau hépatique. Ce résultat n'est pas surprenant puisque les OATP sont exprimés de façon

importante au niveau de l'interface sinusoidale des hépatocytes et que le [¹¹C]glyburide est transporté par certains d'entre eux (OATP1B1, OATP2B1). Cependant, la méthode de l'ASCR a permis de révéler un rôle des OATP dans d'autres tissus comme le rein ou le myocarde. Il s'agit de la première mise en évidence *in vivo* par l'imagerie de l'impact tissulaire de ces transporteurs au niveau d'autres organes que le foie. Ceci peut s'expliquer par la particularité du [¹¹C]glyburide qui est transporté par des OATP extra-hépatiques (OATP2B1 et OATP1A2) et par la réalisation d'exams d'imagerie dynamiques corps-entier qui n'avaient pas été envisagés jusqu'alors dans le cadre de l'étude des transporteurs OATP (Figure 5). L'imagerie TEP au [¹¹C]glyburide est donc un outil pertinent avec des propriétés pharmacocinétiques propices à l'exploration non invasive et quantitative de la fonction des transporteurs OATP, y compris au niveau extra-hépatique.

Aussi, les résultats obtenus avec la ciclosporine et la rifampicine sur la distribution tissulaire et la pharmacocinétique du [¹¹C]glyburide étaient comparables. La dose de ciclosporine utilisée (15 mg/kg/h IV) correspond à une forte dose clinique, utilisée pour l'induction de l'immunosuppression. La dose de rifampicine (8,6 mg/kg IV) en revanche correspond aux doses cliniques largement utilisées pour l'étude des OATP chez l'Homme (Takashima et al., 2012; Wu et al., 2017). Ainsi, l'utilisation de la rifampicine comme inhibiteur semble être un choix pertinent pour révéler le transport par les OATP du [¹¹C]glyburide chez l'Homme.

3.1.5. Communications

Cette partie du travail a fait l'objet de deux communications orales :

Quantification of hepatic and extrahepatic OATP function using whole-body dynamic ¹¹C-glyburide PET imaging.

Marie S., Auvity S., Stute S., Goutal S., Saba W., Bottlaender M., Kuhnast B., Tournier N. *Congrès de l'Association Européenne de Médecine Nucléaire. Octobre 2018, Düsseldorf (Allemagne).*

Imaging hepatic and extrahepatic OATP function: pharmacokinetic importance for drug delivery to tissues.

Marie S., Auvity S., Stute S., Goutal S., Saba W., Bottlaender M., Kuhnast B., Tournier N. Congrès de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique. Juin 2019, Lyon (France).

3.2. Validation clinique du [¹¹C]glyburide comme sonde OATP

3.2.1. Contexte de l'étude

Les données précliniques obtenues chez le primate ont permis l'obtention d'un financement par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE17-0011) pour la réalisation d'une étude clinique utilisant le [¹¹C]glyburide comme sonde d'imagerie pour l'étude des transporteurs OATP. Cette étude s'intitule « Imagerie fonctionnelle des transporteurs SLCO (Solute Carrier O) chez l'Homme : implication dans la variabilité d'élimination et de distribution tissulaire des médicaments » (acronyme ISOTOPK). Le promoteur est le Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA). Nous avons pour cela rédigé un certain nombre de documents afin de permettre l'autorisation de cette recherche biomédicale de phase I, étant donné que le [¹¹C]glyburide n'avait jamais été administré à l'Homme auparavant. Un protocole de recherche détaillé de l'étude a été préparé afin de soumettre ce projet à l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des Produits de Santé (ANSM), dont l'approbation était indispensable au démarrage de l'étude. Ce protocole présentait les différents acteurs de l'étude, sa justification scientifique, ses objectifs, le schéma expérimental, le nombre de sujets, la population concernée, les critères d'inclusion et d'exclusion et le déroulement pratique de l'étude. Un dossier de médicament expérimental (DME) a également été déposé à l'ANSM pour le [¹¹C]glyburide étant donné que ce radiotracer ne dispose pas d'autorisation de mise sur le marché. Ce dossier décrivait les modalités de préparation et de contrôle mises en œuvre pour la substance active et le produit fini, ainsi que leur caractérisation. Toutes les étapes permettant de garantir une qualité pharmaceutique du produit fini étaient également détaillées (choix des excipients, formulation, conditionnement, contrôles physico-

chimiques et microbiologiques). Le projet a aussi été soumis à un Comité de Protection des Personnes (CPP) qui s'assure que l'éthique des études cliniques est conforme à la réglementation qui encadre les recherches impliquant la personne humaine.

Le recrutement des sujets s'effectue à la fois à l'Hôpital d'Orsay, lieu de réalisation de l'étude, et au Centre de Recherche Clinique de l'Hôpital Bicêtre (AP-HP, Université Paris-Saclay). Les sujets inclus dans l'étude sont des volontaires sains de sexe masculin âgés entre 18 et 30 ans. Chaque sujet est reçu pour une première visite dans le centre où il a été recruté (Hôpital Bicêtre ou d'Orsay) où le médecin investigateur procède à un examen clinique et vérifie les critères d'inclusion et d'exclusion. Un bilan sanguin est réalisé et le volontaire signe un consentement éclairé après explication du protocole. Un rendez-vous est ensuite programmé pour une deuxième visite à l'Hôpital d'Orsay où est réalisé l'examen d'imagerie. Le jour de cette visite le patient est accueilli en début de matinée par l'investigateur principal qui réalise un interrogatoire médical du sujet, vérifie les indications et contre-indications à la participation à l'étude et lui explique le déroulement de l'examen. Le sujet est ensuite emmené à la réanimation de l'hôpital où un cathéter artériel lui est posé sous anesthésie locale (patch Emla®) au niveau de l'artère radiale du poignet controlatéral, de façon à effectuer les prélèvements sanguins pour suivre la concentration en [¹¹C]glyburide dans le sang artériel.

Au retour de la réanimation le patient est installé dans la caméra TEP-IRM (Signa® PET-MR, GE Healthcare) où des acquisitions IRM de localisation sont effectuées. Toutes les étapes de production et de libération pharmaceutique du [¹¹C]glyburide sont réalisées en parallèle des dernières étapes décrites. Une nouvelle méthode de radiosynthèse du [¹¹C]glyburide a été développée spécialement pour cette étude clinique afin d'améliorer la robustesse et la fiabilité suite à plusieurs échecs de synthèse. Néanmoins, nous avons fait le choix de ne pas décrire en détail ce travail dans ce manuscrit car il a été mené principalement par l'équipe de radiochimie du laboratoire. Ces travaux de mise au point de la production radiopharmaceutique du [¹¹C]glyburide ont fait l'objet d'une publication récente dans *Nuclear Medicine and Biology* (Caillé et al., 2020).

Le [^{11}C]glyburide est ensuite pris en charge par l'équipe de radiopharmacie qui procède à une filtration stérilisante avant de le conditionner pour le dispenser au sujet. Les seringues doivent être placées dans des protège-seringues amagnétiques étant donné que le [^{11}C]glyburide est injecté directement sous la caméra, à proximité de l'anneau magnétique de l'IRM. Cette injection est réalisée dans un cathéter veineux qui est posé dans le bras opposé au cathéter artériel. Les prélèvements artériels sont réalisés à partir de l'injection et de façon rapprochée pendant les 5 premières minutes, puis espacés jusqu'à la fin de l'acquisition TEP. La caméra TEP-IRM est déclenchée au moment de l'injection pour une durée de 30 minutes. Le choix de la modalité d'imagerie s'est porté vers la caméra TEP-IRM d'une part parce qu'il s'agit de la caméra la plus récemment installée sur la plateforme de recherche, qui bénéficie d'une excellente sensibilité pour mesurer les concentrations tissulaires de la radioactivité. D'autre part le couplage de la modalité TEP à l'IRM permet d'obtenir des images anatomiques des tissus mous et facilite ainsi le repérage de certains tissus et l'étude de la distribution du [^{11}C]glyburide dans ces tissus qui auraient été difficiles à visualiser par le scanner X. L'acquisition dynamique du corps-entier offre l'avantage de permettre l'étude quasi-simultanée de l'ensemble des organes et de quantifier et comparer directement la distribution du [^{11}C]glyburide vers ces tissus. Cette modalité TEP/IRM présente en plus l'intérêt d'être moins irradiante pour les sujets car contrairement au scanner X (corps-entier ~ 5 mSv), l'IRM ne nécessite pas l'utilisation de rayonnements ionisants.

Après ce premier examen d'imagerie, le sujet est ramené en chambre où il déjeune en attendant la réalisation du deuxième examen qui a lieu en début d'après-midi. Le sujet retourne pour cela à la caméra TEP-IRM où il reçoit cette fois-ci une perfusion de rifampicine (9 mg/kg IV) diluée dans une poche de 500 mL de glucose à 5% perfusée pendant 45 minutes. La dose de rifampicine a été choisie lors de l'élaboration du protocole car il s'agissait de la même dose que celle utilisée pour l'étude préclinique et que cette dose avait permis d'inhiber avec succès les transporteurs OATP au niveau de différentes membranes tissulaires (Tournier et al., 2013). Cette dose est par ailleurs

inférieure à celle recommandée lors de l'utilisation thérapeutique de la rifampicine dans le traitement de la tuberculose (10 mg/kg/j) (Laboratoire Sanofi, 2019) et ne présente donc pas de danger d'utilisation. La dose de 600 mg (8,6 mg/kg pour une personne de 70 kg) a déjà été utilisée chez l'Homme pour des études d'interactions médicamenteuse impliquant les OATP (Benet, 2009).

La production et la libération pharmaceutique du [¹¹C]glyburide sont à nouveau réalisées en parallèle de ces étapes car la très courte période physique du carbone-11 ne permet pas d'utiliser une seconde fois le [¹¹C]glyburide produit le matin. Les modalités d'injection, de prélèvements et d'acquisition du [¹¹C]glyburide sont identiques à celles du matin et le sujet est renvoyé en chambre à la fin de l'examen. Les cathéters sont retirés et le sujet est autorisé à quitter le service en fin d'après-midi après un temps de surveillance et un bilan avec le médecin investigateur.

Ce projet complexe et multidisciplinaire implique la participation et la synchronisation minutieuse d'un grand nombre de personnes apportant chacune leur expertise : médecins, radiopharmaciens, infirmiers, manipulateurs en électroradiologie médicale, radiochimistes, cyclotronistes, physiciens, techniciens. La première injection à l'Homme (« first-in-human ») a été réalisée à l'Hôpital d'Orsay le 13 avril 2018. A ce jour 11 patients ont été inclus dans l'étude. Cependant, différents problèmes ont été rencontrés au cours de ces deux années et seuls quatre sujets ont pu réaliser des images au [¹¹C]glyburide exploitables. Trois d'entre eux ont reçu de la rifampicine et ont pu participer à l'étude jusqu'à la fin du protocole. Le recrutement est toujours en cours et certains sujets sont actuellement en attente de participation au protocole suite à la période d'arrêt liée à l'épidémie de Covid-19. Les résultats obtenus pour l'instant ne sont pas suffisants pour être publiés et les nouvelles données seront nécessaires pour consolider ces résultats. Néanmoins, nous avons décidé de présenter les résultats préliminaires de cette étude sous forme d'un « article en préparation » qui sera par la suite actualisé et complété.

3.2.2. Article n°3 (en préparation) : Validation of [¹¹C]glyburide as PET probe for imaging OATP function in Humans

Validation of [¹¹C]glyburide as PET probe for imaging OATP function in Humans.

Marie S.^{1,2,3}, Chalampalakis Z.¹, Breuil L.¹, Becquemont L.⁴, Goislard M.¹, Caillé F.¹, Comtat C.¹, Bottlaender M.¹, Tournier N.¹

1. Université Paris-Saclay, CEA, Inserm, CNRS, BioMaps, Service Hospitalier Frédéric Joliot, 4 place du Général Leclerc, 91401 Orsay, France

2. Département de Pharmacie Clinique, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France

3. AP-HP. Université Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre, Pharmacie Clinique, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France

4. AP-HP. Université Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre, Centre de Recherche Clinique, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France

Introduction

Pharmacokinetic (PK) studies are mainly based on the time-concentration profile of drugs and their metabolites in plasma and body fluids, which is the resultant of drug absorption, distribution, metabolism, and elimination. However, from a perspective of drug efficacy or toxicity, it is the target tissue concentration rather than plasma concentration that is the most relevant (Rizk et al., 2017). It is often hypothesized that passive diffusion is the main transport mechanism allowing for drug exposure to organs. The identification of membrane transporters at many blood-tissue interfaces suggests that penetration of drugs to tissues may be controlled by active carrier-mediated processes which could not be directly determined from plasma PK profile (McFeely et al., 2019).

Influx transporters of the Solute Carrier (SLC) superfamily enable the membrane transfer of many endogenous and exogenous compounds between blood and tissues. Transporters of the OATP (Organic Anion-Transporting Polypeptide) family are known to mediate the hepatic uptake of many drugs (Kovacsics et al., 2016). Liver OATP include OATP1B1, OATP1B3 and OATP2B1. OATP1B1 and OATP1B3 are assumed to be

liver-specific although extra-hepatic expression of OATP1B3 has been reported (Kim et al., 2017). Expression of OAT2B1 is predominant in the liver but was also detected in non-clearance organs including human myocardium, blood-brain barrier (BBB), epithelial lung cells, ovary, mammary duct and muscles, suggesting a functional role for OATP in controlling the access of compounds to these potential targets and/or vulnerable tissues (Hagenbuch and Stieger, 2013). Extra-hepatic OATP of relevance for PK also include several other members such as OATP1A2 which expression has been detected in brain, liver, lung, kidney and testes (Roth et al., 2012).

Glyburide (glibenclamide, 5-chloro-N-[2-[4-(cyclohexylcarbamoylsulfamoyl)phenyl]ethyl]-2-methoxybenzamide) is a hypoglycemic agent commonly used in the treatment of noninsulin-dependent diabetes (Mack and Tomich, 2017). Glyburide inhibits sulfonylurea receptor 1 (SUR1, ABCC8), the regulatory subunit of the pancreatic potassium efflux channel (K_{ATP}) which induces release of insulin (Ashcroft, 1996). Several *in vitro* studies have shown that glyburide is substrate for OATP2B1 and in a lesser extent, for OATP1A2 and OATP1B1 (Koenen et al., 2012; Satoh et al., 2005).

A preclinical study carried out in non-human primates with glyburide labeled with carbon-11 ($[^{11}C]$ glyburide) for positron emission tomography (PET) demonstrated that rifampicin, a potent OATP inhibitor, influenced the PK and tissue distribution of $[^{11}C]$ glyburide *in vivo*, consistent with the expression of OATP in the liver and several other tissues (Tournier et al., 2013). PET imaging confirmed the critical role of OATP in the liver kinetics of $[^{11}C]$ glyburide because its hepatic distribution was dramatically decreased (-93% in AUC_{liver}/AUC_{plasma}) after inhibition of the OATP transporters by rifampicin. OATP-mediated uptake also occurred in the myocardium and renal cortex (-41% and -61% for $AUC_{myocardium}/AUC_{plasma}$ and $AUC_{kidney}/AUC_{plasma}$ respectively), consistent with the local expression of OATP2B1 and OATP1A2. The observation of this extra-hepatic OATP-mediated transport adds a new layer of comprehension on the role of OATP compared with previous OATP probes which are predominantly transported

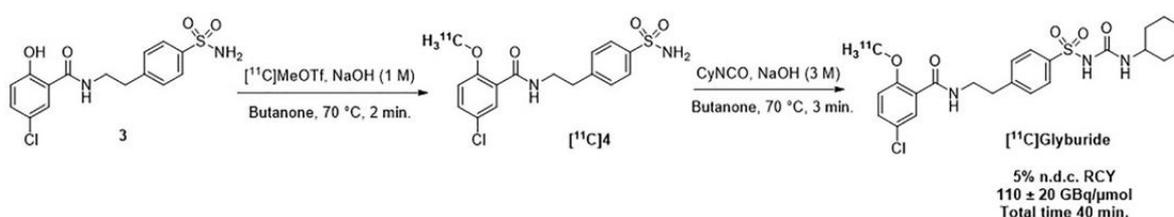
by liver-specific OATP1B1 and OATP1B3 (Hernández Lozano and Langer, 2020; Marie et al., 2017).

The clinical translation of this [^{11}C]glyburide PET imaging protocol was investigated as a tool to minimally-invasively investigate and compare hepatic and extra-hepatic OATP function in humans. To this end, we performed a PET study in healthy volunteers with [^{11}C]glyburide to develop and validate this radiotracer as a new clinical probe. The OATP-mediated transport capacity was unveiled by inhibiting the OATP activity with rifampicin. An original and innovative whole-body dynamic acquisition approach using a PET-MR (magnetic resonance) system enabled the simultaneous detection, quantification and direct comparison of [^{11}C]glyburide distribution between tissues.

Materials and Methods

Radiosynthesis of [^{11}C]glyburide

[^{11}C]glyburide was synthesized with a new automated two-step method described recently (Figure 21) (Caillé et al., 2020). Automated radiosynthesis with carbon-11 was performed using a TRACERlab[®] FX C Pro (GE Healthcare, Buc, France). [^{11}C]CO₂ was subsequently reduced to [^{11}C]CH₄ and iodinated to [^{11}C]CH₃I and finally converted to [^{11}C]CH₃OTf for the first step of methylation of the precursor (5-chloro-2-hydroxy-N-(4-sulfamoylphenethyl)benzamide). The second step consisted in a reaction with cyclohexyl isocyanate heated at 70°C for 3 minutes.



**Figure 21 : Automated two-step radiosynthesis of [^{11}C]glyburide.
(Caillé et al., 2020)**

Purification was realized by reverse phase semipreparative HPLC (Waters Symmetry[®] C18 7.8 × 300 mm, 7 μm) using a mixture of water/acetonitrile/TFA (45/55/0.1 v/v/v, 5 mL/min) as eluent. The purified compound was diluted with water (20 mL) and passed through a Sep-Pak[®] C18 cartridge (Waters, USA). The cartridge was rinsed with water (10 mL), eluted with ethanol (2mL) and the final compound was diluted with saline (0.9% w/v, 18 mL) before filtration under a laminar flow hood using a 0.22 μm Millex[®] GV filter (Merck, USA). [¹¹C]glyburide quality controls were compliant with the Pharmacopeia requirements. The radiochemical purity was 100% for every radiosynthesis and the specific radioactivity ranged from 4 to 17 GBq/μmol.

Subjects and study design

Enrolment of patients was bicentric (Hôpital Bicêtre and Service Hospitalier Frédéric Joliot) but the imaging sessions were monocentric at the Service Hospitalier Frédéric Joliot. The study protocol was approved by the French health agency (Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des Produits de Santé) and an Ethic Committee (EudraCT number 2017-001703-69). All subjects had a first medical exam where the inclusion criteria were checked by the clinical investigator. A written informed consent was signed after the subjects received the information about the study. The imaging protocol took place on a single day (Figure 22). An intravenous bolus of [¹¹C]glyburide was injected in the morning and a second intravenous bolus of [¹¹C]glyburide was injected in the afternoon after infusion of rifampicin (Rifadin[®], Sanofi, France, 9 mg/kg diluted in glucose 5% perfused within 45 minutes of [¹¹C]glyburide injection).

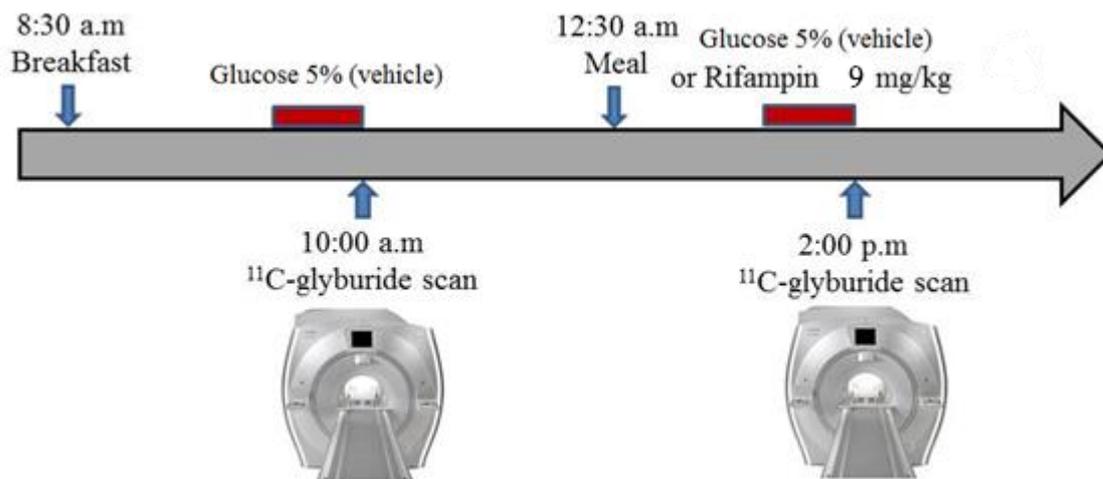


Figure 22 : Imaging protocol of the clinical study with [¹¹C]glyburide.

Three young (23.8 ± 1.2 years) and healthy males received [¹¹C]glyburide (126 ± 55 MBq IV). Their body weight was 73 ± 7 kg.

PET imaging

Whole-body dynamic acquisitions were performed using a Signa[®] PET/MR camera (GE Healthcare, Buc, France). An arterial catheter was inserted in one arm, for arterial blood sampling, and a venous catheter in the other arm for [¹¹C]glyburide injection. Subjects were installed on the camera bed and MR localization acquisitions were performed. A first arterial blood sample was collected before [¹¹C]glyburide injection. PET acquisition began with the injection of [¹¹C]glyburide (1 min bolus). The first 4 minutes monobed acquisition were focused on the abdomen (14 frames of 17 seconds), immediately followed by repeated whole-body acquisitions performed over the next 26 minutes (5 beds, 11 frames of 2.5 minutes). Arterial blood samples were collected every 25 seconds in the first 4 minutes and at 5, 7, 10, 15, 20 and 30 minutes post-injection.

[¹¹C]glyburide plasma analysis

[¹¹C]glyburide plasma concentrations were estimated from the arterial samples by counting whole-blood (100 μ L) and plasma (200 μ L) with a gamma counter (Cobra[®], Packard, Meridian, CT). Plasma samples obtained at 5, 10, 15 and 30 minutes were deproteinized with acetonitrile and injected into an UV/radioactive-HPLC system.

[¹¹C]glyburide was separated from its radiometabolites using a C18 semipreparative (10×250 mm, 10 μm) Atlantis[®] column (Waters, France). The mobile phase consisted of 10 mM ammonium acetate in purified water (A) and acetonitrile (B). The gradient elution of B from 20% at 0 min to 90% at 12 min was applied to the column. The [¹¹C]glyburide fraction bound to plasma protein (f_b) with and without rifampicin infusion was estimated on the first sample (obtained before injection of [¹¹C]glyburide). Plasma sample was added ~4 MBq of [¹¹C]glyburide and f_b was determined as previously described using a validated ultrafiltration method (MPS Micropartition Microcon[®]-YM-10 membrane, Millipore, France) (Tournier et al., 2012).

Analysis of PET data

PET images were reconstructed using a 3D reconstruction algorithm and the data were corrected from radioactivity decay and built-in MR-guided attenuation. Volumes of interest (VOI) were delineated for 11 tissues (liver, left kidney, right kidney, spleen, myocardium, aorta wall, pancreas, brain, muscle, eyes and testis) detected with either PET or MR images using the PMOD[®] software (version 3.9, PMOD Technologies LLC, Switzerland). An additional VOI was delineated on aorta and ventricles to assess the image-derived blood pool concentration of [¹¹C]glyburide. Time–activity curves (TAC) were generated by calculating the mean radioactivity in these VOI (kBq/cc). Standardized uptake values (SUV) were generated by correcting the radioactivity in the VOI for injected dose and body weight. Areas under the TAC (AUC, SUV.min) were calculated from 0 to 30 minutes for each TAC using a linear trapezoidal method. [¹¹C]glyburide distribution from plasma to tissues was assessed by calculating the ratios of the AUC of each tissue to the AUC of image-derived blood ($AUC_R = \frac{AUC_{tissue}}{AUC_{blood}}$). A supplementary VOI was drawn on the urinary bladder to assess the urinary clearance of [¹¹C]glyburide ($CL_{urine} = \frac{X_{urinary\ bladder,30min}}{AUC_{blood,0-30min}}$ with $X_{urinary\ bladder,30min}$ corresponding to the amount of [¹¹C]glyburide in the urinary bladder at 30 minutes).

