



HAL
open science

Transport membranaire des médicaments utilisés en transplantation : étude du transporteur MRP4

Joseph Berthier

► **To cite this version:**

Joseph Berthier. Transport membranaire des médicaments utilisés en transplantation : étude du transporteur MRP4. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2020. Français. NNT : 2020LIMO0034 . tel-03160459

HAL Id: tel-03160459

<https://theses.hal.science/tel-03160459v1>

Submitted on 5 Mar 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.



Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

INSERM UMR 1248 IPPRITT

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Pharmacologie, infectiologie et sciences du médicament

Présentée et soutenue par

Joseph BERTHIER

Le 23 octobre 2020

**Transport membranaire des médicaments utilisés en
transplantation : étude du transporteur MRP4**

Thèse co-dirigée par

le Pr Nicolas PICARD et le Pr Franck SAINT-MARCOUX

JURY :

Président du jury

M. Franck SAINT-MARCOUX, PU-PH, Université de Limoges

Rapporteurs

M. Olivier FARDEL, PU-PH, Université de Rennes

Mme Céline VERSTUYFT, PU-PH, Université de Paris

Examineurs

M. Nicolas PICARD, PU-PH, Université de Limoges



À ma famille et mes amis.

La musique donne une âme à nos cœurs et des ailes à la pensée.
Platon

Remerciements

Je tiens à remercier profondément le Professeur Céline VERSTUYFT ainsi que le Professeur Olivier FARDEL de se porter juge de mes travaux de doctorat. Vos connaissances respectives en pharmacologie mais aussi dans les transporteurs membranaires enrichiront sans nul doute ce manuscrit. L'intérêt que vous avez porté à ce travail me touche profondément.

Je remercie particulièrement les Professeurs Nicolas PICARD et Franck SAINT-MARCOUX pour toute l'aide apportée dans l'élaboration de ces travaux, de leur conception jusqu'à leur réalisation. Merci également de vous être investi dans ce travail. Soyez assurés de ma plus profonde reconnaissance et de tout mon respect.

Je tiens sincèrement à remercier le Professeur Pierre MARQUET. J'admire vos brillants enseignements ainsi que vos remarques, toujours pertinentes. Merci encore de m'avoir accueilli toutes ces années dans votre laboratoire ; ce fut pour moi une expérience très enrichissante et inoubliable. Soyez assuré de mon profond respect et de ma gratitude.

Merci à François-Ludovic SAUVAGE pour tous ces moments de galère sur le spectro mais aussi lorsqu'il fallait interpréter les résultats. J'ai beaucoup appris grâce à toi.

Merci à la team *in silico* : Patrick, Benjamin, Gabin, Florent et Mehdi votre implication dans mes travaux m'a profondément touché et j'admire votre efficacité. Grâce à votre aide, vous avez montré qu'il est possible de réaliser des travaux couplant expérimental et théorique.

Merci à Roland pour tes conseils, toujours très utiles. Ton optimisme permanent m'a toujours fasciné tout autant que tes services puissants au tennis. J'espère que tes futurs travaux sur le microbiote auront un fort impact dans la communauté scientifique.

Merci à mes camarades du « bureau 240 » : Hassan, Quentin et Tom pour tout leur soutien dans les moments les plus difficiles et leur aide précieuse. Je vous souhaite plein de réussite dans vos futurs travaux.

Je remercie également Hélène ARNION de m'avoir enseigné la culture cellulaire et surtout la rigueur scientifique même si par moment j'ai pu en manquer.

Je remercie très chaleureusement Naïma TAFZI et Sylvain DULAURENT ainsi que tous les techniciens du laboratoire pour leur disponibilité et leur gentillesse et de m'avoir si souvent dépanné quand j'en avais besoin. Merci pour tous les moments agréables passés ensemble.

Merci à James pour ta bonne humeur et toutes ces discussions intéressantes. Merci à Jean-Sébastien pour tes blagues qui donnent le sourire de bon matin, je me souviens notamment d'une mettant en scène un ours et un chasseur autour d'un certain JP Chenet...

Merci à tous mes co-internes : Maxime alias Macouille, Ali, Damien, Alexandre, Marc, Pauline, Thomas... Grâce à vous, les années d'internat ont été plus fun.

Merci à Bénédicte FRANCK pour ton soutien indéfectible lors de toutes ces années et de toute cette caféine ingérée. Bon courage pour la suite de ta thèse.

Merci à Karen d'avoir corrigé mon anglais pour mes articles.

Merci à tous les membres de ma famille. Vous avez toujours été présents, et me soutenez depuis maintenant 29 ans. Merci à mon père pour cet incroyable don culinaire ; grâce à toi je me porte très bien aujourd'hui, merci de m'avoir fait partager ta passion pour le golf et pour le sport en général.

Merci à ma mère pour sa persévérance à toute épreuve, dans tous les domaines. Je remercie mes deux grand-mères, qui sont de formidables personnes et qui ont toujours eu des histoires fascinantes à nous raconter.

Merci à mon frère et ma belle-sœur de m'avoir donné deux petits neveux adorables. Merci également à mon oncle et ma tante pour votre soutien.

Merci à la famille BARBIER ; vous êtes ma seconde famille. Merci encore pour votre soutien quotidien sans faille.

Merci à tous mes amis de très longue date, du lycée, de la fac et d'ailleurs ! L'aventure n'aurait pas été la même sans vous.

Merci à toi Camille de partager ma vie et de chaque jour faire mon bonheur. Merci de m'avoir (à nouveau) aidé à la correction de ce manuscrit, j'espère pour toi qu'il n'y aura pas de troisième thèse.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Introduction.....	12
Partie I. Transport membranaire des immunosuppresseurs	13
I.1. Deux grandes familles de transporteurs	13
I.1.1. Transporteurs ABC	13
I.1.2. Transporteurs SLC	16
I.2. Rôle des transporteurs	18
I.2.1. Rôle physiologique et communication inter-organes	18
I.2.2. Rôle dans la pharmacocinétique des médicaments	22
I.3. Interactions médicamenteuses impliquant les transporteurs : le cas des immunosuppresseurs	23
I.3.1. Ciclosporine	23
I.3.1.1. Interaction avec les transporteurs OATP.....	24
I.3.1.1.1. Statines.....	24
I.3.1.1.2. Répaglinide.....	24
I.3.1.1.3. Bosentan.....	25
I.3.1.1.4. Irinotécan.....	25
I.3.1.1.5. Inhibiteurs de glucokinase.....	26
I.3.1.1.6. Anti-viraux.....	26
I.3.1.1.7. Aliskiren	27
I.3.1.2. Interaction avec la P-gp	27
I.3.1.2.1. Digoxine.....	27
I.3.1.2.2. Colchicine	28
I.3.1.2.3. Anti-cancéreux.....	29
I.3.1.2.4. Anti-psychotiques	30
I.3.1.2.5. Inhibiteurs calciques.....	31
I.3.1.2.6. Interactions modifiant l'exposition à la ciclosporine.....	31
I.3.1.3. Interaction avec BCRP.....	32
I.3.1.3.1. Topotécan et mitoxantrone	33
I.3.1.3.2. Eltrombopag	33
I.3.1.3.3. Apixaban.....	33
I.3.1.3.4. Acides ginkgoliques.....	34
I.3.2. Tacrolimus.....	34
I.3.2.1. Interaction avec la P-gp	35
I.3.2.1.1. Ranolazine.....	35
I.3.2.1.2. Kétoconazole.....	35
I.3.2.1.3. Rispéridone	35
I.3.2.1.4. Amlodipine	36
I.3.2.1.5. Maribavir	36
I.3.3. Évérolimus	37
I.3.3.1. Interaction avec la P-gp	37
I.3.3.1.1. Lapatinib	37
I.3.3.1.2. Clarithromycine.....	37
I.3.3.1.3. Vérapamil	38
I.3.3.1.4. Anti-tuberculeux.....	38

I.3.3.1.5. Maribavir	39
I.3.3.1.6. Autres anti-cancéreux	40
I.3.4. Sirolimus	40
I.3.4.1. Interaction avec la P-gp	41
I.3.4.1.1. Antifongiques azolés	41
I.3.4.1.2. Ranolazine.....	42
I.3.5. Acide Mycophénolique.....	42
I.4. Synthèse.....	43
I.5. Article 1: Multidrug resistance-associated protein 4 in pharmacology: Overview of its contribution to pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics.....	45
Partie II. Méthodes d'études des transporteurs	57
II.1. Tests basés sur les membranes cellulaires.....	57
II.1.1. Isolation des membranes	58
II.1.2. Mesure de l'activité ATPase	60
II.1.3. Transport vésiculaire	63
II.2. Tests basés sur les cellules	66
II.2.1. Transport direct.....	66
II.2.2. Test d'influx.....	68
II.2.3. Test d'efflux.....	68
II.2.4. Exemples de modèles cellulaires d'étude du transporteur MRP4	69
II.3. Modèles d'études <i>in situ</i> / <i>ex vivo</i>	69
II.4. Modèles d'études <i>in vivo</i>	70
II.4.1. Modèles d'étude <i>in vivo</i> obtenus par inhibition pharmacologique de l'activité des transporteurs	71
II.4.2. Modèles d'étude <i>in vivo</i> chez l'animal présentant des mutations naturelles pour les transporteurs	72
II.4.3. Modèles d'étude <i>in vivo</i> obtenus par suppression de l'expression génique des transporteurs	73
II.4.4. Modèles d'étude <i>in vivo</i> présentant des transporteurs humanisés	74
II.4.4.1. Exemple des OATP.....	75
II.4.4.2. Exemple du transporteur BCRP	76
II.4.5. Limites des modèles animaux	76
II.5. Modèles d'études <i>in silico</i>	77
II.6. Article 2: MRP4 is responsible for the efflux transport of mycophenolic acid β -D glucuronide (MPAG) from hepatocytes to blood.....	79
Partie III. Discussion et perspectives	96
Conclusion.....	100
Références bibliographiques	102