Statistical analysis

Data were calculated as the mean \pm SD (standard deviation) for 3 or 4 determinations. A linear regression was used to assess the correlation between arterial blood samples and image-derived blood data. A paired *t*-test was used to identify significant differences before and after rifampicin-treatment on [¹¹C]glyburide kinetics. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism[®] software (version 8.4, San Diego, CA, USA).

Results

Plasma analysis

[¹¹C]glyburide was very weakly and slowly metabolized. Unchanged [¹¹C]glyburide accounted for more than 90% of the plasma radioactivity over PET acquisition (Figure 23). Radiometabolites were nonetheless detected in baseline conditions at 10 minutes ($9.3 \pm 6.3\%$ of radiometabolites). Radiometabolite could hardly be detected in the presence of rifampicin (maximum $6.1 \pm 1.2\%$ at 10 minutes). Accurate quantification of the radiometabolites fraction was difficult given their weak signal in radio-HPLC. It was therefore decided not to correct the arterial input function from the radiometabolites for the PET analysis because of their limited impact on PET quantification.

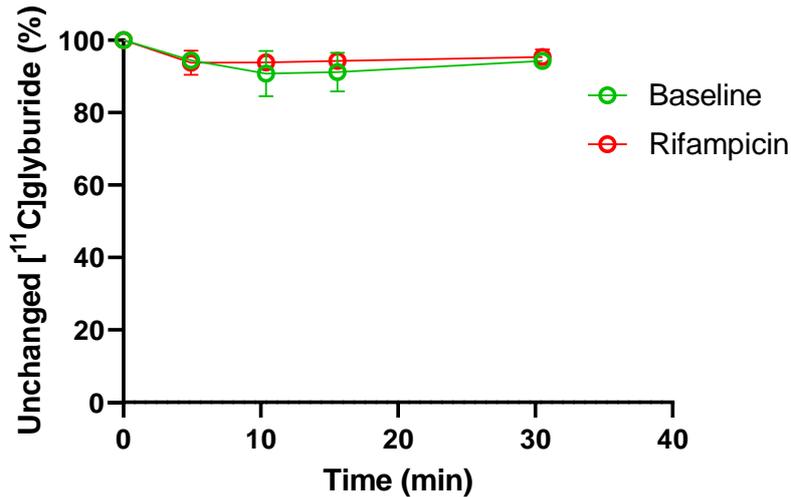


Figure 23 : [¹¹C]glyburide metabolism in healthy volunteers in presence and absence of rifampicin (n = 3).

Data are presented as mean percentages \pm SD of unchanged [¹¹C]glyburide in plasma *vs* time after IV injection of [¹¹C]glyburide in baseline conditions and after rifampicin infusion (9 mg/kg IV).

[¹¹C]glyburide is known to be highly bound to plasmatic proteins (Olsen et al., 1995). The binding was higher than 98% in all subjects. The rifampicin infusion did not significantly alter the protein binding which was $98.9 \pm 1.3\%$ and $99.1 \pm 1.4\%$ in baseline and rifampicin-treated groups respectively, n = 3.

Correlation in [¹¹C]glyburide concentrations measured from blood samples and image-derived input function (IDIF) is presented in Figure 24. Linear regression was calculated for each group and confirmed the linear relationship between both measurement methods ($R^2 = 98.6\%$ in baseline conditions, $R^2 = 96.8\%$ after treatment by rifampicin and $R^2 = 97.9\%$ with both conditions together). Nevertheless, the slopes were lower than 1 (0.83 and 0.76 in baseline and rifampicin-treated groups respectively) which means that the concentrations of [¹¹C]glyburide obtained with PET imaging are slightly lower than the concentrations measured from blood sampling. Image-derived data nonetheless may be applied to the PET pharmacokinetic analysis. This correlation must be demonstrated on a greater number of subjects but these results are promising to validate a quantification method using an IDIF for [¹¹C]glyburide.

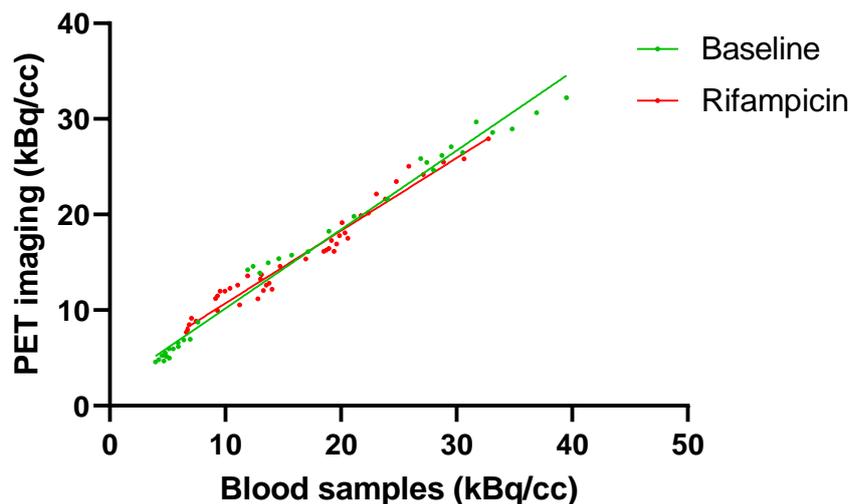


Figure 24 : Correlation of whole-blood concentrations of [¹¹C]glyburide (kBq/cc) obtained with gamma counting of blood samples and PET imaging quantification in the baseline and the rifampicin-treated groups (n = 3).

Kinetics of [¹¹C]glyburide

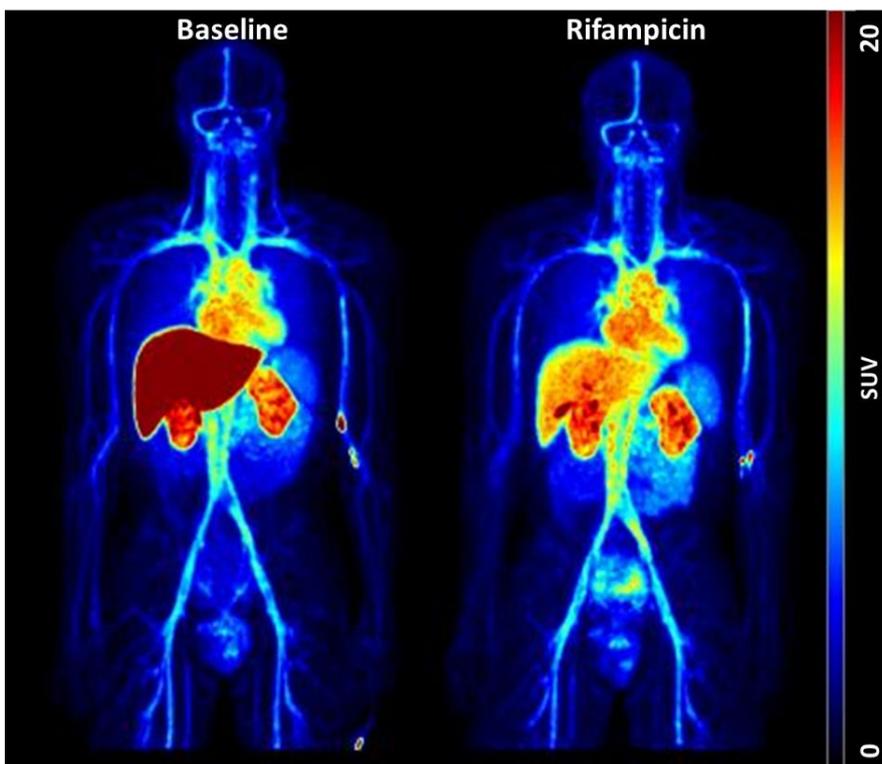


Figure 25 : Whole-body PET images of [¹¹C]glyburide distribution in baseline condition and after treatment with rifampicin (9 mg/kg IV) in a healthy volunteer.

Images are the maximum intensity projections of the frames summed from 0 to 30 minutes and are expressed in Standardized Uptake Values (SUV).

Representative PET images of the whole-body distribution of [^{11}C]glyburide with and without rifampicin are shown in Figure 25. Under baseline conditions, [^{11}C]glyburide is characterized by slow but predominant uptake by the liver ($\text{SUV}_{\text{max}} = 18.7 \pm 2.7$ at 30 minutes, Figure 26) but also substantial distribution to the kidneys ($\text{SUV}_{\text{max}} = 8.0 \pm 0.7$ and 8.6 ± 1.1 for left and right kidneys respectively between 10 and 20 minutes, Figure 26). A lower uptake was observed in spleen, aorta wall and pancreas. Uptake by other tissues was associated with high variability, probably due to the poor signal counting in these tissues (Figure 26).

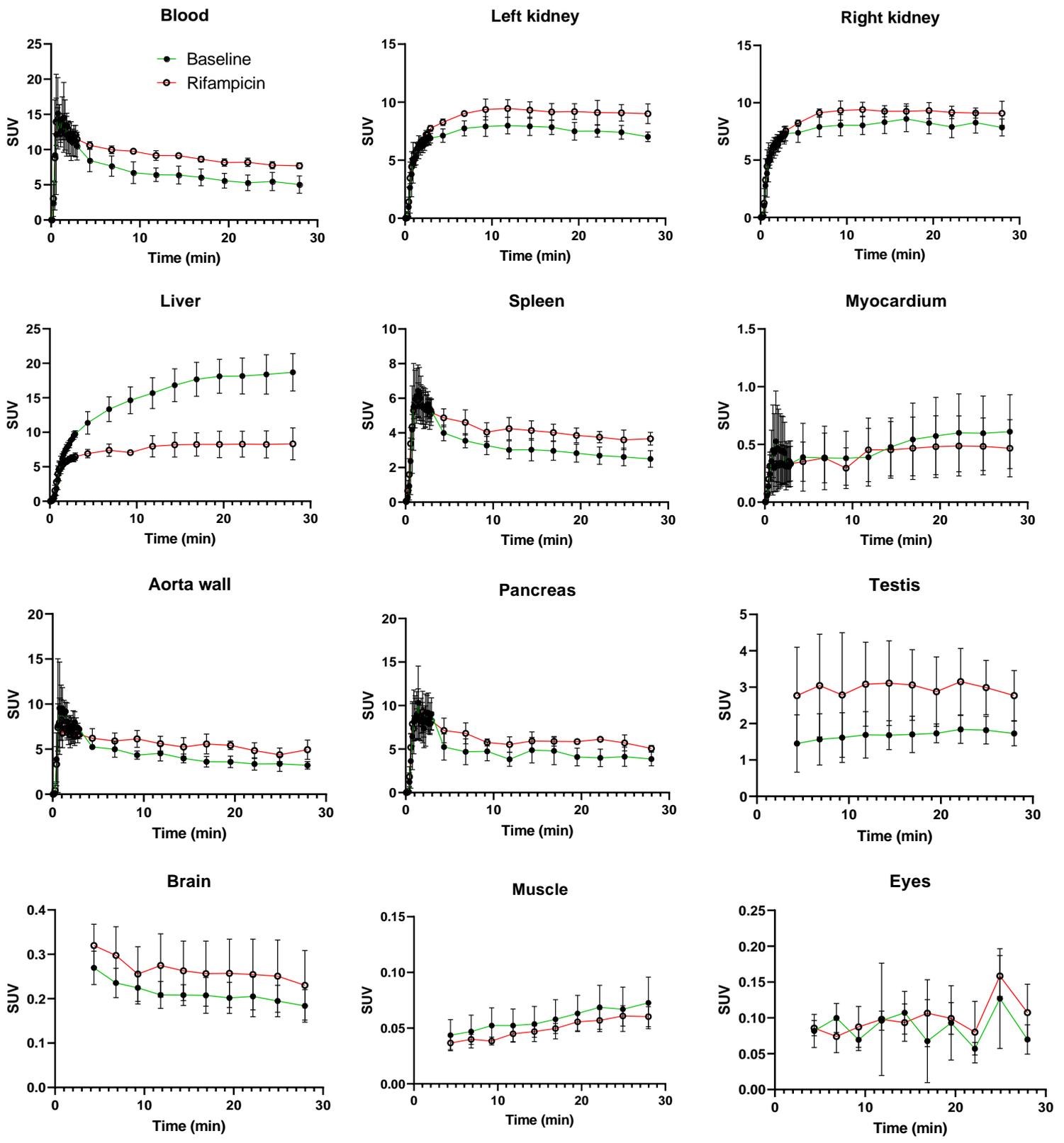


Figure 26 : Time-activity curves obtained in different VOI after injection of [¹¹C]glyburide in baseline conditions and after treatment with rifampicin (9 mg/kg IV).

Data are mean ± SD (n = 3)

Treatment by rifampicin visually increased $[^{11}\text{C}]$ glyburide blood concentration (Figure 25). This observation was confirmed by TAC because $[^{11}\text{C}]$ glyburide mean TAC was higher in rifampicin-treated than in baseline conditions (Figure 26). For all subjects, $\text{AUC}_{\text{blood},0-30\text{min}}$ was significantly higher ($p = 0.046$) after treatment with rifampicin (+17% for subjects 1 and 3, + 42% for subject 2) (Figure 27).

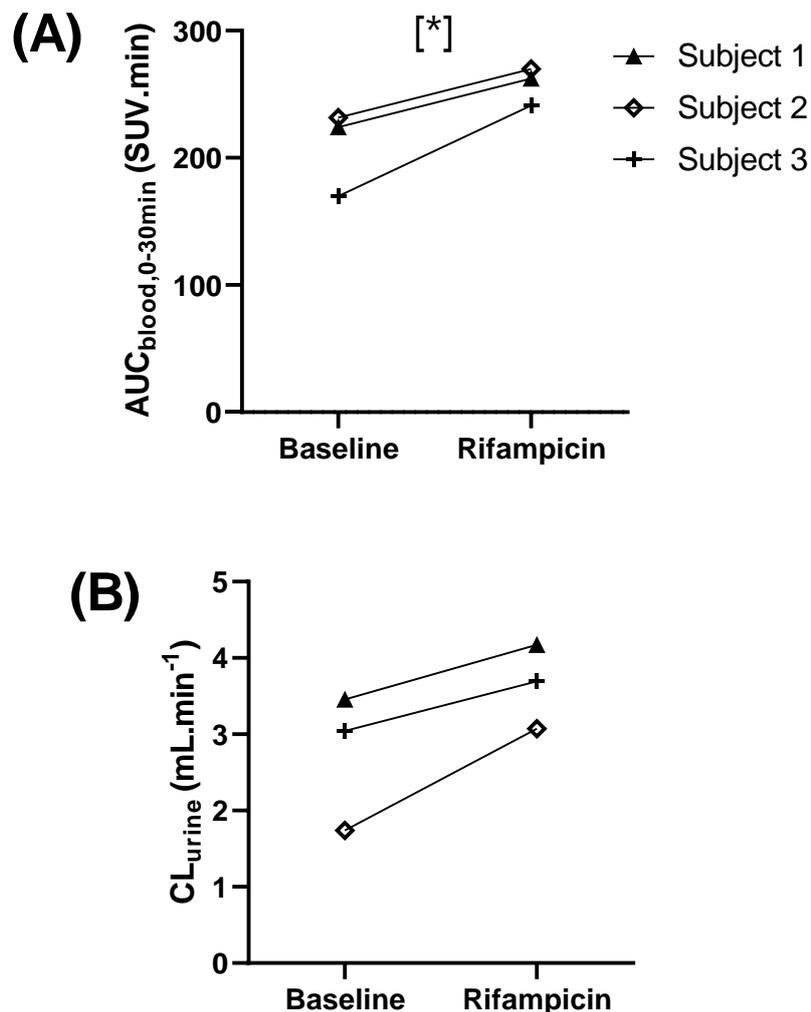


Figure 27 : (A) $\text{AUC}_{\text{blood}}$ $[^{11}\text{C}]$ glyburide blood TAC measured from 0 to 30 minutes before and after injection of rifampicin (9 mg/kg IV) for each healthy volunteer. (B) CL_{urine} of $[^{11}\text{C}]$ glyburide at 30 minutes for each volunteer before and after injection of rifampicin (9 mg/kg IV).

Data derived from the PET imaging (*, $p < 0,05$, paired t -test)

The urinary clearance of [^{11}C]glyburide was also slightly increased for all subjects but the change was not significant ($p = 0.053$) (Figure 27).

At the tissue level, [^{11}C]glyburide kinetics were highly impacted in the liver by rifampicin treatment (Figure 26) with a significant decrease in $\text{AUC}_{\text{R,liver/blood}}$ from -55% to -65% ($p = 0.03$) compared with baseline (Figure 28). In the kidneys and spleen, the AUC_{R} were slightly decreased after treatment with rifampicin, and was statistically significant in the right kidney ($p = 0.02$) but neither in left kidney ($p = 0.24$) nor in the spleen ($p = 0.069$). In other tissues, no impact of rifampicin was identified on [^{11}C]glyburide kinetics but the very poor radioactivity signal detected in these tissues may impair accurate quantification. However, it is noteworthy that in contrast to all other tissues, radioactivity in muscle and myocardium was lower in rifampicin-treated conditions than in baseline conditions (Figure 26), although not significant (Figure 28).

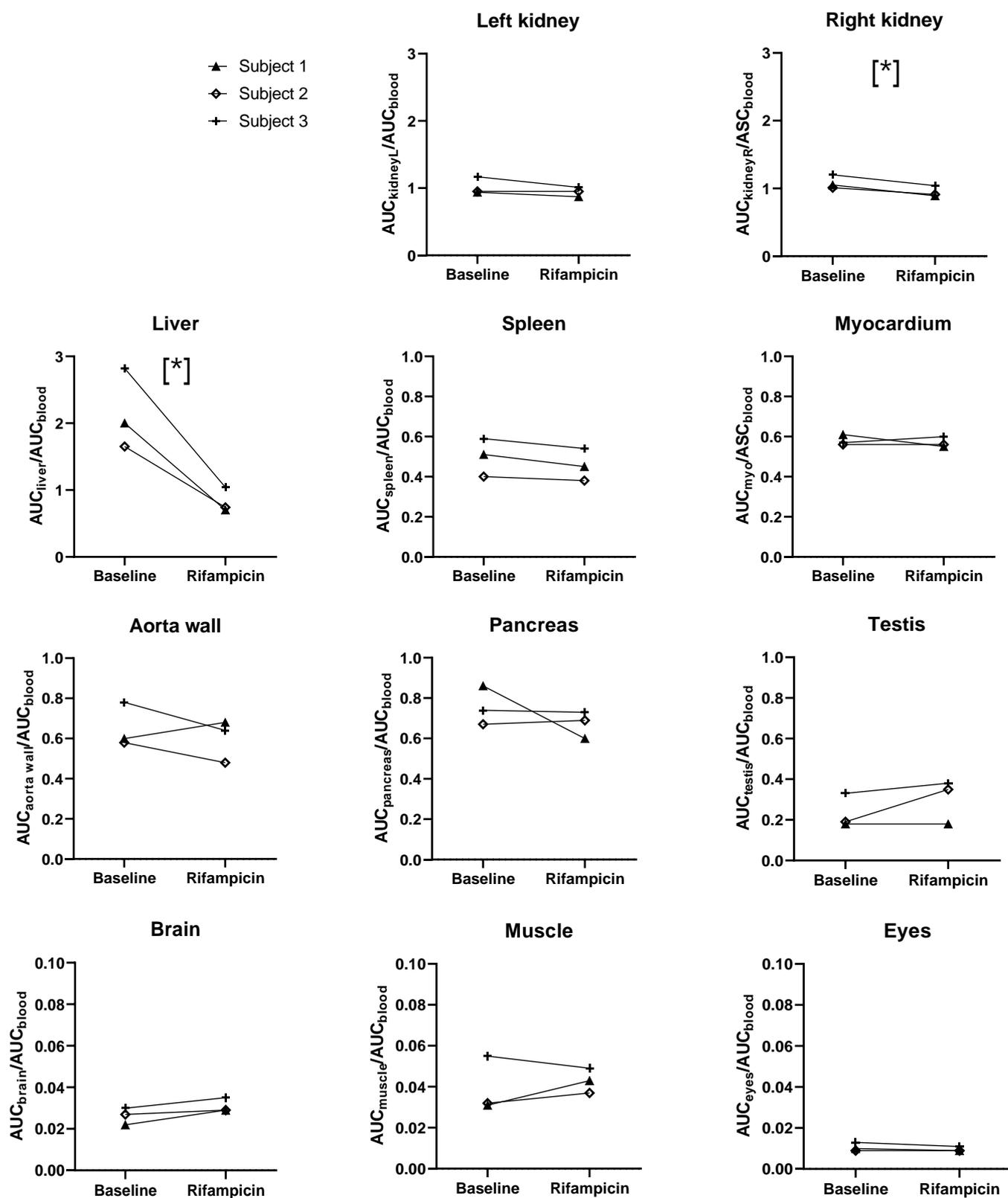


Figure 28 : Evolution of the area-under the curves ratios for each tissue (AUC_{tissue}/AUC_{blood}) of $[^{11}C]$ glyburide TAC measured from 0 to 30 minutes for every healthy volunteers before and after injection of rifampicin (9 mg/kg IV).

Blood data are derived from the PET imaging (*, $p < 0,05$, paired t -test)

Discussion – Conclusion

Imaging OATP function is an emerging approach to investigate these transporters in a translational way. Several PET imaging probes have been developed in recent years (Hernández Lozano and Langer, 2020). Five probes have already been validated in Humans : (15*R*)-[¹¹C]TIC-Me, [¹¹C]dehydropravastatin, [¹¹C]telmisartan, [¹¹C]rosuvastatin and [¹¹C]erlotinib (Billington et al., 2019; Kaneko et al., 2018; Maeda et al., 2019; Takashima et al., 2012). [¹¹C]glyburide has been developed as an OATP probe in a preclinical study and demonstrated good pharmacokinetic properties in non-human primates (Tournier et al., 2013).

In non-human primate, peripheral metabolism was slow (~80% unchanged at 30 minutes and ~70% unchanged at 60 minutes) and negligible in the 10 first minutes, allowing for an accurate quantification of [¹¹C]glyburide uptake within this initial time-frame. Radiometabolites were absent in presence of rifampicin, suggesting an interplay between OATP transporters and metabolic enzymes in controlling [¹¹C]glyburide metabolism *in vivo*. In Humans, our data show that [¹¹C]glyburide is very poorly metabolized (< 10%) which facilitates analysis and interpretation of PET data over a larger time-frame (30 min). This metabolic stability contrasts with previous OATP probes that were extensively metabolized. Radiometabolites of [¹¹C]dehydropravastatin were predominant in human blood at 30 minutes. (15*R*)-[¹¹C]TIC-Me is a prodrug that is rapidly metabolized into (15*R*)-[¹¹C]TIC (10 minutes) which is the OATP substrate, and for which another radiometabolite becomes predominant after 20 minutes (Kaneko et al., 2018; Takashima et al., 2012).

Metabolic stability of [¹¹C]glyburide prompted us to validate an IDIF strategy. [¹¹C]glyburide concentrations derived from the PET-derived blood-pool were therefore compared with corresponding blood samples for all subjects in both conditions (without and with rifampicin). The correlation between data was excellent in both conditions which justified the use of IDIF for further analysis. One advantage of IDIF is that the time framing is the same for blood and tissues. Furthermore, this will allow to

study OATP function without arterial catheter, which is complicated and potentially harmful procedure. Moreover, manual plasma sampling during dynamic whole-body acquisitions is complicated by the movements of the bed in the PET-MR tunnel.

To the best of our knowledge, it is the first application of PET-MR whole-body dynamic imaging for the study of dynamic processes such as PK and drug-drug interaction (DDI). Compared with current static or whole-body acquisition performed using PET-CT scanners, dynamic whole-body imaging PET-MR reduces volunteer exposure to radiation, ensures accurate delineation in organs including soft tissues and takes physiological motions into account. This original method ensures the quantification of [¹¹C]glyburide in several organs in a parallel manner, allowing for direct comparison of transporter function between organs in each individual.

Given the slow uptake of [¹¹C]glyburide to tissues and the negligible proportion of radiometabolites over 30 minutes, it was decided to study the distribution of [¹¹C]glyburide by calculating the AUC_R from 0 to 30 minutes. Liver distribution of [¹¹C]glyburide in humans was sensitive to the inhibition by rifampicin with a ~60% decrease in AUC_{R,liver/blood}. For comparison, only 25% decrease in the uptake of [¹¹C]erlotinib was observed after treatment by rifampicin (600 mg IV), 45% for (15*R*)-[¹¹C]TIC and 58% for [¹¹C]dehydropravastatin (both using rifampicin 600 mg *per os*).