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation phylogénique des transporteurs de la superfamille ABC	15
Figure 2 : Différents modes de fonctionnement des transporteurs SLC	17
Figure 3 : Localisation des différents transporteurs ABC et SLC	18
Figure 4 : Mécanismes d'interactions médicamenteuses sur les transporteurs participant à la pharmacocinétique des médicaments	23
Figure 5 : Orientation des membranes dans une préparation membranaire partiellement purifiée (brute) la plus fréquemment utilisée dans la recherche sur les transporteurs ABC ..	59
Figure 6 : Principe du fonctionnement des tests de mesure de l'activité ATPase	62
Figure 7 : Exemple de type de courbes obtenues lors de test de mesure de l'activité ATPase	63
Figure 8 : Représentation schématique du principe du transport vésiculaire	64
Figure 9 : Schéma du système de culture cellulaire sur système trans-well ®.....	67
Figure 10 : Représentation des voies de transport du MPAG.....	80

Table des tableaux

Tableau 1 : Transporteurs ABC impliqués dans les résistances aux traitements.....	14
Tableau 2 : Principaux substrats endogènes des transporteurs ABC et SLC (liste non exhaustive)	20
Tableau 3 : Récapitulatif des interactions entre les immunosuppresseurs et les transporteurs	43

Liste des Abréviations

ADP : Adénosine diphosphate
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARNm : Acide ribonucléique messager
ATP : Adénosine triphosphate
AUC : Area under the curve (aire sous la courbe des concentrations)
BCRP : Breast cancer resistance protein
BHE : Barrière hémato-encéphalique
BSEP : Bile salt extrusion pump
EGFR : Epidermal growth factor
CMV : Cytomégalovirus
Cmax : Concentration maximale
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
HEK : Human embryonic kidney
IC50 : Concentration inhibitrice médiane
IMPDH : Inosine monophosphate déshydrogénase
Ki : Knockin
KO : Knockout
Km : Constante de Michaelis-Menten
LCR : Liquide céphalo-rachidien
MATE : Multidrug and toxic extrusion
MD : Dynamique moléculaire
MMF : Mycophénolate mofétil
MPA : Acide mycophénolique
MPAG : Acide mycophénolique β -D glucuronide
MRP : Multidrug resistance protein
mTOR : Mammalian target of rapamycin
NEC : Nouvelles entités chimiques
OAT : Organic anion transporter
OCT : Organic cation transporter
OATP : Organic anion transporting polypeptide
PAS : Periodic acid schiff
PG : Prostaglandines
P-gp : P-glycoprotéine
QSAR : Relation structure-activité
SLC : Solute carriers
SNC : Système nerveux central
SNP : Single nucleotide polymorphisms
Tmax : Temps d'atteinte de la concentration maximale
UGT : Uridine diphosphate-glucuronosyltransférase
Vmax : Vitesse maximale

Introduction

Les mécanismes d'absorption, distribution et excrétion des médicaments font généralement intervenir des transporteurs transmembranaires permettant de véhiculer les molécules au travers des différents compartiments de l'organisme. Ils peuvent favoriser l'entrée dans un compartiment (on parle d'influx), ou au contraire favoriser la sortie vers un autre compartiment (on parle alors d'efflux).

Ces transporteurs sont considérés comme des déterminants clés de l'accumulation des médicaments dans les cellules. Ainsi, l'activité de ces transporteurs peut potentiellement influencer l'efficacité thérapeutique et/ou la toxicité des médicaments, et être impliquée dans des interactions médicamenteuses. Ces transporteurs de médicaments sont rattachés à deux superfamilles : les transporteurs SLC (Solute Carrier) et les ABC (ATP binding cassette).