[¹¹C]glyburide is a poorly permeable, highly lipophilic compound, with high binding to plasma proteins. Thus, transport of [¹¹C]glyburide across membranes was hypothesized to be predominantly governed by OATP-mediated transport. However, AUC_{R,liver/blood} of [¹¹C]glyburide after OATP inhibition was less than unity (0.83 ± 0.19), which is higher than the hepatic blood volume in the healthy human liver (20.5 mL.100cm⁻³) (Taniguchi et al., 1996). Remaining radioactivity in the liver in the presence of rifampicin does not only reflect the hepatic vascular bed and may include distribution of [¹¹C]glyburide to hepatocytes. Further experiments are therefore needed to assess whether distribution of [¹¹C]glyburide to the liver in the presence of rifampicin corresponds to remaining

OATP activity or passive diffusion of the radiotracer, which would be consistent with the plateau of liver concentration observed after 5 minutes scanning only (Figure 26).

The number of subjects included in the study so far is too low to conclude on the importance of OATP transporters in tissues other than the liver. It can nonetheless be observed that the kinetics of [¹¹C]glyburide in the myocardium and muscle visually differs from other tissues that seems to follow the IDIF. Involvement of OATP in the muscle would be consistent with the muscular rhabdomyolysis induced by statins, a class of cholesterol-lowering drugs, that are transported by OATP2B1 (Knauer et al., 2010). This transporter-mediated toxicity may therefore involve both the OATP-mediated liver elimination and its distribution to vulnerable tissues. A significant effect of rifampicin was observed in [¹¹C]glyburide myocardium kinetics in non-human primates (-41%) (Tournier et al., 2013), consistent with the expression of OATP2B1 in this tissue (Grube et al., 2006b). A significant response to rifampicin inhibition was also observed in kidneys (-66%) whereas only a discrete decrease was observed in the three healthy volunteers (Figure 28). Additional subjects will be necessary to conclude to the role of OATP in these organs. It can nonetheless be stated that this effect will be lower than that observed in non-human primates. $AUC_{\text{tissue}}/AUC_{\text{blood}}$ calculated from 0 to 30 minutes provides a simple and pragmatic method to compare the tissue distribution of [¹¹C]glyburide in humans and was validated using the liver as a model of OATP-expressing organ. However, this method may not be applicable for organs with lower uptake and PET signal, in which kinetic modeling may be necessary. It is also possible that different kinetic models, consistent with the physiology of each investigated organs, may be needed to explore the importance of OATP from these whole-body dynamic images.

This ability of [¹¹C]glyburide to reflect the extra-hepatic OATP activity is mainly attributable to its transport by OATP2B1 and OATP1A2 which are ubiquitously expressed. This particularity confers an originality to [¹¹C]glyburide to investigate the kinetic impact of rifampicin OATP inhibition with the whole-body imaging approach,

to explore tissues other than the liver. The present clinical study with [¹¹C]glyburide is the first to address this hypothesis in Humans. From the first three subjects, the baseline uptake of [¹¹C]glyburide is very low and the sensibility to inhibition limited compared with the liver. On one hand, this reinforces the observation made in the liver relative to the ability of [¹¹C]glyburide to study OATP-function at the blood-tissue level in humans. On the other hand, this suggests that the importance of extra-hepatic OATP function in these tissues, which impact is minor, is not relevant from a PK perspective.

Our data also enabled the study of [¹¹C]glyburide distribution across the BBB. [¹¹C]glyburide is transported by efflux transporters from the ATP-Binding Cassette (ABC) family such as the P-glycoprotein (P-gp, ABCB1), the breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) and some multidrug resistance-associated proteins (MRP1, MRP3, ABCC1, ABCC3) (Cygaloova et al., 2009; Gedeon et al., 2006; Hemauer et al., 2010; Pollex et al., 2008; Tournier et al., 2013; Zhou et al., 2008). It may be hypothesized that efflux transport of [¹¹C]glyburide at the BBB may counteract its uptake transport by OATP2B1 at the same interface (Tournier et al., 2013). [¹¹C]glyburide may therefore not be suited to study the importance of OATP-function at the BBB.

The $AUC_{\text{brain}}/AUC_{\text{blood}}$ of [¹¹C]glyburide in humans is extremely low (< 0.04) and corresponds to the vascular bed of the brain tissue (Marie et al., 2019). This confirms that this compound does not pass the intact BBB, regardless of the presence or the absence of inhibitor of OATP function.

Finally, the present clinical studies enabled direct visualization of the whole-body PK of glyburide, which allows for monitoring of drug levels in target tissue such as the pancreas. OATP transporters did not seem to be involved in [¹¹C]glyburide uptake by the pancreas, despite reported expression of OATP1B3 in pancreatic tissue (Kim et al., 2017). The 1.29-fold increase in pancreatic exposure (AUC_{pancreas} , Figure 26) to [¹¹C]glyburide following inhibitor treatment follows the 1.33-fold increase in plasma exposure. This illustrates the consequences of drug-drug interactions between glyburide and OATP inhibitors at the hepatocyte level. This has been described in

patients in whom the hypoglycemic effects for glyburide were enhanced when rifampicin was co-administered (Zheng et al., 2009).

It is noteworthy that the CL_{urine} of [^{11}C]glyburide was consistently increased in the three subjects, although non-significant. This would mitigate the impact of liver OATP inhibition on the plasma exposure to [^{11}C]glyburide, as previously reported for [^{11}C]erlotinib (Bauer 2018). The role of OATP expressed in the kidneys such as OATP4C1 is not well understood. It is possible that rifampicin may increase CL_{urine} of [^{11}C]glyburide by reducing renal reabsorption. Experiments in a larger number of individuals will be necessary to investigate a potential compensation of the decreased hepatobiliary clearance by increased urinary clearance, and address the proportion of radiometabolites in urine.

3.2.3. Communications

Bien que cette partie du travail n'ait pas encore été publiée, elle a été acceptée pour une communication orale :

Validation of [^{11}C]glyburide as PET probe for imaging OATP function in humans.

Marie S., Breuil L., Chalampalakis Z., Becquemont L., Goislard M., Caillé F., Comtat C., Bottlaender M., Tournier N.

Congrès de l'Association Européenne de Médecine Nucléaire. Octobre 2020, Virtual Meeting.

Les données issues du premier sujet ayant reçu du [^{11}C]glyburide (images first-in-human), qui montraient pour la première fois le faible passage cérébral du glyburide chez l'Homme, ont été publiées dans la revue *Neurology* :

^{11}C -glyburide PET Imaging Unveils the Negligible Brain Penetration of Glyburide in Humans.

Marie S., Comtat C., Caillé F., Becquemont L., Bottlaender M., Tournier N.

Neurology. Avril 2019, 92(17):813-814.

(Marie et al., 2019)

^{11}C -glyburide PET imaging unveils the negligible brain penetration of glyburide in humans

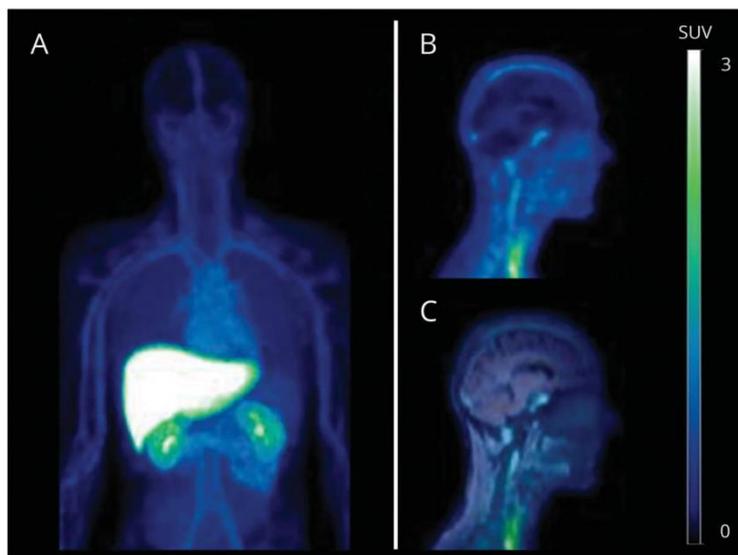
Solène Marie, PharmD, Claude Comtat, PhD, Fabien Caillé, PhD, Laurent Becquemont, MD, PhD, Michel Bottlaender, MD, PhD, and Nicolas Tournier, PharmD, PhD

Neurology® 2019;92:813-814. doi:10.1212/WNL.0000000000007378

Correspondence

Dr. Tournier
nicolas.tournier@cea.fr

Figure Biodistribution of ^{11}C -glyburide



Summed PET projection (A), brain PET (B), and PET-MRI fusion (C) images obtained in a 30-year-old healthy man after IV injection of ^{11}C -glyburide (60 minutes repeated whole-body scans). ^{11}C -glyburide brain distribution ($V_{T\text{-brain}} = 0.023 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-3}$) was estimated using the Logan graphical analysis and the metabolite-corrected arterial input function.

Kimberly et al.¹ reported the beneficial effects of IV glyburide on the clinical outcome of brain edema. We developed the carbon-11 radiolabeled analogue of glyburide to study the body distribution of this compound using PET imaging (figure, A). In a healthy person, the brain distribution of ^{11}C -glyburide matched the cerebral blood volume, suggesting negligible blood–brain barrier (BBB) penetration (figure, B and C). This clinical observation corroborates preclinical findings suggesting that local changes in BBB structure and function are required for targeted delivery and favorable effects of glyburide to the injured brain tissue while minimizing potential side effects to the healthy brain.²

Study registration

EudraCT 2017-001703-69.

Study funding

Supported by the French National Research Agency (IsotoPK, ANR-16-CE17-0011-001).

Disclosure

The authors report no disclosures relevant to the manuscript. Go to Neurology.org/N for full disclosures.

From Imagerie Moléculaire In Vivo (S.M., C.C., F.C., M.B., N.T.), IMIV, Institut des Sciences du Vivant Frédéric Joliot, Direction de la Recherche Fondamentale, CEA, Inserm, CNRS, Paris-Sud University, Université Paris-Saclay, CEA-SHF, Orsay; Hôpital Bicêtre (S.M., L.B.), APHP, Le Kremlin Bicêtre; Faculté de Pharmacie (S.M.), Paris-Sud University, Châtenay-Malabry; Department of Pharmacology (L.B.), Paris-Sud University, Faculty of Medicine Paris Sud, INSERM UMR-1178, CESP, Le Kremlin Bicêtre, France.

Go to Neurology.org/N for full disclosures.

4. Discussion générale

Le développement de l'imagerie moléculaire est étroitement lié aux progrès de la radiochimie et au développement pharmacologique de nouvelles sondes d'imagerie (Marie et al., 2017). Associées au développement instrumental des techniques d'imagerie, ces sondes permettent aujourd'hui de suivre un nombre toujours plus grand de processus biologiques au niveau tissulaire chez l'animal et chez l'Homme. Les domaines d'application de l'imagerie moléculaire sont variés, mais son utilisation pour des études de pharmacocinétique est relativement récente (Tournier et al., 2018).

Le développement de l'imagerie pour la pharmacocinétique a largement bénéficié de l'expérience accumulée pour l'étude de la P-gp. Cela s'explique par l'importance reconnue de ce transporteur en pharmacocinétique, et la nécessité de disposer d'outils non-invasifs pour en étudier la fonction au niveau de la BHE (Mahringer and Fricker, 2016). La mise au point au sein dans notre laboratoire d'une sonde dédiée à l'imagerie de la P-gp au niveau de la BHE, le [^{11}C]métoclopramide, a d'ailleurs permis de mieux comprendre le rôle de ce transporteur au niveau de cette interface (Auvity et al., 2018; Pottier et al., 2016). En effet le [^{11}C]métoclopramide est un substrat modéré de la P-gp et son passage basal significatif a permis de démontrer que l'effet de la P-gp ne se limite pas à la restriction du passage de ses substrats vers le cerveau, puisqu'elle semble également en permettre l'efflux, du cerveau vers le sang (Tournier et al., 2019). Les leçons tirées de ce développement nous ont permis d'identifier certains critères pharmacocinétiques importants qui ont été utilisés dans ce travail de thèse pour développer des sondes dédiées à l'imagerie des OATP chez l'animal puis chez l'Homme.

Le premier facteur d'importance identifié dans le développement d'une sonde est le choix du radionucléide et, par conséquent, de la modalité d'imagerie associée. Le carbone-11 est le radionucléide le plus fréquemment choisi pour le développement de radiotraceurs car il permet un marquage isotopique, en remplaçant un atome de carbone par son isotope radioactif émetteur de positons. Ce critère permet de

radiomarquer des analogues de médicaments dont la pharmacocinétique et la tolérance est bien connue, ce qui en facilite l'acceptation comme radiopharmaceutique expérimental chez l'Homme. De plus, les sondes radiomarquées par des émetteur β^+ permettent une quantification absolue grâce à la TEP. Ces raisons expliquent le choix du glyburide et son radiomarquage isotopique par le carbone-11. Néanmoins, notre expérience a démontré que cette modalité d'imagerie reste délicate à mettre en œuvre compte tenu de certaines difficultés techniques rencontrées, en particulier au niveau de la production radiopharmaceutique. Par ailleurs, la très courte période physique du carbone-11 en restreint l'utilisation aux seuls services de médecine nucléaire disposant d'un cyclotron, ce qui en limite considérablement les applications cliniques futures. Bien que la scintigraphie soit nettement moins performante que l'imagerie TEP d'un point de vue quantitatif, cette technique présente certains avantages qui nous ont incités à choisir la [^{99m}Tc]mébrofénine pour étudier les transporteurs OATP (Marie et al., 2017). La disponibilité et la simplicité du marquage au technétium-99m ont en effet permis de tester un grand nombre de conditions et notamment, plusieurs doses d'inhibiteurs de transporteurs. Par ailleurs cette approche de scintigraphie, comme par exemple celle où nous proposons d'associer la [^{99m}Tc]mébrofénine à la ciclosporine à faible dose, est facilement transposable à la pratique clinique puisque la mébrofénine pour radiomarquage et la ciclosporine injectable sont commercialisées. Ainsi, le choix de la [^{99m}Tc]mébrofénine s'inscrit dans une démarche de dissémination car ces outils sont disponibles pour l'étude des OATP hépatiques dans n'importe quel hôpital disposant d'un service de médecine nucléaire.

La pureté radiochimique du signal émis est un des paramètres indispensables à évaluer lors du développement de ces radiotraceurs. Il est fondamental que la sonde reste sous une forme inchangée et ne soit pas métabolisée dans l'organisme, ou le moins possible, afin de ne pas générer de métabolites radiomarqués qui perturberaient l'interprétation des résultats. La présence de radiométabolites en quantités importantes complique voire compromet la modélisation et la quantification du transport membranaire, ce qui

justifie le développement de sondes les plus stables *in vivo* (Pike, 2009). C'est par exemple le cas de la [^{99m}Tc]mébrofénine qui est éliminée au travers de l'hépatocyte sans subir aucun biométabolisme (Geisel et al., 2015). Chez l'Homme, nous avons en revanche retrouvé une légère métabolisation du [¹¹C]glyburide mais avec une part de radiométabolites très faible (<10%) qui peut raisonnablement être négligée dans l'analyse des données d'imagerie. Pour comparaison, le métabolisme important du [¹¹C]vérapamil restreignait l'analyse des données de passage cérébral aux premières minutes, lorsque la proportion de radiométabolites était inférieure à 20% (Bauer et al., 2012; Ikoma et al., 2006). L'interprétation des données de cinétique sur une plus longue durée n'était possible que chez le rongeur, chez lequel la proportion de métabolites dans le cerveau a pu être mesurée de manière invasive (Luurtsema et al., 2005).

Il est fréquent d'observer des différences interespèces en terme de métabolisme (Bauer et al., 2012). Cela avait pu être observé pour le [¹¹C]métoclopramide, et nécessiter la mise au point d'une méthode d'analyse pharmacocinétique différente pour les rongeurs, les primates et les humains (Auvity et al., 2018; Pottier et al., 2016; Tournier et al., 2019). Lors de l'étude préclinique réalisée chez le primate, le [¹¹C]glyburide était métabolisé relativement lentement en comparaison à d'autres radiotraceurs OATP. Néanmoins, la proportion de radiométabolites était proche d'environ 25% en conditions basales à 30 minutes. Lors de la translation à l'Homme, cette proportion de radiométabolites était bien moindre (< 10%), ce qui a permis d'élargir l'analyse à un intervalle de temps plus grand chez l'Homme. Cependant, la proportion de radiométabolites dans les différents tissus cibles, dont le foie, n'est pas connue (Figure 29). On peut en effet faire l'hypothèse d'une clairance hépatique extrêmement rapide des radiométabolites du [¹¹C]glyburide et d'une accumulation hépatique de ceux-ci. Néanmoins, des études de simulation PBPK ont montré récemment que le rapport foie/plasma de la fraction non liée aux protéines plasmatiques du glyburide à l'équilibre ($K_{p_{uu}}$) est de 32 pour le glyburide contre 3,7 pour ses métabolites (Li et al., 2017). La faible accumulation hépatique des métabolites, pourtant eux aussi substrats des OATP,

s'explique probablement par un efflux biliaire important par rapport au glyburide (Figure 29). Ainsi, la faible proportion de métabolites du glyburide par rapport à la molécule mère dans le foie suggère que la quantification du transport par les OATP hépatiques est possible avec le [¹¹C]glyburide car peu influencée par la présence des radiométabolites. Cet aspect est d'autant plus important que la rifampicine, en limitant la distribution hépatique, bloque la production des métabolites du glyburide et du [¹¹C]glyburide (Benet, 2009; Tournier et al., 2013). Il est donc crucial que la proportion de radiométabolites influence peu la quantification du transport par les OATP (Tournier et al., 2018).

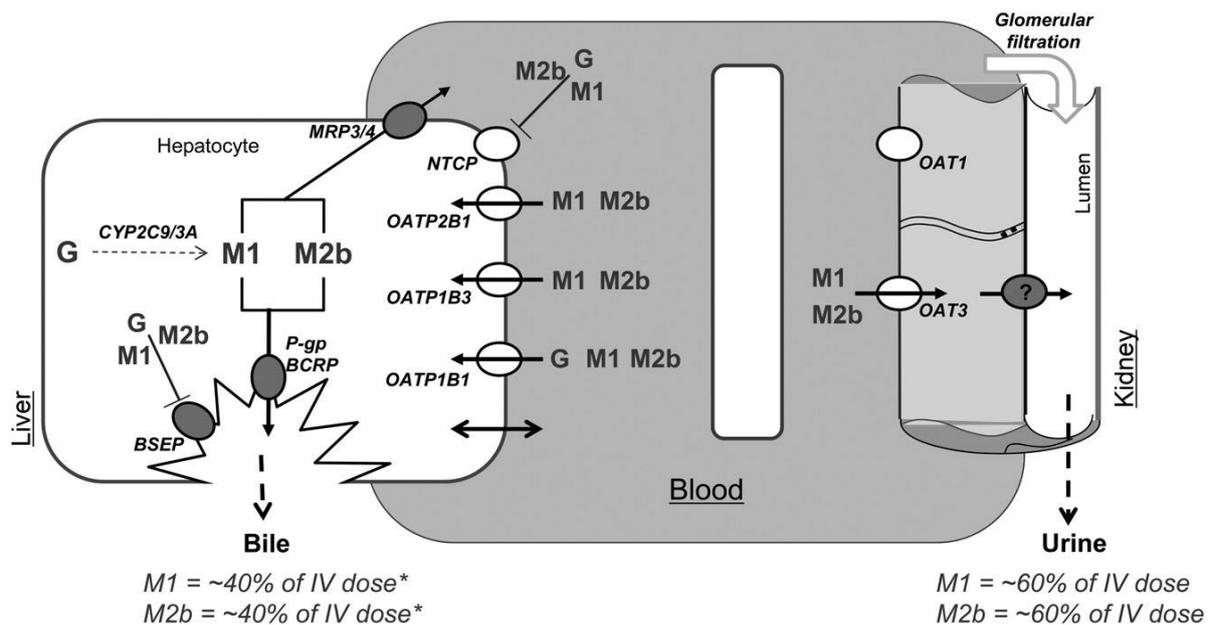


Figure 29 : Représentation schématique de l'élimination hépatique et rénale du glyburide et de ses métabolites.

(Li et al., 2017)

La capacité de transport de la sonde est également à prendre en compte lors du développement d'un nouveau radiotraceur pour l'étude des transporteurs d'influx comme les OATP. *In vivo*, cette capacité est estimée en comparant la distribution hépatique chez des individus contrôles et des individus déficients ou après inhibition

pharmacologique du transporteur étudié (rapport contrôle/inhibition). Pour comparaison, la capacité de transport du [^{11}C]glyburide est de 2,6 (article en préparation), celle de la [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]mébrofénine est de 3 (Marie et al., 2020) et celle du [^{11}C]erlotinib 1,3 (Bauer et al., 2018b). Cela signifie que le [^{11}C]erlotinib a une moins bonne capacité de transport et sera donc une sonde moins intéressante pour l'étude du transport OATP. Ce critère important, qui conditionne l'intensité de la réponse à l'inhibition pharmacologique et le contraste généré entre les conditions basales et les conditions d'inhibition, est probablement corrélé à la sensibilité de détection d'une inhibition du transporteur (Kannan 2009). Des différences d'expression des transporteurs ou de la reconnaissance des substrats entre les espèces peut faire varier cette capacité de transport d'une espèce à l'autre pour une même sonde donnée. A titre d'exemple, la capacité de transport du [^{11}C]erlotinib chez la souris avait été estimée à 1,75 (Bauer et al., 2018b). On peut citer comme autre exemple le (15*R*)-[^{11}C]TIC dont la capacité de transport chez l'Homme est de 2,2 contre 1,5 chez la souris (Takashima et al., 2010, 2012).

Dans le cas des OATP, aucune sonde actuellement développée n'est réellement spécifique des OATP puisqu'elles sont toutes également transportées par un voire plusieurs transporteurs d'efflux de la famille ABC (Marie et al., 2017). Cette interaction avec les transporteurs d'efflux est à prendre en considération lors de l'analyse de l'activité OATP, mais elle est tout à fait différente selon la localisation des transporteurs. Les transporteurs d'efflux peuvent se trouver sur la même interface que les OATP, exerçant chacun un rôle antagoniste de l'autre comme cela est le cas au niveau de la BHE (Abdullahi et al., 2017), ou au contraire, se trouver sur deux interfaces différentes mais liées comme l'illustre les hépatocytes où les OATP du côté basal interviennent dans la captation et travaillent de concert avec les transporteurs d'efflux du côté canaliculaire, responsables de l'excrétion (Patel et al., 2016) (Figure 6). Ce travail de thèse a permis de montrer qu'il est possible d'améliorer la spécificité d'une sonde pour l'imagerie des transporteurs hépatiques grâce à une stratégie d'inhibition

pharmacologique ciblée. Un inhibiteur peut lui-même agir sur plusieurs transporteurs mais l'important est que parmi les transporteurs empruntés par la sonde, un seul de ces transporteurs soit inhibé par l'inhibiteur choisi. C'est précisément l'objet de notre travail avec la [^{99m}Tc]mébrofénine que nous avons sélectionnée pour étudier les OATP, mais qui est également transportée par MRP2 au niveau hépatocytaire (Ghibellini et al., 2008). Nous avons tout d'abord sélectionné le diltiazem comme médicament inhibiteur bien qu'il ne soit pas inhibiteur spécifique d'un transporteur donné puisque des études *in vitro* ont montré que le diltiazem inhibait plusieurs transporteurs d'efflux ABC comme MRP2 ou la P-gp (Matsson et al., 2009). Cependant, les spécificités de la sonde et l'inhibiteur font que, parmi les transporteurs empruntés par la [^{99m}Tc]mébrofénine, seul le transporteur MRP2 pouvait être inhibé par le diltiazem. Les expérimentations réalisées ont montré qu'à très fortes doses (40 mg/kg SC), le diltiazem exerçait un effet inhibiteur sur les OATP malgré des données *in vitro* qui nous avaient laissé penser le contraire (Karlgrén et al., 2012). La réduction des doses a toutefois permis d'obtenir cette inhibition MRP2 sélective. Cette observation a porté un éclairage nouveau sur la possibilité de moduler les doses de certains médicaments pour obtenir une inhibition plus sélective. C'est cette réflexion qui nous a conduits à choisir la ciclosporine pour la suite de l'étude bien que ces mêmes données *in vitro* la décrivent comme inhibant à la fois les OATP et MRP2 (Karlgrén et al., 2012; Matsson et al., 2009). Cette hypothèse s'est avérée pertinente puisqu'à de très faibles doses de ciclosporine (0,01 mg/kg IV) nous avons réussi à inhiber sélectivement le transport MRP2 de la [^{99m}Tc]mébrofénine sans en modifier son transport OATP (Marie et al., 2020).

L'ordre de grandeur des répercussions fonctionnelles des OATP au niveau de ces interfaces est également important à prendre en compte. On sait que les transporteurs OATP sont prédominants et exprimés en très grandes quantités au pôle basal des hépatocytes, où leur implication dans l'élimination hépatobiliaire des médicaments ne fait plus de doute (Hagenbuch and Stieger, 2013). L'expression protéique de ces OATP

au niveau d'autres interfaces tissulaires nous interroge sur leur impact pharmacocinétique dans ces tissus. Ce travail n'a pas permis d'identifier d'impact fonctionnel réellement significatif d'un point de vue clinique de l'inhibition des OATP extra-hépatiques par la rifampicine. Néanmoins, ces résultats restent à confirmer sur un plus grand nombre de sujets. Cet impact fonctionnel limité pourrait s'expliquer par l'ordre de grandeur d'expression de ces OATP qui est nettement plus faible au niveau des interfaces extra-hépatiques par rapport au foie (Hagenbuch and Stieger, 2013). Aussi, la capacité de la rifampicine à inhiber d'autres transporteurs que OATP1B1 et OATP1B3 *in vivo* est moins documentée (Aristoff et al., 2010; Srinivas, 2016). On peut donc faire l'hypothèse que l'inhibition du transport hépatique du [¹¹C]glyburide serait majoritairement liée à l'inhibition des OATP1B1. Cependant, il a été montré que chez l'Homme, la souris et le rat, que de mêmes doses de rifampicine inhibent le transport du [¹¹C]erlotinib qui est spécifiquement transporté par OATP2B1 (Amor et al., 2018; Bauer et al., 2018b, 2018a). Cela suggère que la dose de rifampicine choisie présente un spectre d'inhibition plus large que OATP1B1 et OATP1B3 et peut inhiber, au moins partiellement, d'autres membres des transporteurs OATP comme OATP2B1 *in vivo*. Chez le primate, la même dose de rifampicine avait été choisie et avait montré un effet sur le transport du [¹¹C]glyburide au niveau d'autres organes que le foie. Enfin, une autre hypothèse pourrait être l'expression d'autres transporteurs, et notamment de transporteurs d'efflux qui sont exprimés au niveau des mêmes interfaces et pourraient masquer l'effet des OATP vis-à-vis du [¹¹C]glyburide (Couture et al., 2006) (Figure 6).

La rifampicine et la ciclosporine sont les inhibiteurs de choix pour l'étude des transporteurs OATP chez l'Homme (Billington et al., 2019; Kaneko et al., 2018). Ces médicaments sont utilisés de façon courante dans la pratique clinique, ce qui en simplifie l'utilisation et garantit une certaine sécurité d'emploi. Le pouvoir d'inhibition des OATP par la rifampicine et la ciclosporine est tel qu'il permet de détecter une forte différence d'intensité du signal en comparant les résultats obtenus avant puis après administration de l'inhibiteur. Ainsi, ces inhibiteurs OATP ont été utilisés pour valider

les sondes d'imagerie pour l'étude de ces transporteurs chez l'Homme et l'animal (Marie et al., 2017). Néanmoins, ces inhibiteurs ne sont pas sélectifs des OATP puisqu'ils inhibent également certains transporteurs d'efflux ABC (Matsson et al., 2009). Au niveau de certaines interfaces, l'interaction des inhibiteurs avec des transporteurs d'efflux pourrait donc biaiser la quantification du transport par les OATP. En l'absence d'inhibiteur réellement spécifique des OATP, il est important de prendre en compte, au niveau de chaque interface, l'environnement des OATP en terme d'expression des transporteurs ABC et SLC. Au niveau hépatocytaire, notre étude réalisée avec la [^{99m}Tc]mébrofénine suggère que de fortes doses de rifampicine inhibent MRP2 et MRP3 en plus des OATP. *In vitro*, le glyburide est transporté par plusieurs transporteurs d'efflux (P-gp, BCRP, MRP1 et MRP3) et par certains transporteurs d'efflux OATP (OATP1A2, OATP2B1, OATP1B1) (Cygaloova et al., 2009; Gedeon et al., 2006; Hemauer et al., 2010; Pollex et al., 2008; Zhou et al., 2008). Ainsi, il n'est pas attendu d'effet de la rifampicine autre que l'inhibition des OATP et peut-être MRP3 sur la cinétique hépatique du [¹¹C]glyburide. Ce n'est pas forcément le cas de la ciclosporine, qui est un puissant inhibiteur de P-gp, BCRP, MRP2, MRP3, MRP4 et BSEP (Köck et al., 2014; Matsson et al., 2009). Ainsi, la ciclosporine est susceptible de moduler la sécrétion biliaire du [¹¹C]glyburide et de biaiser la quantification des OATP hépatiques et extra-hépatiques. Ainsi, si aucun substrat ni aucun inhibiteur n'est parfaitement spécifique d'un transporteur, le choix d'une combinaison substrat/inhibiteur dont les spectres ne se recouvrent que pour un transporteur cible permet d'améliorer significativement la spécificité des observations réalisées en imagerie des transporteurs de médicaments.

La plupart des sondes OATP pour l'imagerie TEP sont des analogues de médicaments bien connus marqués au carbone-11. C'est le cas par exemple du [¹¹C]erlotinib, du [¹¹C]telmisartan ou encore du [¹¹C]glyburide. Pour les deux premiers radiotraceurs, une étude clinique a pu être réalisée pour comparer la cinétique du médicament administré en microdoses à celle obtenue à doses pharmacologiques (Bauer et al., 2018a; Maeda et al., 2019). Cette technique permet de mettre en évidence, de manière pragmatique,

l'existence d'un phénomène de captation hépatique saturable qui suggère l'existence d'un transport actif. Néanmoins, par rapport à l'utilisation d'un inhibiteur validé, cette stratégie ne permet pas de conclure quant à l'identité moléculaire des transporteurs impliqués dans le transport hépatique des médicaments étudiés. De plus, dans le cas du [¹¹C]glyburide, l'administration de doses pharmacologiques est très susceptible d'entraîner une hypoglycémie et rend ces doses peu compatibles avec les contraintes liées à l'acquisition TEP-IRM. Néanmoins, il est possible qu'une saturation au moins partielle du transport du [¹¹C]glyburide par les OATP puisse être observée à dose pharmacologique.

L'expérience de ce travail a montré que les critères que nous avons définis en amont pour le développement d'un radiotracer, basés sur les enseignements tirés des radiotraceurs de la P-gp pour l'étude de la BHE (Kannan et al., 2009; Marie and Tournier, 2020; Pike, 2009), ne sont pas directement applicables aux transporteurs OATP. Le glyburide est très fortement fixé aux protéines plasmatiques (>99% chez l'Homme) (Greupink et al., 2013; Laboratoire Sanofi, 2019). Ce critère est plutôt défavorable pour l'étude d'un transporteur d'efflux. En effet, la capacité de la sonde à diffuser à travers la membrane du compartiment sanguin vers le tissu où elle pourra alors subir ce transport d'efflux, est un critère important. Pour les transporteurs d'influx, au contraire, une forte fixation aux protéines plasmatiques permet de limiter la diffusion passive de la sonde au travers de la membrane, qui n'est franchie que grâce à l'activité des transporteurs d'influx. Certains tissus où la distribution de [¹¹C]glyburide est négligeable dans l'étude menée chez l'Homme illustrent d'ailleurs très bien cette notion de faible perméabilité membranaire, qui contraste avec le signal important observé dans les organes exprimant les OATP comme le foie. Il est important de noter également que le [¹¹C]glyburide présente un faible potentiel de diffusion passive au travers des membranes biologiques, indépendamment de sa forte fixation aux protéines plasmatiques (Sormunen et al., 2019). L'inhibition ou la saturation des OATP n'a mené qu'à une diminution de seulement -22% de la captation hépatique du

[¹¹C]erlotinib contre -62% pour le [¹¹C]glyburide ($AUC_{\text{foie}}/AUC_{\text{sang}}$). Cela suggère une prédominance du transport passif par rapport au transport par les OATP au niveau de la captation hépatique du [¹¹C]erlotinib (Amor et al., 2018).

Le critère de diffusion passive semble donc être une composante importante du critère de capacité de transport. En pratique, cela correspond à la différence de signal entre la situation basale et la situation où les OATP sont inhibés. Cette capacité de transport *in vivo* est importante en imagerie car génératrice de contraste entre les deux conditions. Cela permet de discerner et de quantifier avec plus de sensibilité le rôle des transporteurs d'influx dans la distribution tissulaire.

La localisation tissulaire des transporteurs étudiés semble également déterminante pour le choix et le développement d'un radiotraceur spécifique. Néanmoins, il est intéressant de noter que les paramètres étudiés en imagerie sont proches puisqu'ils concernent essentiellement des constantes de transfert membranaire et des paramètres de distribution tissulaire. Il serait intéressant d'appliquer les enseignements à d'autres organes d'élimination comme le rein, où l'on retrouve des OATP mais également de très nombreux autres transporteurs, en particulier des transporteurs anioniques (Figure 6). L'un des principaux radiotraceurs utilisés en routine à l'hôpital pour la scintigraphie rénale dynamique, le [^{99m}Tc]MAG3 (mercaptoacétyltryglycine), est d'ailleurs sécrété au niveau du tube contourné proximal par le transporteur OAT1 (Shikano et al., 2004). Un autre radiotraceur expérimental substrat des transporteurs OCT rénaux, la [¹¹C]metformine, a elle été utilisée pour explorer le transport cationique au niveau rénal (Jakobsen et al., 2016). Au niveau des tissus cibles, l'imagerie pharmacocinétique prend un essor pour l'étude de la distribution tissulaire des anticancéreux, dans un objectif théranostic de prédiction de la réponse pharmacologique. La distribution tumorale du [¹¹C]erlotinib a été étudiée chez l'Homme, mais pour en étudier l'expression de l'EGFR, pas pour en étudier la distribution tissulaire ni l'expression locale des transporteurs (Bahce et al., 2013). Des

sondes sont actuellement en développement pour prédire le phénomène de « multidrug résistance » et guider les protocoles thérapeutiques (Kannan et al., 2020).

Ce travail de thèse illustre l'intérêt de l'imagerie pour révéler certains processus pharmacocinétiques qui échappent aux études de pharmacocinétique conventionnelles. Le travail réalisé avec la [^{99m}Tc]mébrofénine par exemple a montré pour la première fois *in vivo* qu'une inhibition sélective de MRP2 sur la membrane canaliculaire de l'hépatocyte était possible et qu'elle pouvait être à l'origine d'une augmentation significative de l'exposition hépatique, sans qu'aucune répercussion plasmatique ne puisse être détectée. Chez l'Homme, un tel phénomène pourrait, en théorie, être apprécié pour d'autres molécules en mesurant la quantité excrétée dans les fèces. Cependant, cette approche expose à une grande variabilité et doit prendre en compte de nombreux paramètres qui compliquent l'interprétation des données d'élimination biliaire. Par contre, une inhibition des OATP induit une diminution de la captation hépatique de l'ordre de -67% pour la [^{99m}Tc]mébrofénine et de -62% pour le [¹¹C]glyburide. Les conséquences sur l'exposition plasmatique ne sont pas proportionnelles : elles sont de l'ordre de +113% pour la [^{99m}Tc]mébrofénine et de +24% pour le [¹¹C]glyburide. Cela suggère que la mesure des concentrations plasmatiques ne permet pas d'estimer correctement l'activité des OATP hépatiques.

La [^{99m}Tc]mébrofénine est un radiopharmaceutique ancien. Néanmoins, ses propriétés pharmacocinétiques découvertes au cours de ces dernières années lui confèrent un potentiel grandissant comme sonde pour l'imagerie moléculaire des transporteurs de médicaments. L'apport de nouvelles méthodes de modélisation, comme l'analyse compartimentale qui a été réalisée dans ce travail, améliore encore le degré d'analyse et d'interprétation des données d'imagerie. Cela a par exemple permis ici de révéler *in vivo* le transport d'efflux MRP3 de la [^{99m}Tc]mébrofénine qui n'avait jusque-là été caractérisé que *in vitro* (Ghibellini et al., 2008). *In vivo*, la mise en évidence des MRP3 n'avait été montrée que de manière indirecte, par l'étude de la distribution de la morphine et de son métabolite (morphine-6-glucuronide) chez des souris déficientes

MRP3 ou chez des sujets présentant un polymorphisme du gène ABCC3 codant pour la protéine MRP3 (Hahn et al., 2020; Zelcer et al., 2005).

Les approches d'imagerie développées dans le cadre de ce travail ont été validées chez des animaux et des sujets sains. Ces outils ouvrent cependant des perspectives intéressantes pour mesurer l'activité des transporteurs OATP hépatiques mais aussi MRP2 voire MRP3, dans des situations physiopathologiques. Cela concerne par exemple le polymorphisme génétique ou les pathologies qui avaient été évoquées dans le Tableau 5 où une altération fonctionnelle des transporteurs est suspectée. La [^{99m}Tc]mébrofénine, qui est particulièrement simple à transposer dans une étude clinique en environnement hospitalier, a par exemple été utilisée récemment dans une étude chez des patients atteints de NASH (Ali et al., 2017). La combinaison de la [^{99m}Tc]mébrofénine avec la ciclosporine pour l'étude de la réserve fonctionnelle en MRP2 devra être validée dans le cadre d'une étude clinique. Néanmoins, cette approche pourrait permettre de détecter des altérations de l'activité des transporteurs OATP et/ou MRP2 de manière dissociée. L'utilisation du [¹¹C]glyburide doit également être poursuivie pour mieux comprendre le rôle des OATP hépatiques et extra-hépatiques et leur régulation chez l'Homme, en tirant parti de ses avantages par rapport aux sondes existantes.

Conclusion générale

L'objectif de ce travail de thèse était de développer et valider de nouvelles méthodes d'imagerie translationnelle pour étudier les répercussions pharmacocinétiques de transporteurs de médicaments *in vivo* au niveau d'interfaces biologiques complexes. Ce travail s'est concentré principalement sur l'imagerie de transporteurs OATP mais leur interaction étroite avec d'autres transporteurs membranaires nous a amené à étudier également d'autres transporteurs comme MRP2. Le travail s'est articulé autour de deux approches qui nous ont permis d'apporter des éclairages nouveaux et complémentaires. Dans la première partie de ce travail, nous avons testé des répercussions de différents protocoles d'inhibition sur l'imagerie scintigraphique à la [^{99m}Tc]mébrofénine. Nous sommes parvenus à inhiber sélectivement le transport hépatobiliaire par MRP2 de la [^{99m}Tc]mébrofénine chez le rat grâce à des très faibles doses de ciclosporine, tout en validant une méthode de quantification de l'activité OATP hépatique. Dans la seconde partie, nous avons optimisé les méthodes d'analyse d'une nouvelle sonde OATP pour l'imagerie TEP, le [¹¹C]glyburide, et l'avons testée pour la première fois chez l'Homme. Une approche d'acquisition corps-entier nous a permis de quantifier de façon précise la distribution du [¹¹C]glyburide dans les tissus extra-hépatiques chez le primate. Les résultats encourageants chez les premiers volontaires sains ont permis de valider le [¹¹C]glyburide comme nouvelle sonde OATP chez l'Homme. Ce travail apporte donc une approche originale, basée sur l'utilisation de radiopharmaceutiques, permettant de mieux comprendre les répercussions fonctionnelles des transporteurs sur la distribution et l'élimination des médicaments. L'imagerie représente un nouvel outil permettant d'ouvrir des perspectives d'études jusqu'alors inenvisageables pour la pharmacocinétique clinique. Ces outils devraient permettre de mieux comprendre l'importance de la diffusion membranaire et de l'activité des transporteurs sur le devenir des médicaments dans l'organisme.

Bibliographie

Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* *37*, 13–25.

Abdullahi, W., Davis, T., and Ronaldson, P. (2017). Functional Expression of P-glycoprotein and Organic Anion Transporting Polypeptides at the Blood-Brain Barrier: Understanding Transport Mechanisms for Improved CNS Drug Delivery? *AAPS J.* *19*, 931–939.

Aherne, G., Marks, V., Mould, G., Piall, E., and White, W. (1978a). The interaction between methotrexate and probenecid in man [proceedings]. *Br. J. Pharmacol.* *63*, 369P.

Aherne, G., Piall, E., Marks, V., Mould, G., and White, W. (1978b). Prolongation and enhancement of serum methotrexate concentrations by probenecid. *Br. Med. J.* *1*, 1097–1099.

Alam, K., Crowe, A., Wang, X., Zhang, P., Ding, K., Li, L., and Yue, W. (2018). Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-Mediated Transport: An Updated Review in the Context of OATP-Mediated Drug-Drug Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.

Alexander, S., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J., Veale, E., Armstrong, J., Faccenda, E., Harding, S., Pawson, A., Sharman, J., et al. (2019). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: Transporters. *Br. J. Pharmacol.* *176*, S397–S493.

Ali, I., Slizgi, J., Kaullen, J., Ivanovic, M., Niemi, M., Stewart, P., Barritt, A., and Brouwer, K. (2017). Transporter-mediated Alterations in Patients with NASH Increase Systemic and Hepatic Exposure to an OATP and MRP2 Substrate. *Clin. Pharmacol. Ther.* *104*, 749–756.

Amor, D., Goutal, S., Marie, S., F, F., Bauer, M., Langer, O., Auvity, S., and Tournier, N. (2018). Impact of rifampicin-inhibitable transport on the liver distribution and tissue kinetics of erlotinib assessed with PET imaging in rats. *EJNMMI Res.* *8*, 81.

Ando, T., Kusuhara, H., Merino, G., Alvarez, A., Schinkel, A., and Sugiyama, Y. (2007). Involvement of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in the Biliary Excretion Mechanism of Fluoroquinolones. *Drug Metab. Dispos.* *35*, 1873–1879.

Annaert, P., Ye, Z.W., Stieger, B., and Augustijns, P. (2010). Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1. *Xenobiotica* *40*, 163–176.

Aristoff, P., Garcia, G., Kirchhoff, P., and Hollis Showalter, H. (2010). Rifamycins – Obstacles and opportunities. *Tuberculosis* *90*, 94–118.

Ashcroft, F. (1996). Mechanisms of the Glycaemic Effects of Sulfonylureas. *Horm. Metab. Res.* *28*, 456–463.

van Assema, D., Lubberink, M., Boellaard, R., Schuit, R., Windhorst, A., Scheltens, P., Lammertsma, A., and van Berckel, B. (2012). P-Glycoprotein Function at the Blood–Brain Barrier: Effects of Age and Gender. *Mol. Imaging Biol.* *14*, 771–776.

Audebert, C., and Vignon-Clementel, I. (2018). Model and methods to assess hepatic function from indocyanine green fluorescence dynamical measurements of liver tissue. *Eur. J. Pharm. Sci.* *115*, 304–319.

Auvity, S., Caillé, F., Marie, S., Wimberley, C., Bauer, M., Langer, O., Buvat, I., Goutal, S., and Tournier, N. (2018). P-Glycoprotein (ABCB1) Inhibits the Influx and Increases the Efflux of ¹¹C-Metoclopramide Across the Blood–Brain Barrier: A PET Study on Nonhuman Primates. *J. Nucl. Med.* *59*, 1609–1615.

Babu, E., Takeda, M., Narikawa, S., Kobayashi, Y., Enomoto, A., Tojo, A., Cha, S., Sekine, T., Sakthisekaran, D., and Endou, H. (2002). Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1590*, 64–75.

Badagnani, I., Castro, R., Taylor, T., Brett, C., Huang, C., Stryke, D., Kawamoto, M., Johns, S., Ferrin, T., Carlson, E., et al. (2006). Interaction of Methotrexate with Organic-Anion Transporting Polypeptide 1A2 and Its Genetic Variants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *318*, 521–529.

Badée, J., Achour, B., Rostami-Hodjegan, A., and Galetin, A. (2015). Meta-Analysis of Expression of Hepatic Organic Anion–Transporting Polypeptide (OATP) Transporters in Cellular Systems Relative to Human Liver Tissue. *Drug Metab. Dispos.* *43*, 424–432.

Bahce, I., Smit, E., Lubberink, M., van der Veldt, A., Yaqub, M., Windhorst, A., Schuit, R., Thunnissen, E., Heideman, D., Postmus, P., et al. (2013). Development of [¹¹C]erlotinib Positron Emission Tomography for In Vivo Evaluation of EGF Receptor Mutational Status. *Clin. Cancer Res.* *19*, 183–193.

Bailey, D., and Willowson, K. (2014). Quantitative SPECT/CT: SPECT joins PET as a quantitative imaging modality. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *41*, 17–25.

Bailey, D.L., Pichler, B.J., Gückel, B., Antoch, G., Barthel, H., Bhujwala, Z.M., Biskup, S., Biswal, S., Bitzer, M., Boellaard, R., et al. (2018). Combined PET/MRI: Global Warming—Summary Report of the 6th International Workshop on PET/MRI, March 27–29, 2017, Tübingen, Germany. *Mol. Imaging Biol.* *20*, 4–20.

Barnouin, K., Leier, I., Jedlitschky, G., Pourtier-Manzanedo, A., KÄnig, J., Lehmann, W.D., and Keppler, D. (1998). Multidrug resistance protein-mediated transport of chlorambucil and melphalan conjugated to glutathione. *Br. J. Cancer* *77*, 201–209.

Bauer, M., Zeitlinger, M., Karch, R., Matzneller, P., Stanek, J., JÄger, W., Böhmdorfer, M., Wadsak, W., Mitterhauser, M., Bankstahl, J., et al. (2012). P-glycoprotein mediated interaction between (R)-[11C]verapamil and tariquidar at the human blood-brain barrier studied with positron emission tomography, a comparison with rat data. *Clin. Pharmacol. Ther.* *91*, 227–233.

Bauer, M., Matsuda, A., Wulkersdorfer, B., Philippe, C., Traxl, A., Özvegy-Laczka, C., Stanek, J., Nics, L., Klebermass, E., Poschner, S., et al. (2018a). Influence of OATPs on Hepatic Disposition of Erlotinib Measured With Positron Emission Tomography. *Clin. Pharmacol. Ther.* *104*, 139–147.

Bauer, M., Traxl, A., Matsuda, A., Karch, R., Philippe, C., Nics, L., Klebermass, E., Wulkersdorfer, B., Weber, M., Poschner, S., et al. (2018b). Effect of Rifampicin on the Distribution of [11C]Erlotinib to the Liver, a Translational PET Study in Humans and in Mice. *Mol. Pharm.* *15*, 4589–4598.

Bednarczyk, D., and Sanghvi, M. (2020). Organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1), an expanded substrate profile, does it align with OATP2B1's hypothesized function? *Xenobiotica* *0*, 1–10.

Begley, D. (2004). ABC Transporters and the Blood-Brain Barrier. *Curr. Pharm. Des.* *10*, 1295–1312.

Benet, L. (2009). The Drug Transporter–Metabolism Alliance: Uncovering and Defining the Interplay. *Mol. Pharm.* *6*, 1631–1643.

Beyer, T., Townsend, D.W., Brun, T., Kinahan, P.E., Charron, M., Roddy, R., Jerin, J., Young, J., Byars, L., and Nutt, R. (2000). A combined PET/CT scanner for clinical oncology. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* *41*, 1369–1379.

Bhargava, K., Joseph, B., Ananthanarayanan, M., Balasubramaniyan, N., Tronco, G., Palestro, C., and Gupta, S. (2009). Adenosine Triphosphate–Binding Cassette Subfamily C Member 2 Is the Major Transporter of the Hepatobiliary Imaging Agent ^{99m}Tc-Mebrofenin. *J. Nucl. Med.* *50*, 1140–1146.

Bierly, J., and Labay, L. (2018). The Utility of Bile in Postmortem Forensic Toxicology. *Acad. Forensic Pathol.* *8*, 324–327.

Billington, S., Shoner, S., Lee, S., Clark-Snustad, K., Pennington, M., Lewis, D., Muzi, M., Rene, S., Lee, J., Nguyen, T., et al. (2019). PET Imaging of [11C]Rosuvastatin Hepatic

Concentrations and Hepatobiliary Transport in Humans in the Absence and Presence of Cyclosporine A. *Clin. Pharmacol. Ther.* *106*, 1056–1066.

Bonnaventure, P., and Pastor, C. (2015). Quantification of Drug Transport Function across the Multiple Resistance-Associated Protein 2 (Mrp2) in Rat Livers. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 135–147.

Bossuyt, X., Müller, M., and Meier, P. (1996). Multispecific amphipathic substrate transport by an organic anion transporter of human liver. *J. Hepatol.* *25*, 733–738.

Bradley, W.G., and Shelden, C.H. (1983). Nuclear magnetic resonance imaging: Review of early clinical experience. *Am. J. Surg.* *146*, 85–87.

Bronger, H., König, J., Kopplow, K., Steiner, H., Ahmadi, R., Herold-Mende, C., Keppler, D., and Nies, A. (2005). ABC Drug Efflux Pumps and Organic Anion Uptake Transporters in Human Gliomas and the Blood-Tumor Barrier. *Cancer Res.* *65*, 11419–11428.

Brouwer, K.L.R., Keppler, D., Hoffmaster, K.A., Bow, D. a. J., Cheng, Y., Lai, Y., Palm, J.E., Stieger, B., and Evers, R. (2013). In Vitro Methods to Support Transporter Evaluation in Drug Discovery and Development. *Clin. Pharmacol. Ther.* *94*, 95–112.

Brown, K., Bouchard, N., Lussier, J., and Sirois, J. (2007). Down-regulation of messenger ribonucleic acid encoding an importer of sulfoconjugated steroids during human chorionic gonadotropin-induced follicular luteinization in vivo. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *103*, 10–19.

Brunner, M., Langer, O., Dobrozemsky, G., Müller, U., Zeitlinger, M., Mitterhauser, M., Wadsak, W., Dudczak, R., Kletter, K., and Müller, M. (2004). [¹⁸F]Ciprofloxacin, a New Positron Emission Tomography Tracer for Noninvasive Assessment of the Tissue Distribution and Pharmacokinetics of Ciprofloxacin in Humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 3850–3857.

Büchler, M., König, J., Brom, M., Kartenbeck, J., Spring, H., Horie, T., and Keppler, D. (1996). cDNA Cloning of the Hepatocyte Canalicular Isoform of the Multidrug Resistance Protein, cMrp, Reveals a Novel Conjugate Export Pump Deficient in Hyperbilirubinemic Mutant Rats. *J. Biol. Chem.* *271*, 15091–15098.

Burckhardt, G., and Burckhardt, B. (2011). In Vitro and In Vivo Evidence of the Importance of Organic Anion Transporters (OATs) in Drug Therapy. In *Drug Transporters*, M. Fromm, and R. Kim, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 29–104.

Burt, T., Yoshida, K., Lappin, G., Vuong, L., John, C., de Wildt, S., Sugiyama, Y., and Rowland, M. (2016). Microdosing and Other Phase 0 Clinical Trials: Facilitating Translation in Drug Development. *Clin. Transl. Sci.* *9*, 74–88.

- Caillé, F., Gervais, P., Auvity, S., Coulon, C., Marie, S., Tournier, N., and Kuhnast, B. (2020). Automated two-step manufacturing of [¹¹C]glyburide radiopharmaceutical for PET imaging in humans. *Nucl. Med. Biol.* *84–85*, 20–27.
- Canaparo, R., Nordmark, A., Finnström, N., Lundgren, S., Seidegård, J., Jeppsson, B., Edwards, R., Boobis, A., and Rane, A. (2007). Expression of Cytochromes P450 3A and P-Glycoprotein in Human Large Intestine in Paired Tumour and Normal Samples. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *100*, 240–248.
- Cascorbi, I., and Haenisch, S. (2010). Pharmacogenetics of ATP-Binding Cassette Transporters and Clinical Implications. In *Multi-Drug Resistance in Cancer*, J. Zhou, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 95–121.
- César-Razquin, A., Snijder, B., Frappier-Brinton, T., Isserlin, R., Gyimesi, G., Bai, X., Reithmeier, R., Hepworth, D., Hediger, M., Edwards, A., et al. (2015). A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell* *162*, 478–487.
- Cha, S., Sekine, T., Fukushima, J., Kanai, Y., Kobayashi, Y., Goya, T., and Endou, H. (2001). Identification and Characterization of Human Organic Anion Transporter 3 Expressing Predominantly in the Kidney. *Mol. Pharmacol.* *59*, 1277–1286.
- Chan, T., Zhu, L., Madigan, M., Wang, K., Shen, W., Gillies, M., and Zhou, F. (2015). Human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) mediates cellular uptake of all-trans-retinol in human retinal pigmented epithelial cells. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 2343–2353.
- Chapy, H., Saubaméa, B., Tournier, N., Bourasset, F., Behar-Cohen, F., Declèves, X., Scherrmann, J., and Cisternino, S. (2016). Blood–brain and retinal barriers show dissimilar ABC transporter impacts and concealed effect of P-glycoprotein on a novel verapamil influx carrier. *Br. J. Pharmacol.* *173*, 497–510.
- Chen, M., Hu, S., Li, Y., Gibson, A., Fu, Q., Baker, S., and Sparreboom, A. (2020). Role of Oatp2b1 in Drug Absorption and Drug-Drug Interactions. *Drug Metab. Dispos.* *48*, 419–425.
- Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., Hu, T., Jiang, L., and Li, J. (2016). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* *370*, 153–164.
- Cook, D., Brown, D., Alexander, R., March, R., Morgan, P., Satterthwaite, G., and Pangalos, M.N. (2014). Lessons learned from the fate of AstraZeneca’s drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 419–431.

Couture, L., Nash, J., and Turgeon, J. (2006). The ATP-Binding Cassette Transporters and Their Implication in Drug Disposition: A Special Look at the Heart. *Pharmacol. Rev.* *58*, 244–258.

Cropp, C., Komori, T., Shima, J., Urban, T., Yee, S., More, S., and Giacomini, K. (2008). Organic anion transporter 2 (SLC22A7) is a facilitative transporter of cGMP. *Mol. Pharmacol.* *73*, 1151–1158.

Cui, Y., König, J., Buchholz, U., Spring, H., Leier, I., and Keppler, D. (1999). Drug Resistance and ATP-Dependent Conjugate Transport Mediated by the Apical Multidrug Resistance Protein, MRP2, Permanently Expressed in Human and Canine Cells. *Mol. Pharmacol.* *55*, 929–937.

Cusin, F., Azevedo, L., Bonnaventure, P., Desmeules, J., Daali, Y., and Pastor, C. (2017). Hepatocyte Concentrations of Indocyanine Green Reflect Transfer Rates Across Membrane Transporters. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *120*, 171–178.

Cygalova, L., Hofman, J., Ceckova, M., and Staud, F. (2009). Transplacental Pharmacokinetics of Glyburide, Rhodamine 123, and BODIPY FL Prazosin: Effect of Drug Efflux Transporters and Lipid Solubility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *331*, 1118–1125.

vom Dahl, S., and Häussinger, D. (1997). Experimental methods in hepatology. Guidelines of the German Association for the Study of the Liver (GASL). Liver perfusion-technique and applications. *Z. Gastroenterol.* *35*, 221–226.

Damme, K., Nies, A., Schaeffeler, E., and Schwab, M. (2011). Mammalian MATE (SLC47A) transport proteins: impact on efflux of endogenous substrates and xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* *43*, 499–523.

Dean, M., and Annilo, T. (2005). Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *6*, 123–142.

Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* *42*, 1007–1017.

Declèves, X., Amiel, A., Delattre, J.-Y., and Scherrmann, J.-M. (2006). Role of ABC transporters in the chemoresistance of human gliomas. *Curr. Cancer Drug Targets* *6*, 433–445.

DeGorter, M., Ho, R., Leake, B., Tirona, R., and Kim, R. (2012a). Interaction of three region-specific amino acid residues is required for OATP1B1 gain of OATP1B3 substrate specificity. *Mol. Pharm.* *9*, 986–995.

DeGorter, M., Xia, C., Yang, J., and Kim, R. (2012b). Drug Transporters in Drug Efficacy and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *52*, 249–273.

DeGorter, M., Tirona, R., Schwarz, U., Choi, Y., Dresser, G., Suskin, N., Myers, K., Zou, G., Iwuchukwu, O., Wei, W., et al. (2013). Clinical and Pharmacogenetic Predictors of Circulating Atorvastatin and Rosuvastatin Concentration in Routine Clinical Care. *Circ. Cardiovasc. Genet.* *6*, 400–408.

Delanaye, P., Cavalier, E., Mariat, C., Maillard, N., Dubois, B.E., and Krzesinski, J.M. (2009). [Detection and estimation of chronic kidney disease]. *Rev. Med. Liege* *64*, 73–78.

Doo, E., Krishnamurthy, G., Eklem, M., Gilbert, S., and Brown, P. (1991). Quantification of Hepatobiliary Function as an Integral Part of Imaging with Technetium-99m-Mebrofenin in Health and Disease. *J. Nucl. Med.* *32*, 48–57.

Dresser, M., Leabman, M., and Giacomini, K. (2001). Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: Organic anion transporters and organic cation transporters. *J. Pharm. Sci.* *90*, 397–421.

Enomoto, A., Kimura, H., Chairoungdua, A., Shigeta, Y., Jutabha, P., Cha, S., Hosoyamada, M., Takeda, M., Sekine, T., Igarashi, T., et al. (2002). Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* *417*, 447–452.

Essodaïgui, M., Broxterman, H.J., and Garnier-Suillerot, A. (1998). Kinetic Analysis of Calcein and Calcein–Acetoxymethylester Efflux Mediated by the Multidrug Resistance Protein and P-Glycoprotein. *Biochemistry* *37*, 2243–2250.

Estudante, M., Soveral, G., Morais, J., and Benet, L. (2016). Insights into solute carriers: physiological functions and implications in disease and pharmacokinetics. *MedChemComm* *7*, 1462–1478.

European Medicines Agency (2008). ICH M3 (R2): Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals.

European Medicines Agency (2012). Guideline on the investigation of drug interactions. 59.

European Medicines Agency (2017). EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines.

Evers, R., Piquette-Miller, M., Polli, J., Russel, F., Sprowl, J.A., Tohyama, K., Ware, J., de Wildt, S., Xie, W., and Brouwer, K. (2018). Disease-Associated Changes in Drug Transporters May Impact the Pharmacokinetics and/or Toxicity of Drugs: A White Paper from the International Transporter Consortium. *Clin. Pharmacol. Ther.* *104*, 900–915.

Feldmann, G., and Maurice, M. (1997). Membrane plasmique de l'hépatocyte et pathologie hépatique. In *EMC Hépatologie*, p.

- Feldmann, M., Asselin, M.-C., Liu, J., Wang, S., McMahon, A., Anton-Rodriguez, J., Walker, M., Symms, M., Brown, G., and Hinz, R. (2013). P-glycoprotein expression and function in patients with temporal lobe epilepsy: a case-control study. *Lancet Neurol.* *12*, 777–785.
- Feng, B., Varma, M., Costales, C., Zhang, H., and Tremaine, L. (2014). In vitro and in vivo approaches to characterize transporter-mediated disposition in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* *9*, 873–890.
- Finch, A., and Pillans, P. (2014). P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions - Australian Prescriber. *Aust. Prescr.* *37*.
- Food and Drug Administration (2017). In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry. *Interact. Stud.* *47*.
- Förster, F., Volz, A., and Fricker, G. (2008). Compound profiling for ABCC2 (MRP2) using a fluorescent microplate assay system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *69*, 396–403.
- Foti, R., Tyndale, R., Garcia, K., Sweet, D., Nagar, S., Sharan, S., and Rock, D. (2015). “Target-Site” Drug Metabolism and Transport. *Drug Metab. Dispos.* *43*, 1156–1168.
- la Fougère, C., Böning, G., Bartmann, H., Wängler, B., Nowak, S., Just, T., Wagner, E., Winter, P., Rominger, A., Förster, S., et al. (2010). Uptake and binding of the serotonin 5-HT_{1A} antagonist [18F]-MPPF in brain of rats: Effects of the novel P-glycoprotein inhibitor tariquidar. *NeuroImage* *49*, 1406–1415.
- Franco, R., and Cidlowski, J. (2006). SLCO/OATP-like Transport of Glutathione in FasL-induced Apoptosis GLUTATHIONE EFFLUX IS COUPLED TO AN ORGANIC ANION EXCHANGE AND IS NECESSARY FOR THE PROGRESSION OF THE EXECUTION PHASE OF APOPTOSIS. *J. Biol. Chem.* *281*, 29542–29557.
- Frey, E., Humm, J., and Ljungberg, M. (2012). Accuracy and Precision of Radioactivity Quantification in Nuclear Medicine Images. *Semin. Nucl. Med.* *42*, 208–218.
- Frisch, K., Jakobsen, S., Sørensen, M., Munk, O., Alstrup, A., Ott, P., Hofmann, A., and Keiding, S. (2012). [N-Methyl-11C]Cholylsarcosine, a Novel Bile Acid Tracer for PET/CT of Hepatic Excretory Function: Radiosynthesis and Proof-of-Concept Studies in Pigs. *J. Nucl. Med.* *53*, 772–778.
- Fritzberg, A., and Klingensmith, W. (1982). Quest for the Perfect Hepatobiliary Radiopharmaceutical. *J. Nucl. Med.* *23*, 543–546.
- Fromm, M. (2004). Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 423–429.

Fromm, M.F. (2000). P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* *38*, 69–74.

Fu, D., Cardona, P., Ho, H., Watkins, P., and Brouwer, K. (2019). Novel Mechanisms of Valproate Hepatotoxicity: Impaired Mrp2 Trafficking and Hepatocyte Depolarization. *Toxicol. Sci.* *171*, 431–442.

Fujiwara, K., Adachi, H., Nishio, T., Unno, M., Tokui, T., Okabe, M., Onogawa, T., Suzuki, T., Asano, N., Tanemoto, M., et al. (2001). Identification of Thyroid Hormone Transporters in Humans: Different Molecules Are Involved in a Tissue-Specific Manner. *Endocrinology* *142*, 2005–2012.

Gao, B., Vavricka, S., Meier, P., and Stieger, B. (2015). Differential cellular expression of organic anion transporting peptides OATP1A2 and OATP2B1 in the human retina and brain: implications for carrier-mediated transport of neuropeptides and neurosteroids in the CNS. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *467*, 1481–1493.

Gedeon, C., Behravan, J., Koren, G., and Piquette-Miller, M. (2006). Transport of Glyburide by Placental ABC Transporters: Implications in Fetal Drug Exposure. *Placenta* *27*, 1096–1102.

Geisel, D., Lüdemann, L., Hamm, B., and Denecke, T. (2015). Imaging-Based Liver Function Tests – Past, Present and Future. *RöFo - Fortschritte Auf Dem Geb. Röntgenstrahlen Bildgeb. Verfahr.* *187*, 863–871.

Georgiou, L., Penny, J., Nicholls, G., Woodhouse, N., Blé, F., Hubbard Cristinacce, P., and Naish, J. (2017). Quantitative Assessment of Liver Function Using Gadoxetate-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Invest. Radiol.* *52*, 111–119.

Geyer, J., Döring, B., Failing, K., and Petzinger, E. (2004). Molecular cloning and functional characterization of the bovine (*Bos taurus*) organic anion transporting polypeptide Oatp1a2 (*Slco1a2*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *137*, 317–329.

Ghibellini, G., Leslie, E., and Brouwer, K. (2006). Methods to Evaluate Biliary Excretion of Drugs in Humans: an Updated Review. *Mol. Pharm.* *3*, 198–211.

Ghibellini, G., Leslie, E., Pollack, G., and Brouwer, K. (2008). Use of Tc-99m Mebrofenin as a Clinical Probe to Assess Altered Hepatobiliary Transport: Integration of In Vitro, Pharmacokinetic Modeling, and Simulation Studies. *Pharm. Res.* *25*, 1851.

Giacomini, K., Galetin, A., and Huang, S. (2018). The International Transporter Consortium: Summarizing Advances in the Role of Transporters in Drug Development. *Clin. Pharmacol. Ther.* *104*, 766–771.

Giacomini, K.M., Huang, S.-M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L.R., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K.M., et al. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* *9*, 215–236.

Glaeser, H., Bailey, D.G., Dresser, G.K., Gregor, J.C., Schwarz, U.I., McGrath, J.S., Jolicoeur, E., Lee, W., Leake, B.F., Tirona, R.G., et al. (2007). Intestinal Drug Transporter Expression and the Impact of Grapefruit Juice in Humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* *81*, 362–370.

Gnanasegaran, G., and Ballinger, J. (2014). Molecular imaging agents for SPECT (and SPECT/CT). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *41*, 26–35.

Gong, I., and Kim, R. (2013). Impact of Genetic Variation in OATP Transporters to Drug Disposition and Response. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *28*, 4–18.

Gorboulev, V., Ulzheimer, J., Akhoundova, A., Ulzheimer-Teuber, I., Karbach, U., Quester, S., Baumann, C., Lang, F., Busch, A., and Koepsell, H. (1997). Cloning and Characterization of Two Human Polyspecific Organic Cation Transporters. *DNA Cell Biol.* *16*, 871–881.

de Graaf, W., Häusler, S., Heger, M., van Ginhoven, T., van Cappellen, G., Bennink, R., Kullak-Ublick, G., Hesselmann, R., van Gulik, T., and Stieger, B. (2011). Transporters involved in the hepatic uptake of ^{99m}Tc-mebrofenin and indocyanine green. *J. Hepatol.* *54*, 738–745.

Graham, G., Punt, J., Arora, M., Day, R., Doogue, M., Duong, J., Furlong, T., Greenfield, J., Greenup, L., Kirkpatrick, C., et al. (2011). Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin. Pharmacokinet.* *50*, 81–98.

Greupink, R., Schreurs, M., Benne, M., Huisman, M., and Russel, F. (2013). Semi-mechanistic physiologically-based pharmacokinetic modeling of clinical glibenclamide pharmacokinetics and drug–drug-interactions. *Eur. J. Pharm. Sci.* *49*, 819–828.

Grube, M., Köck, K., Karner, S., Reuther, S., Ritter, C., Jedlitschky, G., and Kroemer, H. (2006a). Modification of OATP2B1-Mediated Transport by Steroid Hormones. *Mol. Pharmacol.* *70*, 1735–1741.

Grube, M., Köck, K., Oswald, S., Draber, K., Meissner, K., Eckel, L., Böhm, M., Felix, S., Vogelgesang, S., Jedlitschky, G., et al. (2006b). Organic anion transporting polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart. *Clin. Pharmacol. Ther.* *80*, 607–620.

Grube, M., Reuther, S., Schwabedissen, H., Köck, K., Draber, K., Ritter, C., Fusch, C., Jedlitschky, G., and Kroemer, H. (2007). Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1 and Breast Cancer Resistance Protein Interact in the Transepithelial Transport of Steroid Sulfates in Human Placenta. *Drug Metab. Dispos.* *35*, 30–35.

- Gui, C., and Hagenbuch, B. (2009). Role of transmembrane domain 10 for the function of organic anion transporting polypeptide 1B1. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *18*, 2298–2306.
- Guo, Y., Chu, X., Parrott, N., Brouwer, K., Hsu, V., Nagar, S., Matsson, P., Sharma, P., Snoeys, J., Sugiyama, Y., et al. (2018). Advancing Predictions of Tissue and Intracellular Drug Concentrations Using In Vitro, Imaging and PBPK Modeling Approaches. *Clin. Pharmacol. Ther.* *104*, 865–889.
- Hagenbuch, B. (2007). Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *21*, 209–221.
- Hagenbuch, B., and Gui, C. (2008). Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* *38*, 778–801.
- Hagenbuch, B., and Meier, P. (2004). Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflüg. Arch.* *447*, 653–665.
- Hagenbuch, B., and Stieger, B. (2013). The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol. Aspects Med.* *34*, 396.
- Hahn, D., Fukuda, T., Euteneuer, J., Mizuno, T., Vinks, A., Sadhasivam, S., and Emoto, C. (2020). Influence of MRP3 Genetics and Hepatic Expression Ontogeny for Morphine Disposition in Neonatal and Pediatric Patients. *J. Clin. Pharmacol.* *60*, 992–998.
- Hänggi, E., Grundschober, A., Leuthold, S., Meier, P., and St-Pierre, M. (2006). Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1. *Mol. Pharmacol.* *70*, 806–817.
- Hasegawa, M., Kusuhara, H., Sugiyama, D., Ito, K., Ueda, S., Endou, H., and Sugiyama, Y. (2002). Functional Involvement of Rat Organic Anion Transporter 3 (rOat3;Slc22a8) in the Renal Uptake of Organic Anions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *300*, 746–753.
- Hayer-Zillgen, M., Brüss, M., and Bönisch, H. (2002). Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br. J. Pharmacol.* *136*, 829–836.
- He, J., Yu, Y., Prasad, B., Chen, X., and Unadkat, J. (2014a). Mechanism of an unusual, but clinically significant, digoxin–bupropion drug interaction. *Biopharm. Drug Dispos.* *35*, 253–263.
- He, J., Yu, Y., Prasad, B., Link, J., Miyaoka, R., Chen, X., and Unadkat, J. (2014b). PET Imaging of Oatp-Mediated Hepatobiliary Transport of [11C] Rosuvastatin in the Rat. *Mol. Pharm.* *11*, 2745–2754.

Hediger, M., Clémenton, B., Burrier, R., and Bruford, E. (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol. Aspects Med.* *34*, 95–107.

Hemauer, S., Patrikeeva, S., Nanovskaya, T., Hankins, G., and Ahmed, M. (2010). Role of human placental apical membrane transporters in the efflux of glyburide, rosiglitazone, and metformin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *202*, 383.e1-383.e7.

Hendrikse, N., Kuipers, F., Meijer, C., Havinga, R., Bijleveld, C., van der Graaf, W., Vaalburg, W., and de Vries, E. (2004). In vivo imaging of hepatobiliary transport function mediated by multidrug resistance associated protein and P-glycoprotein. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *54*, 131–138.

Hernández Lozano, I., and Langer, O. (2020). Use of imaging to assess the activity of hepatic transporters. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *16*, 149–164.

Hernández Lozano, I., Karch, R., Bauer, M., Blaickner, M., Matsuda, A., Wulkersdorfer, B., Hacker, M., Zeitlinger, M., and Langer, O. (2019). Towards Improved Pharmacokinetic Models for the Analysis of Transporter-Mediated Hepatic Disposition of Drug Molecules with Positron Emission Tomography. *AAPS J.* *21*, 61.

Hillgren, K.M., Keppler, D., Zur, A.A., Giacomini, K.M., Stieger, B., Cass, C.E., Zhang, L., and International Transporter Consortium (2013). Emerging Transporters of Clinical Importance: An Update From the International Transporter Consortium. *Clin. Pharmacol. Ther.* *94*, 52–63.

Hirano, M., Maeda, K., Hayashi, H., Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2005). Bile Salt Export Pump (BSEP/ABCB11) Can Transport a Nonbile Acid Substrate, Pravastatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *314*, 876–882.

Hirano, M., Maeda, K., Shitara, Y., and Sugiyama, Y. (2006). Drug-Drug Interaction Between Pitavastatin and Various Drugs Via Oatp1b1. *Drug Metab. Dispos.* *34*, 1229–1236.

Höglund, P., Nordström, K., Schiöth, H., and Fredriksson, R. (2011). The Solute Carrier Families Have a Remarkably Long Evolutionary History with the Majority of the Human Families Present before Divergence of Bilaterian Species. *Mol. Biol. Evol.* *28*, 1531–1541.

Hosoyamada, M., Sekine, T., Kanai, Y., and Endou, H. (1999). Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* *276*, F122–F128.

Hsiang, B., Zhu, Y., Wang, Z., Wu, Y., Sasseville, V., Yang, W., and Kirchgessner, T. (1999). A Novel Human Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP2) identification of a Liver-Specific Human Organic Anion Transporting Polypeptide and

Identification of Rat and Human Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reductase Inhibitor Transporters. *J. Biol. Chem.* *274*, 37161–37168.

Huang, L., Wang, Y., and Grimm, S. (2006). Atp-Dependent Transport of Rosuvastatin in Membrane Vesicles Expressing Breast Cancer Resistance Protein. *Drug Metab. Dispos.* *34*, 738–742.

Huang, S., Zhang, L., and Giacomini, K. (2010). The International Transporter Consortium: A Collaborative Group of Scientists From Academia, Industry, and the FDA. *Clin. Pharmacol. Ther.* *87*, 32–36.

Huber, R., Gao, B., Sidler Pfändler, M., Zhang-Fu, W., Leuthold, S., Hagenbuch, B., Folkers, G., Meier, P., and Stieger, B. (2007). Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *292*, C795–C806.

Huls, M., Russel, F., and Masereeuw, R. (2009). The Role of ATP Binding Cassette Transporters in Tissue Defense and Organ Regeneration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *328*, 3–9.

Hutton, B. (2014). The origins of SPECT and SPECT/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *41*, 3–16.

Ido, T., Wan, C.-N., Casella, V., Fowler, J.S., Wolf, A.P., Reivich, M., and Kuhl, D.E. (1978). Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs. 18F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and 14C-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J. Label. Compd. Radiopharm.* *14*, 175–183.

Ikoma, Y., Takano, A., Ito, H., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., Arakawa, R., Fukumura, T., Nakao, R., Suzuki, K., and Suhara, T. (2006). Quantitative Analysis of 11C-Verapamil Transfer at the Human Blood–Brain Barrier for Evaluation of P-glycoprotein Function. *J. Nucl. Med.* *47*, 1531–1537.

Ingrisch, M., and Sourbron, S. (2013). Tracer-kinetic modeling of dynamic contrast-enhanced MRI and CT: a primer. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* *40*, 281–300.

Innis, R., Cunningham, V., Delforge, J., Fujita, M., Gjedde, A., Gunn, R., Holden, J., Houle, S., Huang, S., Ichise, M., et al. (2007). Consensus nomenclature for in vivo imaging of reversibly binding radioligands. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *27*, 1533–1539.

International Conference of Harmonization (2009). Guidance on Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals M3(R2).

- Ishiguro, A., Sato, R., and Nagai, N. (2020). Development of a new Japanese guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *35*, 12–17.
- Jacquemin, E., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A.W., and Meier, P.J. (1994). Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 133–137.
- Jakobsen, S., Busk, M., Jensen, J., Munk, O., Zois, N., Alstrup, A., Jessen, N., and Frøkiær, J. (2016). A PET Tracer for Renal Organic Cation Transporters, 11C-Metformin: Radiosynthesis and Preclinical Proof-of-Concept Studies. *J. Nucl. Med.* *57*, 615–621.
- Jetter, A., and Kullak-Ublick, G. (2020). Drugs and hepatic transporters: A review. *Pharmacol. Res.* *154*, 104234.
- Johnson, B., Zhang, P., Schuetz, J., and Brouwer, K. (2006). Characterization of Transport Protein Expression in Multidrug Resistance-Associated Protein (mrp) 2-Deficient Rats. *Drug Metab. Dispos.* *34*, 556–562.
- Jones, T., and Rabiner, E. (2012). The development, past achievements, and future directions of brain PET. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *32*, 1426–1454.
- Jones, H., Mayawala, K., and Poulin, P. (2012a). Dose Selection Based on Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Approaches. *AAPS J.* *15*, 377–387.
- Jones, H., Barton, H., Lai, Y., Bi, Y., Kimoto, E., Kempshall, S., Tate, S., El-Kattan, A., Houston, J., Galetin, A., et al. (2012b). Mechanistic Pharmacokinetic Modeling for the Prediction of Transporter-Mediated Disposition in Humans from Sandwich Culture Human Hepatocyte Data. *Drug Metab. Dispos.* *40*, 1007–1017.
- Jonker, J., Merino, G., Musters, S., van Herwaarden, A., Bolscher, E., Wagenaar, E., Mesman, E., Dale, T., and Schinkel, A.H. (2005). The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat. Med.* *11*, 127–129.
- Kalliokoski, A., and Niemi, M. (2009). Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br. J. Pharmacol.* *158*, 693–705.
- Kalliokoski, A., Neuvonen, M., Neuvonen, P., and Niemi, M. (2008). Different Effects of SLCO1B1 Polymorphism on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Repaglinide and Nateglinide. *J. Clin. Pharmacol.* *48*, 311–321.
- Kamisako, T., Leier, I., Cui, Y., König, J., Buchholz, U., Hummel-Eisenbeiss, J., and Keppler, D. (1999). Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by

recombinant human and rat multidrug resistance protein 2. *Hepatol. Baltim. Md* *30*, 485–490.

Kaneko, K., Tanaka, M., Ishii, A., Katayama, Y., Nakaoka, T., Irie, S., Kawahata, H., Yamanaga, T., Wada, Y., Miyake, T., et al. (2018). A clinical quantitative evaluation of hepatobiliary transport of [¹¹C]Dehydropravastatin in humans using positron emission tomography. *Drug Metab. Dispos.* *46*, 719–728.

Kannan, P., John, C., Zoghbi, S.S., Halldin, C., Gottesman, M.M., Innis, R.B., and Hall, M.D. (2009). Imaging the Function of P-Glycoprotein With Radiotracers: Pharmacokinetics and In Vivo Applications. *Clin. Pharmacol.* *38 Ther.* *86*, 368–377.

Kannan, P., Füredi, A., Dizdarevic, S., Wanek, T., Mairinger, S., Collins, J., Falls, T., van Dam, R., Maheshwari, D., Lee, J., et al. (2020). In vivo characterization of [¹⁸F]AVT-011 as a radiotracer for PET imaging of multidrug resistance. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *47*, 2026–2035.

Karlgren, M., Vildhede, A., Norinder, U., Wisniewski, J., Kimoto, E., Lai, Y., Haglund, U., and Artursson, P. (2012). Classification of Inhibitors of Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs): Influence of Protein Expression on Drug–Drug Interactions. *J. Med. Chem.* *55*, 4740–4763.

Keppler, D. (2011a). Cholestasis and the Role of Basolateral Efflux Pumps. *Z. Für Gastroenterol.* *49*, 1553–1557.

Keppler, D. (2011b). Multidrug Resistance Proteins (MRPs, ABCs): Importance for Pathophysiology and Drug Therapy. In *Drug Transporters*, M. Fromm, and R. Kim, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 299–323.

Keppler, D. (2014). The Roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in Conjugated Hyperbilirubinemia. *Drug Metab. Dispos.* *42*, 561–565.

Khalil, M., Tremoleda, J., Bayomy, T., and Gsell, W. (2011). Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int. J. Mol. Imaging* *2011*.

Khamdang, S., Takeda, M., Shimoda, M., Noshiro, R., Narikawa, S., Huang, X., Enomoto, A., Piyachaturawat, P., and Endou, H. (2004). Interactions of human- and rat-organic anion transporters with pravastatin and cimetidine. *J. Pharmacol. Sci.* *94*, 197–202.

Kim, M., Deacon, P., Tirona, R., Kim, R., Pin, C., Meyer zu Schwabedissen, H., Wang, R., and Schwarz, U. (2017). Characterization of OATP1B3 and OATP2B1 transporter expression in the islet of the adult human pancreas. *Histochem. Cell Biol.* *148*, 345–357.

- King, Z., Sheth, K., Kimberly, W., and Simard, J. (2018). Profile of intravenous glyburide for the prevention of cerebral edema following large hemispheric infarction: evidence to date. *Drug Des. Devel. Ther.* *12*, 2539–2552.
- Kitamura, S., Maeda, K., Wang, Y., and Sugiyama, Y. (2008). Involvement of Multiple Transporters in the Hepatobiliary Transport of Rosuvastatin. *Drug Metab. Dispos.* *36*, 2014–2023.
- Klaassen, C., and Aleksunes, L. (2010). Xenobiotic, Bile Acid, and Cholesterol Transporters: Function and Regulation. *Pharmacol. Rev.* *62*, 1–96.
- Knauer, M., Urquhart, B., Schwabedissen, H., Schwarz, U., Lemke, C., Leake, B., Kim, R., and Tirona, R. (2010). Human Skeletal Muscle Drug Transporters Determine Local Exposure and Toxicity of Statins. *Circ. Res.* *106*, 297–306.
- Knauer, M., Girdwood, A., Kim, R., and Tirona, R. (2013). Transport Function and Transcriptional Regulation of a Liver-Enriched Human Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1 Transcriptional Start Site Variant. *Mol. Pharmacol.* *83*, 1218–1228.
- Kobayashi, D., Nozawa, T., Imai, K., Nezu, J., Tsuji, A., and Tamai, I. (2003). Involvement of Human Organic Anion Transporting Polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-Dependent Transport across Intestinal Apical Membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *306*, 703–708.
- Köck, K., Ferslew, B., Netterberg, I., Yang, K., Urban, T.J., Swaan, P.W., Stewart, P., and Brouwer, K. (2014). Risk Factors for Development of Cholestatic Drug-Induced Liver Injury: Inhibition of Hepatic Basolateral Bile Acid Transporters Multidrug Resistance-Associated Proteins 3 and 4. *Drug Metab. Dispos.* *42*, 665–674.
- Koenen, A., Köck, K., Keiser, M., Siegmund, W., Kroemer, H., and Grube, M. (2012). Steroid hormones specifically modify the activity of organic anion transporting polypeptides. *Eur. J. Pharm. Sci.* *47*, 774–780.
- Koepsell, H. (2013). The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol. Aspects Med.* *34*, 413–435.
- Koepsell, H., Lips, K., and Volk, C. (2007). Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharm. Res.* *24*, 1227–1251.
- König, J., Cui, Y., Nies, A., and Keppler, D. (2000). Localization and Genomic Organization of a New Hepatocellular Organic Anion Transporting Polypeptide. *J. Biol. Chem.* *275*, 23161–23168.

- König, J., Müller, F., and Fromm, M. (2013). Transporters and Drug-Drug Interactions: Important Determinants of Drug Disposition and Effects. *Pharmacol. Rev.* *65*, 944–966.
- Kouzuki, H., Suzuki, H., Ito, K., Ohashi, R., and Sugiyama, Y. (1998). Contribution of Sodium Taurocholate Co-Transporting Polypeptide to the Uptake of Its Possible Substrates Into Rat Hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *286*, 1043–1050.
- Kovacsics, D., Patik, I., and Özvegy-Laczka, C. (2016). The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *0*, 1–16.
- Kreisl, W., Boellaard, R., Morse, C., Woock, A., Zoghbi, S., Shetty, H., Pike, V., and Innis, R. (2015). Increased permeability-glycoprotein inhibition at the human blood-brain barrier can be safely achieved by performing PET during peak plasma concentrations of tariquidar. *J. Nucl. Med.* *56*, 82–87.
- Krishnamurthy, S., and Krishnamurthy, G. (1989). Technetium-99m-iminodiacetic acid organic anions: Review of biokinetics and clinical application in hepatology. *Hepatology* *9*, 139–153.
- Kunze, A., Huwyler, J., Camenisch, G., and Poller, B. (2014). Prediction of Organic Anion-Transporting Polypeptide 1B1- and 1B3-Mediated Hepatic Uptake of Statins Based on Transporter Protein Expression and Activity Data. *Drug Metab. Dispos.* *42*, 1514–1521.
- Kusuhara, H. (2013). Imaging in the Study of Membrane Transporters. *Clin. Pharmacol. Ther.* *94*, 33–36.
- Laboratoire Sanofi (2019). Résumé des caractéristiques du produit - RIFADINE IV 600 mg, poudre et solvant pour solution pour perfusion - Base de données publique des médicaments.
- Lagas, J., van der Kruijssen, C., van de Wetering, K., Beijnen, J., and Schinkel, A. (2009). Transport of Diclofenac by Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) and Stimulation of Multidrug Resistance Protein 2 (ABCC2)-Mediated Drug Transport by Diclofenac and Benzbromarone. *Drug Metab. Dispos.* *37*, 129–136.
- Langer, O. (2016). Use of PET Imaging to Evaluate Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions. *J. Clin. Pharmacol.* *56*, S143–S156.
- Lazarova, N., Zoghbi, S., Hong, J., Seneca, N., Tuan, E., Gladding, R., Liow, J., Taku, A., Innis, R., and Pike, V. (2008). Synthesis and Evaluation of [N-methyl-¹¹C]N-Desmethyl-loperamide as a New and Improved PET Radiotracer for Imaging P-gp Function. *J. Med. Chem.* *51*, 6034–6043.

- Lazarowski, A., Czornyj, L., Lubienieki, F., Girardi, E., Vazquez, S., and D'Giano, C. (2007). ABC Transporters during Epilepsy and Mechanisms Underlying Multidrug Resistance in Refractory Epilepsy. *Epilepsia* *48*, 140–149.
- Lee, W., Glaeser, H., Smith, L., Roberts, R., Moeckel, G., Gervasini, G., Leake, B., and Kim, R. (2005). Polymorphisms in Human Organic Anion-transporting Polypeptide 1A2 (OATP1A2) Implications For Altered Drug Disposition And Central Nervous System Drug Entry. *J. Biol. Chem.* *280*, 9610–9617.
- Lee, Y., Lee, M., and Shim, C. (1991). Pharmacokinetics of diltiazem and deacetyldiltiazem in rats. *Int. J. Pharm.* *76*, 71–76.
- Lehnert, W., Gregoire, M., Reilhac, A., and Meikle, S. (2012). Characterisation of partial volume effect and region-based correction in small animal positron emission tomography (PET) of the rat brain. *NeuroImage* *60*, 2144–2157.
- Lepist, E., and Ray, A. (2017). Beyond drug-drug interactions: effects of transporter inhibition on endobiotics, nutrients and toxins. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *13*, 1075–1087.
- Leuthold, S., Hagenbuch, B., Mohebbi, N., Wagner, C., Meier, P., and Stieger, B. (2009). Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *296*, C570–C582.
- Levêque, D., Lemachatti, J., Nivoix, Y., Coliat, P., Santucci, R., Ubeaud-Séquier, G., Beretz, L., and Vinzio, S. (2010). Mécanismes des interactions médicamenteuses d'origine pharmacocinétique. *Rev. Médecine Interne* *31*, 170–179.
- Li, Z., and Conti, P. (2010). Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *62*, 1031–1051.
- Li, L., Lee, T., Meier, P., and Ballatori, N. (1998). Identification of Glutathione as a Driving Force and Leukotriene C4 as a Substrate for oatp1, the Hepatic Sinusoidal Organic Solute Transporter. *J. Biol. Chem.* *273*, 16184–16191.
- Li, L., Meier, P., and Ballatori, N. (2000). Oatp2 Mediates Bidirectional Organic Solute Transport: A Role for Intracellular Glutathione. *Mol. Pharmacol.* *58*, 335–340.
- Li, R., Bi, Y., Vildhede, A., Scialis, R., Mathialagan, S., Yang, X., Marroquin, L., Lin, J., and Varma, M. (2017). Transporter-Mediated Disposition, Clinical Pharmacokinetics and Cholestatic Potential of Glyburide and Its Primary Active Metabolites. *Drug Metab. Dispos.* *45*, 737–747.
- Lin, L., Yee, S., Kim, R., and Giacomini, K. (2015). SLC Transporters as Therapeutic Targets: Emerging Opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 543–560.

Liu, X. (2019). ABC Family Transporters. In *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity*, X. Liu, and G. Pan, eds. (Singapore: Springer), pp. 13–100.

Liu, H., and Sahi, J. (2016). Role of Hepatic Drug Transporters in Drug Development. *J. Clin. Pharmacol.* *56*, S11–S22.

Löscher, W., and Potschka, H. (2005). Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog. Neurobiol.* *76*, 22–76.

Luurtsema, G., Molthoff, C.F.M., Schuit, R.C., Windhorst, A.D., Lammertsma, A.A., and Franssen, E.J.F. (2005). Evaluation of (R)-[¹¹C]verapamil as PET tracer of P-glycoprotein function in the blood–brain barrier: kinetics and metabolism in the rat. *Nucl. Med. Biol.* *32*, 87–93.

Mack, L., and Tomich, P. (2017). Gestational Diabetes: Diagnosis, Classification, and Clinical Care. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* *44*, 207–217.

Maeda, K., Ohnishi, A., Sasaki, M., Ikari, Y., Aita, K., Watanabe, Y., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., and Senda, M. (2019). Quantitative investigation of hepatobiliary transport of [¹¹C]telmisartan in humans by PET imaging. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *34*, 293–299.

Mahagita, C., Grassl, S., Piyachaturawat, P., and Ballatori, N. (2007). Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *293*, G271–G278.

Mahringer, A., and Fricker, G. (2016). ABC transporters at the blood–brain barrier. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *12*, 499–508.

Mairinger, S., Erker, T., Müller, M., and Langer, O. (2011). PET and SPECT Radiotracers to Assess Function and Expression of ABC Transporters in Vivo. *Curr. Drug Metab.* *12*, 774–792.

Maliepaard, M., van Gastelen, M., Jong, L., Pluim, D., Waardenburg, R., Ruevekamp-Helmers, M., Floot, B., and Schellens, J. (1999). Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP Gene in a Topotecan-selected Ovarian Tumor Cell Line. *Cancer Res.* *59*, 4559–4563.

Maliepaard, M., Scheffer, G., Faneyte, I., van Gastelen, M., Pijnenborg, A., Schinkel, A., van de Vijver, M., Scheper, R., and Schellens, J. (2001). Subcellular Localization and Distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues. *Cancer Res.* *61*, 3458–3464.

Mann, A., Semenenko, I., Meir, M., and Eyal, S. (2015). Molecular Imaging of Membrane Transporters' Activity in Cancer: a Picture is Worth a Thousand Tubes. *AAPS J.* *17*, 788.

Marie, S., and Tournier, N. (2020). [PET imaging to study the functional impact of P-glycoprotein in neuropharmacokinetics]. *Therapie.*

Marie, S., Cisternino, S., Buvat, I., Declèves, X., and Tournier, N. (2017). Imaging Probes and Modalities for the Study of Solute Carrier O (SLCO)-Transport Function In Vivo. *J. Pharm. Sci.* *106*, 2335–2344.

Marie, S., Comtat, C., Caillé, F., Becquemont, L., Bottlaender, M., and Tournier, N. (2019). ¹¹C-glyburide PET imaging unveils the negligible brain penetration of glyburide in humans. *Neurology* *92*, 813–814.

Marie, S., Hernández-Lozano, U., Breuil, L., Saba, W., Novell, A., Gennisson, J., Langer, O., Truillet, C., and Tournier, N. (2020). Validation of Pharmacological Protocols for Targeted Inhibition of Canalicular MRP2 Activity in Hepatocytes Using [^{99m}Tc]mebrofenin Imaging in Rats. *Pharmaceutics* *12*.

Masereeuw, R., Mutsaers, H., Toyohara, T., Abe, T., Jhawar, S., Sweet, D., and Lowenstein, J. (2014). The Kidney and Uremic Toxin Removal: Glomerulus or Tubule? *Semin. Nephrol.* *34*, 191–208.

Masuda, M., Iizuka, Y., Yamazaki, M., Nishigaki, R., Kato, Y., Ni'inuma, K., Suzuki, H., and Sugiyama, Y. (1997). Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer Res.* *57*, 3506–3510.

Matsson, P., Pedersen, J., Norinder, U., Bergström, C., and Artursson, P. (2009). Identification of Novel Specific and General Inhibitors of the Three Major Human ATP-Binding Cassette Transporters P-gp, BCRP and MRP2 Among Registered Drugs. *Pharm. Res.* *26*, 1816–1831.

Matsushima, S., Maeda, K., Kondo, C., Hirano, M., Sasaki, M., Suzuki, H., and Sugiyama, Y. (2005). Identification of the Hepatic Efflux Transporters of Organic Anions Using Double-Transfected Madin-Darby Canine Kidney II Cells Expressing Human Organic Anion-Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1)/Multidrug Resistance-Associated Protein 2, OATP1B1/Multidrug Resistance 1, and OATP1B1/Breast Cancer Resistance Protein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *314*, 1059–1067.

McFeely, S., Wu, L., Ritchie, T., and Unadkat, J. (2019). Organic anion transporting polypeptide 2B1 – More than a glass-full of drug interactions. *Pharmacol. Ther.* *196*, 204–215.

Meier, Y., Eloranta, J., Darimont, J., Ismail, M., Hiller, C., Fried, M., Kullak-Ublick, G.A., and Vavricka, S. (2007). Regional Distribution of Solute Carrier mRNA Expression Along the Human Intestinal Tract. *Drug Metab. Dispos.* *35*, 590–594.

Meier-Abt, F., Mokrab, Y., and Mizuguchi, K. (2006). Organic Anion Transporting Polypeptides of the OATP/SLCO Superfamily: Identification of New Members in Nonmammalian Species, Comparative Modeling and a Potential Transport Mode. *J. Membr. Biol.* *208*, 213–227.

Ménochet, K., Kenworthy, K., Houston, J., and Galetin, A. (2012). Use of Mechanistic Modeling to Assess Interindividual Variability and Interspecies Differences in Active Uptake in Human and Rat Hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* *40*, 1744–1756.

Mikkaichi, T., Suzuki, T., Onogawa, T., Tanemoto, M., Mizutamari, H., Okada, M., Chaki, T., Masuda, S., Tokui, T., Eto, N., et al. (2004). Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3569–3574.

Miyagawa, M., Maeda, K., Aoyama, A., and Sugiyama, Y. (2009). The Eighth and Ninth Transmembrane Domains in Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 Affect the Transport Kinetics of Estrone-3-Sulfate and Estradiol-17 β -D-glucuronide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *329*, 551–557.

van Montfoort, J., Stieger, B., Meijer, D., Weinmann, H., Meier, P., and Fattinger, K. (1999). Hepatic Uptake of the Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Gadoxetate by the Organic Anion Transporting Polypeptide Oatp1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *290*, 153–157.

Mor, A., Kaminski, T., Karbowska, M., and Pawlak, D. (2018). New insight into organic anion transporters from the perspective of potentially important interactions and drugs toxicity. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* *69*.

Morgan, P., Van Der Graaf, P., Arrowsmith, J., Feltner, D., Drummond, S., Wegner, C., and Street, S.D.A. (2012). Can the flow of medicines be improved? Fundamental pharmacokinetic and pharmacological principles toward improving Phase II survival. *Drug Discov. Today* *17*, 419–424.

Morrissey, K.M., Stocker, S., Wittwer, M., Xu, L., and Giacomini, K. (2013). Renal Transporters in Drug Development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *53*, 503–529.

Müller, F., and Fromm, M. (2011). Transporter-mediated drug–drug interactions. *Pharmacogenomics* *12*, 1017–1037.

Muzi, M., Mankoff, D.A., Link, J.M., Shoner, S., Collier, A.C., Sasongko, L., and Unadkat, J.D. (2009). Imaging of Cyclosporine Inhibition of P-Glycoprotein Activity Using ¹¹C-Verapamil in the Brain: Studies of Healthy Humans. *J. Nucl. Med.* *50*, 1267–1275.

Nakao, N., Takagi, T., Iigo, M., Tsukamoto, T., Yasuo, S., Masuda, T., Yanagisawa, T., Ebihara, S., and Yoshimura, T. (2006). Possible involvement of organic anion transporting polypeptide 1c1 in the photoperiodic response of gonads in birds. *Endocrinology* *147*, 1067–1073.

Neyt, S., Huisman, M., Vanhove, C., Man, H., Vliegen, M., Moerman, L., Dumolyn, C., Mannens, G., and Vos, F. (2013). In Vivo Visualization and Quantification of (Disturbed)

Oatp-Mediated Hepatic Uptake and Mrp2-Mediated Biliary Excretion of ^{99m}Tc-Mebrofenin in Mice. *J. Nucl. Med.* *54*, 624–630.

Niemi, M., Pasanen, M., and Neuvonen, P. (2011). Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1: a Genetically Polymorphic Transporter of Major Importance for Hepatic Drug Uptake. *Pharmacol. Rev.* *63*, 157–181.

Nies, A., and Keppler, D. (2007). The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *453*, 643–659.

Nies, A., Koepsell, H., Damme, K., and Schwab, M. (2011). Organic Cation Transporters (OCTs, MATEs), In Vitro and In Vivo Evidence for the Importance in Drug Therapy. In *Drug Transporters*, M. Fromm, and R. Kim, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 105–167.

Noé, J., Portmann, R., Brun, M., and Funk, C. (2007). Substrate-Dependent Drug-Drug Interactions between Gemfibrozil, Fluvastatin and Other Organic Anion-Transporting Peptide (OATP) Substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3. *Drug Metab. Dispos.* *35*, 1308–1314.

Nozaki, Y., Kusuhara, H., Kondo, T., Iwaki, M., Shiroyanagi, Y., Nakayama, H., Horita, S., Nakazawa, H., Okano, T., and Sugiyama, Y. (2007). Species Difference in the Inhibitory Effect of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on the Uptake of Methotrexate by Human Kidney Slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *322*, 1162–1170.

Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., Ishiguro, N., Kishimoto, W., Ludwig-Schwellinger, E., Ebner, T., et al. (2012). 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.* *40*, 83–92.

Olsen, K.M., Kearns, G.L., and Kemp, S.F. (1995). Glyburide Protein Binding and the Effect of Albumin Glycation in Children, Young Adults, and Older Adults with Diabetes. *J. Clin. Pharmacol.* *35*, 739–745.

Ørntoft, N., Munk, O., Frisch, K., Ott, P., Keiding, S., and Sørensen, M. (2017). Hepatobiliary transport kinetics of the conjugated bile acid tracer ¹¹C-CSar quantified in healthy humans and patients by positron emission tomography. *J. Hepatol.* *67*, 321–327.

Otsuka, M., Matsumoto, T., Morimoto, R., Arioka, S., Omote, H., and Moriyama, Y. (2005). A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17923–17928.

- Pasanen, M., Neuvonen, M., Neuvonen, P., and Niemi, M. (2006). SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet. Genomics* *16*, 873–879.
- Passchier, J., van Waarde, A., Doze, P., Elsinga, P., and Vaalburg, W. (2000). Influence of P-glycoprotein on brain uptake of [18F]MPPF in rats. *Eur. J. Pharmacol.* *407*, 273–280.
- Pastor, C. (2018). Isolated Perfused Rat Livers to Quantify the Pharmacokinetics and Concentrations of Gd-BOPTA (Hindawi).
- Patel, M., Taskar, K., and Zamek-Gliszczynski, M. (2016). Importance of Hepatic Transporters in Clinical Disposition of Drugs and Their Metabolites. *J. Clin. Pharmacol.* *56*, S23–S39.
- Patilea-Vrana, G., and Unadkat, J. (2016). Transport vs. metabolism: what determines the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of drugs? Insights from the extended clearance model. *Clin. Pharmacol. Ther.* *100*, 413–418.
- Pauli-Magnus, C., and Meier, P. (2006). Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis. *Hepatology* *44*, 778–787.
- Perek, N., Prevot, N., Koumanov, F., Frere, D., Sabido, O., Beauchesne, P., and Dubois, F. (2000). Involvement of the glutathione S-conjugate compounds and the MRP protein in Tc-99m-tetrofosmin and Tc-99m-sestamibi uptake in glioma cell lines. *Nucl. Med. Biol.* *27*, 299–307.
- Pfeifer, N., Goss, S., Swift, B., Ghibellini, G., Ivanovic, M., Heizer, W., Gangarosa, L., and Brouwer, K. (2013). Effect of Ritonavir on 99mTechnetium–Mebrofenin Disposition in Humans: A Semi-PBPK Modeling and In Vitro Approach to Predict Transporter-Mediated DDIs. *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* *2*, e20.
- Pike, V. (2009). PET Radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* *30*, 431–440.
- Piwnica-Worms, D., Chiu, M., Budding, M., Kronauge, J., Kramer, R., and Croop, J. (1993). Functional Imaging of Multidrug-resistant P-Glycoprotein with an Organotechnetium Complex. *Cancer Res.* *53*, 977–984.
- Pizzagalli, F., Hagenbuch, B., Stieger, B., Klenk, U., Folkers, G., and Meier, P.J. (2002). Identification of a Novel Human Organic Anion Transporting Polypeptide as a High Affinity Thyroxine Transporter. *Mol. Endocrinol.* *16*, 2283–2296.
- Pizzagalli, F., Varga, Z., Huber, R.D., Folkers, G., Meier, P.J., and St-Pierre, M.V. (2003). Identification of Steroid Sulfate Transport Processes in the Human Mammary Gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 3902–3912.

- Poller, B., Wagenaar, E., Tang, S., and Schinkel, A. (2011). Double-Transduced MDCKII Cells To Study Human P-Glycoprotein (ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Interplay in Drug Transport across the Blood–Brain Barrier. *Mol. Pharm.* *8*, 571–582.
- Pollex, E., Lubetsky, A., and Koren, G. (2008). The Role of Placental Breast Cancer Resistance Protein in the Efflux of Glyburide across the Human Placenta. *Placenta* *29*, 743–747.
- Pottier, G., Marie, S., Goutal, S., Auvity, S., Peyronneau, M., Stute, S., Boisgard, R., Dollé, F., Buvat, I., Caillé, F., et al. (2016). Imaging the Impact of the P-Glycoprotein (ABCB1) Function on the Brain Kinetics of Metoclopramide. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* *57*, 309–314.
- Ramsey, L.B., Johnson, S.G., Caudle, K.E., Haidar, C.E., Voora, D., Wilke, R.A., Maxwell, W.D., McLeod, H.L., Krauss, R.M., Roden, D.M., et al. (2014). The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for SLCO1B1 and Simvastatin-Induced Myopathy: 2014 Update. *Clin. Pharmacol. Ther.* *96*, 423–428.
- Rich, D.A. (1997). A brief history of positron emission tomography. *J. Nucl. Med. Technol.* *25*, 4–11.
- von Richter, O., Burk, O., Fromm, M.F., Thon, K.P., Eichelbaum, M., and Kivistö, K. (2004). Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein Expression in Human Small Intestinal Enterocytes and Hepatocytes: A Comparative Analysis in Paired Tissue Specimens. *Clin. Pharmacol. Ther.* *75*, 172–183.
- Riedmaier, A., Nies, A., Schaeffeler, E., and Schwab, M. (2012). Organic Anion Transporters and Their Implications in Pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* *64*, 421–449.
- Riley, R.J., Foley, S.A., Barton, P., Soars, M.G., and Williamson, B. (2016). Hepatic drug transporters: the journey so far. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *12*, 201–216.
- Rizk, M., Zou, L., Savic, R., and Dooley, K. (2017). Importance of Drug Pharmacokinetics at the Site of Action. *Clin. Transl. Sci.* *10*, 133–142.
- Rost, D., König, J., Weiss, G., Klar, E., Stremmel, W., and Keppler, D. (2001). Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. *Gastroenterology* *121*, 1203–1208.
- Roth, M., Timmermann, B., and Hagenbuch, B. (2011). Interactions of Green Tea Catechins with Organic Anion-Transporting Polypeptides. *Drug Metab. Dispos.* *39*, 920–926.

- Roth, M., Obaidat, A., and Hagenbuch, B. (2012). OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br. J. Pharmacol.* *165*, 1260.
- Rowland, M. (2013). Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulations Principles, Methods, and Applications in the Pharmaceutical Industry. *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* *2*, e55.
- Rowland, M., Lesko, L., and Rostami-Hodjegan, A. (2015). Physiologically Based Pharmacokinetics Is Impacting Drug Development and Regulatory Decision Making. *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* *4*, 313–315.
- Saito, K., Ledsam, J., Sourbron, S., Otaka, J., Araki, Y., Akata, S., and Tokuyue, K. (2013). Assessing liver function using dynamic Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI with a standard 5-phase imaging protocol. *J. Magn. Reson. Imaging* *37*, 1109–1114.
- Satlin, L., Amin, V., and Wolkoff, A. (1997). Organic Anion Transporting Polypeptide Mediates Organic Anion/HCO₃ – Exchange. *J. Biol. Chem.* *272*, 26340–26345.
- Satoh, H., Yamashita, F., Tsujimoto, M., Murakami, H., Koyabu, N., Ohtani, H., and Sawada, Y. (2005). Citrus Juices Inhibit the Function of Human Organic Anion-Transporting Polypeptide Oatp-B. *Drug Metab. Dispos.* *33*, 518–523.
- Schaub, T., Kartenbeck, J., König, J., Spring, H., Dörsam, J., Staehler, G., Aime, S., Thon, W., and Keppler, D. (1999). Expression of the MRP2 Gene-Encoded Conjugate Export Pump in Human Kidney Proximal Tubules and in Renal Cell Carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.* *10*, 1159–1169.
- Scherzinger, A., and Hendee, W. (1985). Basic Principles of Magnetic Resonance Imaging—An Update. *West. J. Med.* *143*, 782–792.
- Schiffer, R., Neis, M., Höller, D., Rodríguez, F., Geier, A., Gartung, C., Lammert, F., Dreuw, A., Zwadlo-Klarwasser, G., Merk, H., et al. (2003). Active Influx Transport is Mediated by Members of the Organic Anion Transporting Polypeptide Family in Human Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *120*, 285–291.
- Schinkel, A. (1997). The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin. Cancer Biol.* *8*, 161–170.
- Schinkel, A.H., Mol, C.A.A.M., Wagenaar, E., van Deemter, L., Smit, J.J.M., and Borst, P. (1995). Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *Eur. J. Cancer* *31*, 1295–1298.
- Schuster, V. (2002). Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *68–69*, 633–647.

Seithel, A., Eberl, S., Singer, K., Auge, D., Heinkele, G., Wolf, N., Dörje, F., Fromm, M., and König, J. (2007). The Influence of Macrolide Antibiotics on the Uptake of Organic Anions and Drugs Mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Drug Metab. Dispos.* *35*, 779–786.

Sekine, T., Watanabe, N., Hosoyamada, M., Kanai, Y., and Endou, H. (1997). Expression Cloning and Characterization of a Novel Multispecific Organic Anion Transporter. *J. Biol. Chem.* *272*, 18526–18529.

Seyffer, F., and Tampé, R. (2015). ABC transporters in adaptive immunity. *Biochim. Biophys. Acta* *1850*, 449–460.

Sheth, K., Elm, J., Molyneaux, B., Hinson, H., Beslow, L., Sze, G., Ostwaldt, A., del Zoppo, G., Simard, J., Jacobson, S., et al. (2016). Safety and efficacy of intravenous glyburide on brain swelling after large hemispheric infarction (GAMES-RP): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Neurol.* *15*, 1160–1169.

Shikano, N., Kanai, Y., Kawai, K., Ishikawa, N., and Endou, H. (2004). Transport of ^{99m}Tc-MAG3 via Rat Renal Organic Anion Transporter 1. *J. Nucl. Med.* *45*, 80–85.

Shimizu, M., Fuse, K., Okudaira, K., Nishigaki, R., Maeda, K., Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2005). Contribution of Oatp (organic Anion-Transporting Polypeptide) Family Transporters to the Hepatic Uptake of Fexofenadine in Humans. *Drug Metab. Dispos.* *33*, 1477–1481.

Shingaki, T., Hume, W., Takashima, T., Katayama, Y., Okauchi, T., Hayashinaka, E., Wada, Y., Cui, Y., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., et al. (2015). Quantitative Evaluation of mMate1 Function Based on Minimally Invasive Measurement of Tissue Concentration Using PET with [¹¹C]Metformin in Mouse. *Pharm. Res.* *32*, 2538–2547.

Shirasaka, Y., Suzuki, K., Shichiri, M., Nakanishi, T., and Tamai, I. (2011). Intestinal Absorption of HMG-CoA Reductase Inhibitor Pitavastatin Mediated by Organic Anion Transporting Polypeptide and P-Glycoprotein/Multidrug Resistance 1. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *26*, 171–179.

Shitara, Y., Itoh, T., Sato, H., Li, A., and Sugiyama, Y. (2003). Inhibition of Transporter-Mediated Hepatic Uptake as a Mechanism for Drug-Drug Interaction between Cerivastatin and Cyclosporin A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *304*, 610–616.

Shitara, Y., Hirano, M., Sato, H., and Sugiyama, Y. (2004). Gemfibrozil and Its Glucuronide Inhibit the Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-Mediated Hepatic Uptake and CYP2C8-Mediated Metabolism of Cerivastatin: Analysis of the Mechanism of the Clinically Relevant Drug-Drug Interaction between Cerivastatin and Gemfibrozil. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *311*, 228–236.

Shitara, Y., Sato, H., and Sugiyama, Y. (2005). Evaluation of Drug-Drug Interaction in the Hepatobiliary and Renal Transport of Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *45*, 689–723.

Shitara, Y., Horie, T., and Sugiyama, Y. (2006). Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur. J. Pharm. Sci.* *27*, 425–446.

Shitara, Y., Maeda, K., Ikejiri, K., Yoshida, K., Horie, T., and Sugiyama, Y. (2013). Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm. Drug Dispos.* *34*, 45–78.

Shukla, S., Wu, C.-P., and Ambudkar, S.V. (2008). Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *4*, 205–223.

Sinharay, S., and Pagel, M. (2016). Advances in Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents for Biomarker Detection. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* *9*, 95–115.

Sørensen, M., Munk, O., Ørntoft, N., Frisch, K., Andersen, K., Mortensen, F., Alstrup, A., Ott, P., Hofmann, A., and Keiding, S. (2016). Hepatobiliary Secretion Kinetics of Conjugated Bile Acids Measured in Pigs by ¹¹C-Cholylsarcosine PET. *J. Nucl. Med.* *57*, 961–966.

Sormunen, H., Ruponen, M., and Laitinen, R. (2019). The effect of co-amorphization of glibenclamide on its dissolution properties and permeability through an MDCKII-MDR1 cell layer. *Int. J. Pharm.* *570*, 118653.

Sourbron, S., and Buckley, D. (2013). Classic models for dynamic contrast-enhanced MRI. *NMR Biomed.* *26*, 1004–1027.

Sourbron, S., Sommer, W., Reiser, M., and Zech, C. (2012). Combined Quantification of Liver Perfusion and Function with Dynamic Gadoteric Acid-enhanced MR Imaging. *Radiology* *263*, 874–883.

Srinivas, N. (2016). Pharmacokinetic Interaction of Rifampicin with Oral Versus Intravenous Anticancer Drugs: Challenges, Dilemmas and Paradoxical Effects Due to Multiple Mechanisms. *Drugs RD* *16*, 141–148.

van de Steeg, E., Stránecký, V., Hartmannová, H., Nosková, L., Hřebíček, M., Wagenaar, E., van Esch, A., de Waart, D., Oude Elferink, R., Kenworthy, K., et al. (2012). Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *J. Clin. Invest.* *122*, 519–528.

Stieger, B. (2010). Role of the bile salt export pump, BSEP, in acquired forms of cholestasis. *Drug Metab. Rev.* *42*, 437–445.

St-Pierre, M.V., Serrano, M.A., Macias, R.I.R., Dubs, U., Hoehli, M., Lauper, U., Meier, P.J., and Marin, J.J.G. (2000). Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* *279*, R1495–R1503.

Sugiyama, D., Kusuhara, H., Shitara, Y., Abe, T., and Sugiyama, Y. (2002). Effect of 17 beta-estradiol-D-17 beta-glucuronide on the rat organic anion transporting polypeptide 2-mediated transport differs depending on substrates. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *30*, 220–223.

Swift, B., Pfeifer, N., and Brouwer, K. (2010a). Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* *42*, 446–471.

Swift, B., Yue, W., and Brouwer, K. (2010b). Evaluation of ^{99m}Techneium-Mebrofenin and ^{99m}Techneium-Sestamibi as Specific Probes for Hepatic Transport Protein Function in Rat and Human Hepatocytes. *Pharm. Res.* *27*, 1987–1998.

Takashima, T., Nagata, H., Nakae, T., Cui, Y., Wada, Y., Kitamura, S., Doi, H., Suzuki, M., Maeda, K., Kusuhara, H., et al. (2010). Positron Emission Tomography Studies Using (15R)-16-m-[¹¹C]tolyl-17,18,19,20-tetranorisocarbacyclin Methyl Ester for the Evaluation of Hepatobiliary Transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *335*, 314–323.

Takashima, T., Kitamura, S., Wada, Y., Tanaka, M., Shigihara, Y., Ishii, H., Ijuin, R., Shiomi, S., Nakae, T., Watanabe, Y., et al. (2012). PET Imaging–Based Evaluation of Hepatobiliary Transport in Humans with (15R)-¹¹C-TIC-Me. *J. Nucl. Med.* *53*, 741–748.

Takashima, T., Wu, C., Takashima-Hirano, M., Katayama, Y., Wada, Y., Suzuki, M., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., and Watanabe, Y. (2013). Evaluation of Breast Cancer Resistance Protein Function in Hepatobiliary and Renal Excretion Using PET with ¹¹C-SC-62807. *J. Nucl. Med.* *54*, 267–276.

Takeda, M., Khamdang, S., Narikawa, S., Kimura, H., Hosoyamada, M., Cha, S., Sekine, T., and Endou, H. (2002). Characterization of Methotrexate Transport and Its Drug Interactions with Human Organic Anion Transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *302*, 666–671.

Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. (1997). Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett.* *419*, 107–111.

- Tamai, I., Nezu, J., Uchino, H., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. (2000). Molecular Identification and Characterization of Novel Members of the Human Organic Anion Transporter (OATP) Family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *273*, 251–260.
- Tamai, I., Nozawa, T., Koshida, M., Nezu, J., Sai, Y., and Tsuji, A. (2001). Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm. Res.* *18*, 1262–1269.
- Taniguchi, H., Masuyama, M., Koyama, H., Oguro, A., and Takahashi, T. (1996). Quantitative measurement of human tissue hepatic blood volume by C15O inhalation with positron-emission tomography. *Liver* *16*, 258–262.
- Tanihara, Y., Masuda, S., Sato, T., Katsura, T., Ogawa, O., and Inui, K. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H⁺-organic cation antiporters. *Biochem. Pharmacol.* *74*, 359–371.
- Taskar, K.S., Mariappan, T., Kurawattimath, V., Singh Gautam, S., Radhakrishna Mullapudi, T., Sridhar, S., Kallem, R., Marathe, P., and Mandlekar, S. (2017). Unmasking the Role of Uptake Transporters for Digoxin Uptake Across the Barriers of the Central Nervous System in Rat. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* *9*.
- Te Brake, L., Russel, F., van den Heuvel, J., de Knecht, G., de Steenwinkel, J., Burger, D., Aarnoutse, R., and Koenderink, J. (2016). Inhibitory potential of tuberculosis drugs on ATP-binding cassette drug transporters. *Tuberculosis* *96*, 150–157.
- Teitelbaum, Z., Lave, T., Freijer, J., and Cohen, A. (2010). Risk Assessment in Extrapolation of Pharmacokinetics from Preclinical Data to Humans. *Clin. Pharmacokinet.* *49*, 619–632.
- Testa, A., Zanda, M., Elmore, C., and Sharma, P. (2015). PET Tracers To Study Clinically Relevant Hepatic Transporters. *Mol. Pharm.* *12*, 2203–2216.
- Thakkar, N., Slizgi, J., and Brouwer, K. (2017). Effect of Liver Disease on Hepatic Transporter Expression and Function. *J. Pharm. Sci.* *106*, 2282–2294.
- The SEARCH collaborative group (2008). SLCO1B1 Variants and Statin-Induced Myopathy — A Genomewide Study. *N. Engl. J. Med.* *359*, 789–799.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., and Willingham, M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7735–7738.
- Tournier, N., André, P., Blondeel, S., Rizzo-Padoin, N., du Moulinet d'Hardemarre, A., Declèves, X., Scherrmann, J., and Cisternino, S. (2009). Ibogaine labeling with ^{99m}Tc-

tricarbonyl: Synthesis and transport at the mouse blood–brain barrier. *J. Pharm. Sci.* *98*, 4650–4660.

Tournier, N., Cisternino, S., Peyronneau, M., Goutal, S., Dolle, F., Scherrmann, J., Bottlaender, M., Saba, W., and Valette, H. (2012). Discrepancies in the P-glycoprotein-mediated transport of (18)F-MPPF: a pharmacokinetic study in mice and non-human primates. *Pharm. Res.* *29*, 2468–2476.

Tournier, N., Saba, W., Cisternino, S., Peyronneau, M., Damont, A., Goutal, S., Dubois, A., Dollé, F., Scherrmann, J., Valette, H., et al. (2013). Effects of Selected OATP and/or ABC Transporter Inhibitors on the Brain and Whole-Body Distribution of Glyburide. *AAPS J.* *15*, 1082–1090.

Tournier, N., Stieger, B., and Langer, O. (2018). Imaging techniques to study drug transporter function in vivo. *Pharmacol. Ther.* *189*, 104–122.

Tournier, N., Bauer, M., Pichler, V., L, L., Klebermass, E.-M., Bammingner, K., Matzneller, P., Weber, M., Karch, R., Caille, F., et al. (2019). Impact of P-glycoprotein Function on the Brain Kinetics of the Weak Substrate 11C-Metoclopramide Assessed with PET Imaging in Humans. *J. Nucl. Med.* *60*, 985–991.

Toyohara, T., Suzuki, T., Morimoto, R., Akiyama, Y., Souma, T., Shiwaku, H., Takeuchi, Y., Mishima, E., Abe, M., Tanemoto, M., et al. (2009). SLCO4C1 Transporter Eliminates Uremic Toxins and Attenuates Hypertension and Renal Inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 2546–2555.

Traxl, A., Wanek, T., Mairinger, S., Stanek, J., Filip, T., Sauberer, M., Müller, M., Kuntner, C., and Langer, O. (2015). Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein Influence In Vivo Disposition of 11C-Erlotinib. *J. Nucl. Med.* *56*, 1930–1936.

Traxl, A., Beikbaghban, T., Wanek, T., Kryeziu, K., Pirker, C., Mairinger, S., Stanek, J., Filip, T., Sauberer, M., Kuntner, C., et al. (2017). [11C]Erlotinib PET cannot detect acquired erlotinib resistance in NSCLC tumor xenografts in mice. *Nucl. Med. Biol.* *52*, 7–15.

Tsai, P., and Tsai, T. (2004). Hepatobiliary Excretion of Berberine. *Drug Metab. Dispos.* *32*, 405–412.

Uchida, Y., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Ikeda, C., Suzuki, T., Kamiie, J., and Terasaki, T. (2011). Quantitative targeted absolute proteomics of human blood–brain barrier transporters and receptors. *J. Neurochem.* *117*, 333–345.

Unger, M., Mudunuru, J., Schwab, M., Hopf, C., Drewes, G., Nies, A., Zamek-Gliszczynski, M., and Reinhard, F. (2020). Clinically Relevant OATP2B1 Inhibitors in Marketed Drug Space. *Mol. Pharm.* *17*, 488–498.

- Urquhart, B., and Kim, R. (2009). Blood–brain barrier transporters and response to CNS-active drugs. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* *65*, 1063.
- Vadlapatla, R., Vadlapudi, A., Kwatra, D., Pal, D., and Mitra, A. (2011). Differential effect of P-gp and MRP2 on cellular translocation of gemifloxacin. *Int. J. Pharm.* *420*, 26–33.
- Vallabhajosula, S., Solnes, L., and Vallabhajosula, B. (2011). A Broad Overview of Positron Emission Tomography Radiopharmaceuticals and Clinical Applications: What Is New? *Semin. Nucl. Med.* *41*, 246–264.
- Vandenberghe, S., Moskal, P., and Karp, J. (2020). State of the art in total body PET. *EJNMMI Phys.* *7*, 35.
- VanWert, A., Gionfriddo, M., and Sweet, D. (2010). Organic anion transporters: discovery, pharmacology, regulation and roles in pathophysiology. *Biopharm. Drug Dispos.* *31*, 1–71.
- Varma, M., Rotter, C., Chupka, J., Whalen, K., Duignan, D., Feng, B., Litchfield, J., Goosen, T., and El-Kattan, A. (2011). pH-Sensitive Interaction of HMG-CoA Reductase Inhibitors (Statins) with Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1. *Mol. Pharm.* *8*, 1303–1313.
- Varma, M., Scialis, R., Lin, J., Bi, Y., Rotter, C., Goosen, T., and Yang, X. (2014). Mechanism-Based Pharmacokinetic Modeling to Evaluate Transporter-Enzyme Interplay in Drug Interactions and Pharmacogenetics of Glyburide. *AAPS J.* *16*, 736–748.
- Vasilyeva, A., Durmus, S., Li, L., Wagenaar, E., Hu, S., Gibson, A., Panetta, J., Mani, S., Sparreboom, A., Baker, S., et al. (2015). Hepatocellular Shuttling and Recirculation of Sorafenib-Glucuronide Is Dependent on Abcc2, Abcc3, and Oatp1a/1b. *Cancer Res.* *75*, 2729–2736.
- Vdoviaková, K., Petrovová, E., Krešáková, L., Maloveská, M., Teleky, J., Jenčová, J., Živčák, J., and Jenča, A. (2016). Importance Rat Liver Morphology and Vasculature in Surgical Research. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *22*, 4716–4728.
- Vourvahis, M., and Kashuba, A. (2007). Mechanisms of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Drug Interactions Associated with Ritonavir-Enhanced Tipranavir. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* *27*, 888–909.
- Vriend, J., Nieskens, T., Vormann, M., van den Berge, B., van den Heuvel, A., Russel, F., Suter-Dick, L., Lanz, H., Vulto, P., Masereeuw, R., et al. (2018). Screening of Drug-Transporter Interactions in a 3D Microfluidic Renal Proximal Tubule on a Chip. *AAPS J.* *20*, 87.
- Wagner, C., Bauer, M., Karch, R., Feurstein, T., Kopp, S., Chiba, P., Kletter, K., Löscher, W., Müller, M., Zeitlinger, M., et al. (2009). A Pilot Study to Assess the Efficacy of Tariquidar

to Inhibit P-glycoprotein at the Human Blood–Brain Barrier with (R)-11C-Verapamil and PET. *J. Nucl. Med.* *50*, 1954–1961.

Wanek, T., Römermann, K., Mairinger, S., Stanek, J., Sauberer, M., Filip, T., Traxl, A., Kuntner, C., Pahnke, J., Bauer, F., et al. (2015). Factors Governing P-Glycoprotein-Mediated Drug–Drug Interactions at the Blood–Brain Barrier Measured with Positron Emission Tomography. *Mol. Pharm.* *12*, 3214–3225.

Wang, H., Yan, Z., Dong, M., Zhu, X., Wang, H., and Wang, Z. (2012). Alteration in placental expression of bile acids transporters OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Arch. Gynecol. Obstet.* *285*, 1535–1540.

Wang, L., Prasad, B., Salphati, L., Chu, X., Gupta, A., Hop, C., Evers, R., and Unadkat, J. (2015). Interspecies Variability in Expression of Hepatobiliary Transporters across Human, Dog, Monkey, and Rat as Determined by Quantitative Proteomics. *Drug Metab. Dispos.* *43*, 367–374.

Wang, P., Hata, S., Xiao, Y., Murray, J., and Wolkoff, A. (2008). Topological assessment of oatp1a1: a 12-transmembrane domain integral membrane protein with three N-linked carbohydrate chains. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *294*, G1052–G1059.

Weaver, Y., and Hagenbuch, B. (2010). Several conserved positively charged amino acids in OATP1B1 are involved in binding or translocation of different substrates. *J. Membr. Biol.* *236*, 279–290.

Wen, X., Joy, M., and Aleksunes, L.M. (2017). In Vitro Transport Activity and Trafficking of MRP2/ABCC2 Polymorphic Variants. *Pharm. Res.* *34*, 1637–1647.

Willmann, J., van Bruggen, N., Dinkelborg, L., and Gambhir, S. (2008). Molecular imaging in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* *7*, 591–607.

Wolf, A., Bauer, B., and Hartz, A. (2012). ABC Transporters and the Alzheimer's Disease Enigma. *Front. Psychiatry* *3*.

Woodward, O., Köttgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W., and Köttgen, M. (2009). Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 10338–10342.

Wu, H., Hristeva, N., Chang, J., Liang, X., Li, R., Frassetto, L., and Benet, L. (2017). Rosuvastatin pharmacokinetics in Asian and White subjects wild-type for both OATP1B1 and BCRP under control and inhibited conditions. *J. Pharm. Sci.* *106*, 2751–2757.

Wu, M., Huang, Y., and Hsiao, J. (2019). Use of Indocyanine Green (ICG), a Medical Near Infrared Dye, for Enhanced Fluorescent Imaging—Comparison of Organic Anion Transporting Polypeptide 1B3 (OATP1B3) and Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) Reporter Genes. *Molecules* *24*.

Wu, X., Prasad, P., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1998). cDNA Sequence, Transport Function, and Genomic Organization of Human OCTN2, a New Member of the Organic Cation Transporter Family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *246*, 589–595.

Wuest, F. (2007). Fluorine-18 labeling of small molecules: the use of ¹⁸F-labeled aryl fluorides derived from no-carrier-added [¹⁸F]fluoride as labeling precursors. *Ernst Scher. Res. Found. Workshop* 51–78.

Xiao, Y., Paudel, R., Liu, J., Ma, C., Zhang, Z., and Zhou, S. (2016). MRI contrast agents: Classification and application (Review). *Int. J. Mol. Med.* *38*, 1319–1326.

Yabuuchi, H., Tamai, I., Nezu, J., Sakamoto, K., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., and Tsuji, A. (1999). Novel Membrane Transporter OCTN1 Mediates Multispecific, Bidirectional, and pH-Dependent Transport of Organic Cations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *289*, 768–773.

Yamada, A., Maeda, K., Kamiyama, E., Sugiyama, D., Kondo, T., Shiroyanagi, Y., Nakazawa, H., Okano, T., Adachi, M., Schuetz, J., et al. (2007). Multiple Human Isoforms of Drug Transporters Contribute to the Hepatic and Renal Transport of Olmesartan, a Selective Antagonist of the Angiotensin II AT1-Receptor. *Drug Metab. Dispos.* *35*, 2166–2176.

Yamazaki, M., Akiyama, S., Ni'inuma, K., Nishigaki, R., and Sugiyama, Y. (1997). Biliary Excretion of Pravastatin in Rats: Contribution of the excretion pathway mediated by canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT). *Drug Metab. Dispos.* *25*, 1123–1129.

Yang, F., Takeuchi, T., Tsuneyama, K., Yokoi, T., and Oda, S. (2019). Experimental Evidence of Liver Injury by BSEP-Inhibiting Drugs With a Bile Salt Supplementation in Rats. *Toxicol. Sci.* *170*, 95–108.

Yao, J., Hong, W., Huang, J., Zhan, K., Huang, H., and Hong, M. (2012). N-glycosylation Dictates Proper Processing of Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1. *PLoS ONE* *7*.

Ye, Z., Camus, S., Augustijns, P., and Annaert, P. (2010). Interaction of eight HIV protease inhibitors with the canalicular efflux transporter ABCC2 (MRP2) in sandwich-cultured rat and human hepatocytes. *Biopharm. Drug Dispos.* *31*, 178–188.

- Yeung, P., Alcos, A., Tang, J., and Tsui, B. (2007). Pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in rats: comparing single vs repeated subcutaneous injections in vivo. *Biopharm. Drug Dispos.* *28*, 403–407.
- Yin, J., and Wang, J. (2016). Renal drug transporters and their significance in drug–drug interactions. *Acta Pharm. Sin. B* *6*, 363–373.
- Yoshida, K., Maeda, K., and Sugiyama, Y. (2013). Hepatic and Intestinal Drug Transporters: Prediction of Pharmacokinetic Effects Caused by Drug-Drug Interactions and Genetic Polymorphisms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *53*, 581–612.
- Yuan, H., Feng, B., Yu, Y., Chupka, J., Zheng, J., Heath, T., and Bond, B. (2009). Renal organic anion transporter-mediated drug-drug interaction between gemcabene and quinapril. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *330*, 191–197.
- Zamek-Gliszczyński, M., Taub, M., Chothe, P., Chu, X., Giacomini, K.M., Kim, R., Ray, A., Stocker, S., Unadkat, J., Wittwer, M., et al. (2018). Transporters in Drug Development: 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance. *Clin. Pharmacol. Ther.* *104*, 890–899.
- Zamek-Gliszczyński, M.J., Hoffmaster, K.A., Tweedie, D.J., Giacomini, K.M., and Hillgren, K.M. (2012). Highlights from the International Transporter Consortium Second Workshop. *Clin. Pharmacol. Ther.* *92*, 553–556.
- Zelcer, N., van de Wetering, K., Hillebrand, M., Sarton, E., Kuil, A., Wielinga, P., Tephly, T., Dahan, A., Beijnen, J., and Borst, P. (2005). Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7274–7279.
- Zhang, X., and Wright, S. (2009). MATE1 has an external COOH terminus, consistent with a 13-helix topology. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* *297*, F263–F271.
- Zhang, L., Huang, S.-M., and Lesko, L.J. (2011). Transporter-Mediated Drug–Drug Interactions. *Clin. Pharmacol. Ther.* *89*, 481–484.
- Zheng, H., Huang, Y., Frassetto, L., and Benet, L. (2009). Elucidating Rifampin’s Inducing and Inhibiting Effects on Glyburide Pharmacokinetics and Blood Glucose in Healthy Volunteers: Unmasking the Differential Effect of Enzyme Induction and Transporter Inhibition for a Drug and Its Primary Metabolite. *Clin. Pharmacol. Ther.* *85*, 78.
- Zhou, S.-F. (2008). Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* *38*, 802–832.
- Zhou, L., Narahariseti, S., Wang, H., Unadkat, J., Hebert, M., and Mao, Q. (2008). The Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2) Limits Fetal Distribution of Glyburide

in the Pregnant Mouse: An Obstetric-Fetal Pharmacology Research Unit Network and University of Washington Specialized Center of Research Study. *Mol. Pharmacol.* *73*, 949–959.

Zoghbi, S.S., Liow, J.-S., Yasuno, F., Hong, J., Tuan, E., Lazarova, N., Gladding, R.L., Pike, V.W., and Innis, R.B. (2008). ¹¹C-Loperamide and Its N-Desmethyl Radiometabolite Are Avid Substrates for Brain Permeability-Glycoprotein Efflux. *J. Nucl. Med.* *49*, 649–656.

Zolk, O., and Fromm, M.F. (2011). Transporter-Mediated Drug Uptake and Efflux: Important Determinants of Adverse Drug Reactions. *Clin. Pharmacol. Ther.* *89*, 798–805.

Zoufal, V., Mairinger, S., Brackhan, M., Krohn, M., Filip, T., Sauberer, M., Stanek, J., Wanek, T., Tournier, N., Bauer, M., et al. (2020). Imaging P-glycoprotein Induction at the Blood-Brain Barrier of a Beta-Amyloidosis Mouse Model with ¹¹C-Metoclopramide PET. *J. Nucl. Med.* *61*, 1050–1057.

Publications

Publications relatives au travail de thèse

Articles internationaux

Validation of Pharmacological Protocols for Targeted Inhibition of Canalicular MRP2 Activity in Hepatocytes Using [^{99m}Tc]mebrofenin Imaging in Rats.

Marie S., Hernández-Lozano I., Breuil L., Saba W., Novell A., Gennisson J.L., Langer O., Truillet C., Tournier N.

Pharmaceutics. 2020, 12(6):486.

Automated two-steps manufacturing of ¹¹C-glyburide for PET imaging in Humans

Caillé F., Gervais P., Auvity S., Coulon C., Marie S., Tournier N., Kuhnast B.

Nuclear Medicine and Biology. 2020, 84-85:20-27.

¹¹C-glyburide PET Imaging Unveils the Negligible Brain Penetration of Glyburide in Humans.

Marie S., Comtat C., Caillé F., Becquemont L., Bottlaender M., Tournier N.

Neurology. 2019, 92(17):813-814.

Imaging Probes and Modalities for the Study of Solute Carrier O (SLCO)-Transport Function In Vivo.

Marie S., Cisternino S., Buvat I., Declèves X., Tournier N.

Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017, 106(9):2335-2344.

Communications orales internationales

Validation of [¹¹C]glyburide as PET probe for imaging OATP function in humans.

Marie S., Breuil L., Chalampalakis Z., Becquemont L., Goislard M., Caillé F., Comtat C., Bottlaender M., Tournier N.

33rd Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 2020, virtual edition.

Application of a generic dynamic reconstruction algorithm on PET whole-body pharmacokinetic studies

Chalampalakis Z., Stute S., Filipovic M., Marie S., Bottlaender M., Tournier N., Comtat C.

33rd Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 2020, virtual edition.

Strategies to improve imaging methods for the study of hepatocyte transporter function *in vivo*.

Marie S., Hernández-Lozano I., Breuil L., Goislard M., Langer O., Saba W., Truillet C., Tournier N.

Hepatocyte Network Transporter Symposium. 2019, Les Diablerets (Suisse).

Quantification of hepatic and extrahepatic OATP function using whole-body dynamic ^{11}C -glyburide PET imaging.

Marie S., Auvity S., Stute S., Goutal S., Saba W., Bottlaender M., Kuhnast B., Tournier N.
31st Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 2018, Düsseldorf (Allemagne).

Communications orales nationales

Imaging hepatic and extrahepatic OATP function: pharmacokinetic importance for drug delivery to tissues.

Marie S., Auvity S., Stute S., Goutal S., Saba W., Bottlaender M., Kuhnast B., Tournier N.
Congrès de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique. 2019, Lyon.

Communications affichées internationales

Targeted pharmacological inhibition and kinetic modeling to improve the performance of [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]mebrofenin as probe to study MRP2 activity at the liver-bile interface

Marie S., Hernandez-Lozano I., Breuil L., Saba W., Goislard M., Novell A., Gennisson J.L., Langer O., Truillet C., Tournier N.

33rd Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 2020, virtual edition.

Determination of the MRP2-mediated transport capacity at the liver-bile interface using an improved $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -mebrofenin imaging protocol

Marie S., Hernandez-Lozano I., Breuil L., Saba W., Goislard M., Novell A., Gennisson J.L., Langer O., Truillet C., Tournier N.

Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Annual Meeting. 2020, virtual edition.

Dynamic 4D PET reconstruction using the spectral model and adaptive residual modelling

Chalampalakis Z., Stute S., Filipovic M., Marie S., Bottlaender M., Tournier N., Comtat C.

IEEE Nuclear Science Symposium (NSS) and Medical Imaging Conference (MIC). 2020, Boston (Etats-Unis).

Automated two-steps manufacturing of ^{11}C -glyburide for PET imaging in Humans

Caillé F., Gervais P., Auvity S., Coulon C., Marie S., Tournier N., Kuhnast B.

4th Nuclear Technologies for Health Symposium. 2020, Nantes (France).

A simple and quantitative method to address the synchronicity between uptake and efflux transporters in the rat liver using ^{99m}Tc -mebrofenin scintigraphy

Marie S., Hernández-Lozano I., Breuil L., Langer O., Truillet C., Tournier N.

32nd Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 2020, Barcelone (Espagne).

Communications affichées nationales

Kinetic models to improve the interpretation of the hepatic transport of ^{99m}Tc -mebrofenin

Marie S., Breuil L., Hernández-Lozano I., Goislard M., Saba W., Langer O., Truillet C., Tournier N.

6^{èmes} Journées Françaises de la Médecine Nucléaire. 2020, Montrouge.

Mise au point préclinique d'une méthode d'exploration des transporteurs OATP par imagerie TEP corps-entier dynamique au ^{11}C -glyburide

Marie S., Auvity S., Stute S., Goutal S., Saba W., Bottlaender M., Kuhnast B., Tournier N.

5^{èmes} Journées Françaises de la Médecine Nucléaire. 2019, Montrouge.

Publications supplémentaires

Articles internationaux

Impact of P-glycoprotein Function on the Brain Kinetics of the Weak Substrate ¹¹C- Metoclopramide Assessed with PET Imaging in Humans

Tournier N., Bauer M., Pichler V., Nics L., Klebermass E.M., Bamming K., Matzneller P., Weber M., Karch R., Caillé F., Auvity S., Marie S., Jäger W., Wadsak W., Hacker M., Zeitlinger M., Langer O

Journal of Nuclear Medicine. 2019, 60(7):985-991.

Positron Emission Tomography imaging Reveals an Importance of Saturable Liver uptake transport for the pharmacokinetics of metoclopramide

Caillé F., Goutal S., Marie S., Auvity S., Cisternino S., Kuhnast B., Pottier G., Tournier N.
Contrast Media and Molecular Imaging. 2018, 2018:7310146.

Impact of rifampicin-inhibitable transport on the liver distribution and tissue kinetics of erlotinib assessed with PET imaging in rats.

Amor D., Goutal S., Marie S., Caillé F., Bauer M., Langer O., Auvity S., Tournier N.
European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research. 2018, 8(1):81.

P-glycoprotein (ABCB1) inhibits the influx and increases the efflux of ¹¹C-metoclopramide across the blood-brain barrier: a PET study on non-human primates

Auvity S, Caillé F, Marie S., Wimberley C, Bauer M, Langer O, Buvat I, Goutal S, Tournier N.

Journal of Nuclear Medicine. 2018, 59(10):1609-1615.

Validation of an ergonomic method to withdraw [^{99m}Tc] radiopharmaceuticals

Blondeel-Gomes S., Marie S., Fouque J., Loyeau S., Madar O., Lokiec F.

Journal of Nuclear Medicine Technology. 2017, jnmt.117.199133.

Imaging the impact of the P-glycoprotein (ABCB1) function on the brain kinetics of metoclopramide.

Pottier G., Marie S., Goutal S., Auvity S., Peyronneau MA, Stüte S., Boisgard R., Dollé F., Buvat I, Caillé F., Tournier N.

The Journal of Nuclear Medicine. 2016, 57(2):309-14.

Article en français

[PET imaging to study the functional impact of P-glycoprotein in neuropharmacokinetics]

Marie S., Tournier N.

Thérapies. 2020, S0040-5957(20)30043-3.

Communications orales internationales

In vivo comparison of the sensitivity of PET radioligands to detect moderate changes in P-gp function at the blood-brain barrier

Breuil L., Caillé F., Marie S., Goutal S., Auvity S., Goislard M., Coulon C., Lekieffre T., Saba W., Tournier N.

33rd Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 2020, virtual edition.

¹¹C-metoclopramide PET imaging to reveal and quantify the contribution of the P-glycoprotein to the clearance of its substrates from the brain

Auvity S., Marie S., Caillé F., Wimberley C., Bauer M., Langer O., Buvat I., Goutal S., Tournier N.

31st Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 2018, Düsseldorf (Allemagne).

Quantification of the efflux clearance role of the P-glycoprotein at the blood-brain barrier: a ¹¹C-metoclopramide PET study in baboons

Auvity S., Marie S., Caillé F., Wimberley C., Bauer M., Langer O., Buvat I., Goutal S., Tournier N.

XII International Symposium of Functional Neuroreceptor Mapping of the Living Brain. 2018, Londres (Royaume-Uni).

P-glycoprotein (ABCB1) function at the blood-brain barrier drives the clearance of its substrates from the brain back to the blood: a ¹¹C-metoclopramide PET study in baboons

Auvity S., Marie S., Caillé F., Wimberley C., Bauer M., Langer O., Buvat I., Goutal S., Tournier N.

Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Annual Meeting. 2018, Philadelphia (Etats-Unis).

Preclinical development of ¹¹C-metoclopramide, an alternative PET radioligand to image P-glycoprotein function at the blood-brain barrier.

Pottier G., Goutal S., Marie S., Caillé F., Auvity S., Peyronneau MA, Stüte S., Dollé F., Boisgard R., Tournier N.

11th International Conference on Cerebral Vascular Biology. 2015, Paris (France).

Communications orales nationales

Refining the use of PET imaging to detect moderate changes in P-gp function at the blood-brain barrier

Breuil L., Saba W., Marie S., Goutal S., Auvity S., Goislard M., Coulon C., Lekieffre T., Caillé F., Tournier N.

Congrès de la Société pour l'Etudes des Interfaces Sang-Cerveau. 2019, Orsay.

Is there a risk for alcohol drug-drug interaction involving P-glycoprotein at the blood-brain barrier? A PET imaging study using ¹¹C-metoclopramide in baboons

Auvity S, Marie S., Goutal S., Saba W., Caillé F., Tournier N.

Congrès de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique. 2019; Lyon.

Quantification des propriétés de clairance fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique chez l'Homme par imagerie TEP au ¹¹C-metoclopramide

Tournier N., Bauer M., Marie S., Auvity S, Caillé F, Pichler V., Nics L, Hacker M., Zeitlinger M., Langer O.

5^{èmes} Journées Françaises de la Médecine Nucléaire. 2019, Montrouge.

Imaging the impact of OATP function on erlotinib exposure to tissues: a [¹¹C]erlotinib PET imaging study in rats.

Amor D, Caillé F., Goutal S., Marie S., Goislard M., Auvity S., Tournier N.

Congrès de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique. 2018; Toulouse.

Communications affichées internationales

Tailoring the sensitivity of PET tracers to detect P-glycoprotein-mediated drug-drug interactions at the blood-brain barrier: a comparative *in vitro* study

Breuil L., Marie S., Goislard M., Langer O., Del Vecchio A., Audisio D., Caillé F., Tournier N.

32nd Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 2020, Barcelone (Espagne).

Are there gender differences in P-glycoprotein function at the rat blood-brain barrier?

Marie S., Pottier G., Goutal S., Auvity S., Buvat I., Boisgard R., Dollé F., Caillé F., Tournier N.

28th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 2015, Hambourg (Allemagne).

Relevance of the lithium-pilocarpine rat model for the study of P-glycoprotein overexpression during pharmacoresistant epilepsy.

Marie S., Pottier G., Caille F., Goutal S., Boisgard R., Dolle F., Stute S., Hosten B., Jacob A., Tournier N.

12th International Conference on Quantification of Brain Function with PET. 2015, Vancouver (Canada).

Preclinical evaluation of ¹¹C-metoclopramide in rat: toward a moderate P-glycoprotein substrate with significant baseline brain uptake.

Pottier G., Marie S., Goutal S., Peyronneau MA, Caillé F, Stüte S., Boisgard R, Dollé F., Tournier N.

Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Annual Meeting. 2015, Baltimore (Etats-Unis).

Development of a perfusion device for therapeutic radiopharmaceutical (Lutathera®).

Marie S., Tran L., Mazelier C., Lumbroso J., Gaudin A., Lemare F., Guilabert N., Rémy H.
17th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals. 2014, Pampelune, (Espagne).

Communications affichées nationales

Neuropharmacokinetic impact of the P-glycoprotein-mediated efflux clearance property of the blood-brain barrier: first human PET data with ¹¹C-metoclopramide

Tournier N., Bauer M., Auvity S, Marie S., Pichler V., Nics L., Klebermass E.M., Hacker M., Zeitlinger M., Langer O.
Congrès de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique. 2019; Lyon.

L'imagerie TEP dynamique au ¹¹C-métoclopramide révèle l'importance de la P-glycoprotéine sur la clairance cérébrale des médicaments

Auvity S., Marie S., Caillé F., Wimberley C., Bauer M., Langer O., Buvat I., Goutal S., Tournier N.
4^{èmes} Journées Francophones de Médecine Nucléaire. 2018, Lille.

Titre : Imagerie translationnelle pour la mise en évidence des répercussions pharmacocinétiques des transporteurs de médicaments

Mots clés : pharmacocinétique, transporteurs membranaires, imagerie, translationnel, hépatocyte, OATP

Résumé : La distribution des médicaments du sang vers les tissus, où ils exercent leurs effets pharmacologiques et/ou toxiques, implique souvent des transporteurs qui régulent leur passage membranaire. Les transporteurs Organic Anion-Transporting Polypeptide (OATP), avec d'autres systèmes de transporteurs hépatocytaires, participent à l'élimination hépatique de nombreux médicaments. Certains OATP ont été retrouvés dans d'autres organes où leurs répercussions pharmacocinétiques restent mal connues. L'objectif de ce travail a été de développer des approches d'imagerie originales permettant de mesurer sélectivement l'importance du transport OATP à l'interface sang-tissu. Tout d'abord, nous avons utilisé la [^{99m}Tc]mébrofénine, un radiopharmaceutique classiquement utilisé pour la scintigraphie hépatobiliaire. Chez le rat, nous avons validé un protocole d'inhibition pharmacologique ciblé, réalisable chez l'Homme, permettant de distinguer l'activité OATP sinusoidale de l'activité d'excrétion biliaire, de manière non-invasive. Nous avons ensuite optimisé les méthodes d'analyse des images dynamiques TEP (tomographie par émission de positons) issues d'une nouvelle sonde substrat OATP, le [¹¹C]glyburide, utilisée pour la première fois chez l'Homme. Une approche d'acquisition corps-entier dynamique nous a permis de quantifier l'activité OATP dans les tissus hépatiques et extra-hépatiques chez le primate puis chez l'Homme. L'imagerie translationnelle ouvre des perspectives d'études pharmacocinétiques originales, jusqu'alors inenvisageables chez l'Homme. Le développement de radiopharmaceutiques dédiés à la mesure de l'activité des transporteurs et l'optimisation de l'analyse des données d'imagerie qui en sont issues permettent d'en apprécier les répercussions fonctionnelles sur les étapes de distribution et d'élimination.

Title : Translational imaging to study the pharmacokinetic impact of drug transporters

Keywords : pharmacokinetics, membrane transporters, imaging, translational, hepatocyte, OATP

Abstract : Drug distribution from blood to tissues, where pharmacological and/or toxic effects occur, often involves transporters that control their passage across biological membranes. Organic-Anion Transporting Polypeptides (OATP), among other hepatocyte transporters, mediate the hepatic elimination of many drugs. Some OATP are expressed in other organs where their impact for pharmacokinetics is unclear. The aim of this work was to develop original imaging methods to selectively measure the OATP-mediated transport at the blood-tissue interface. First, we used [^{99m}Tc]mebrofenin, a radiopharmaceutical routinely used for hepatobiliary scintigraphy. In rats, we validated a targeted pharmacological inhibition protocol, feasible in Humans, allowing to study the sinusoidal OATP activity apart from biliary excretion, in a non-invasive way. Then we optimized the analysis methods of PET (positron emission tomography) kinetics obtained using the new OATP-substrate probe [¹¹C]glyburide, used for the first time in Humans. A whole-body dynamic acquisition method enabled quantitative determination of OATP function in the liver and other tissues in primate and in Humans. Translational imaging offers novel perspectives for original pharmacokinetic studies, that could not be envisioned in humans so far. Thanks to the development of radiopharmaceuticals to measure drug transporters activity and to the optimization of imaging data analysis, it is possible to study their functional impact on drug distribution and elimination at the tissue level in humans.