Les patients transplantés reçoivent des traitements immunosuppresseurs pour prévenir le rejet de greffe, mais également des traitements visant à prendre en charge d'éventuelles comorbidités comme le diabète, l'insuffisance cardiaque et les infections. Dans ce contexte, certaines interactions médicamenteuses sont connues, voire attendues, et bien caractérisées sur le plan mécanistique. Si les interactions impliquant les enzymes du métabolisme sont explorées et recensées depuis longtemps, il n'en est pas de même pour celles qui impliquent les transporteurs et au sujet desquelles on ne dispose actuellement que d'informations limitées. Cela s'explique en partie par le fait que la plupart des substrats des transporteurs sont également souvent des substrats d'enzymes du métabolisme et qu'il n'est pas facile de faire la part des choses *in vivo*.

Dans cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux interactions médicamenteuses impliquant les transporteurs et susceptibles d'entraîner une modification substantielle des processus d'absorption, distribution et élimination des médicaments pouvant conduire à l'apparition de toxicités, notamment chez les patients transplantés.

Une première partie sera consacrée à la description des interactions médicamenteuses des immunosuppresseurs impliquant les transporteurs membranaires.

Dans une seconde partie, nous nous intéresserons aux différentes méthodes expérimentales d'étude du transport membranaire. Nous présenterons une analyse de la littérature concernant spécifiquement le transporteur d'efflux MRP4 (**article 1**), ainsi que des travaux expérimentaux sur son interaction avec l'acide mycophénolique β -D glucuronide (**article 2**).

Partie I. Transport membranaire des immunosuppresseurs

I.1. Deux grandes familles de transporteurs

I.1.1. Transporteurs ABC

Les transporteurs ABC se lient à l'adénosine triphosphate (ATP) et l'hydrolysent pour produire l'énergie permettant le transport de diverses molécules à travers la membrane plasmique mais aussi à travers les membranes intra-cellulaires du réticulum endoplasmique, du peroxysome et de la mitochondrie. Ces molécules peuvent être des sucres, des acides aminés, des ions métalliques, des peptides, des protéines, des composés hydrophobes et leurs métabolites. A titre d'exemple, la P-glycoprotéine humaine (P-gp) a été décrite et identifiée pour la première fois comme la cause de la résistance aux médicaments cytotoxiques par Juliano et Ling en 1976 [1]. Par la suite, une série de transporteurs ABC ont été identifiés [2].

À ce jour, 49 sous-types de transporteurs ABC, ont été recensés chez l'Homme. Ils sont divisés en 7 sous-familles (de ABCA à ABCG) sur la base de leur structure génétique, de leur séquence en acides aminés, de l'organisation des domaines et de l'analyse phylogénétique [2] (**Figure 1**). Les transporteurs ABC identifiés chez l'Homme sont principalement situés au niveau de la membrane plasmique, où ils transportent une multitude de médicaments, de conjugués de médicaments et de métabolites d'autres natures hors des cellules (efflux). Parmi eux, au moins 11 transporteurs de la superfamille ABC, dont la P-gp (ABCB1), les transporteurs de la famille MRP (Multidrug Resistance Associated Proteins) (MRP/ABCC) et la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP/ ABCG2), sont impliqués dans le développement des phénomènes de résistance aux médicaments [3,4] (**Tableau 1**).

Ces transporteurs ABC sont également exprimés dans divers tissus tels que le foie, l'intestin, les reins et le cerveau, et jouent donc un rôle important dans l'absorption, la distribution et l'excrétion des médicaments.

Tableau 1 : Transporteurs ABC impliqués dans les résistances aux traitements

Protéine	Nom du gène	Nom alternatif	Taille (AA)	Localisation (Apical/baso-latéral)
MDR1 (P-gp)	<i>ABCB1</i>	PGY1, GP170	1280	Apical
MDR2	<i>ABCB4</i>	PGY3, MDR3	1279	Apical
BSEP	<i>ABCB11</i>	/	1321	Apical
MRP1	<i>ABCC1</i>	MRP	1531	Baso-latéral
MRP2	<i>ABCC2</i>	cMOAT, CMRP	1545	Apical
MRP3	<i>ABCC3</i>	MOAT-D, MOAT-2	1527	Baso-latéral
MRP4	<i>ABCC4</i>	MOAT-B	1325	Baso-latéral, Apical
MRP5	<i>ABCC5</i>	MOAT-C, pABC11	1437	Baso-latéral, Apical
MRP6	<i>ABCC6</i>	/	1503	Apical
MRP7	<i>ABCC10</i>	/	1492	Apical ?
MRP8	<i>ABCC11</i>	/	1382	Apical
MRP9	<i>ABCC12</i>	/	1356	?
BCRP	<i>ABCG2</i>	MXR, ABCP	655	Apical

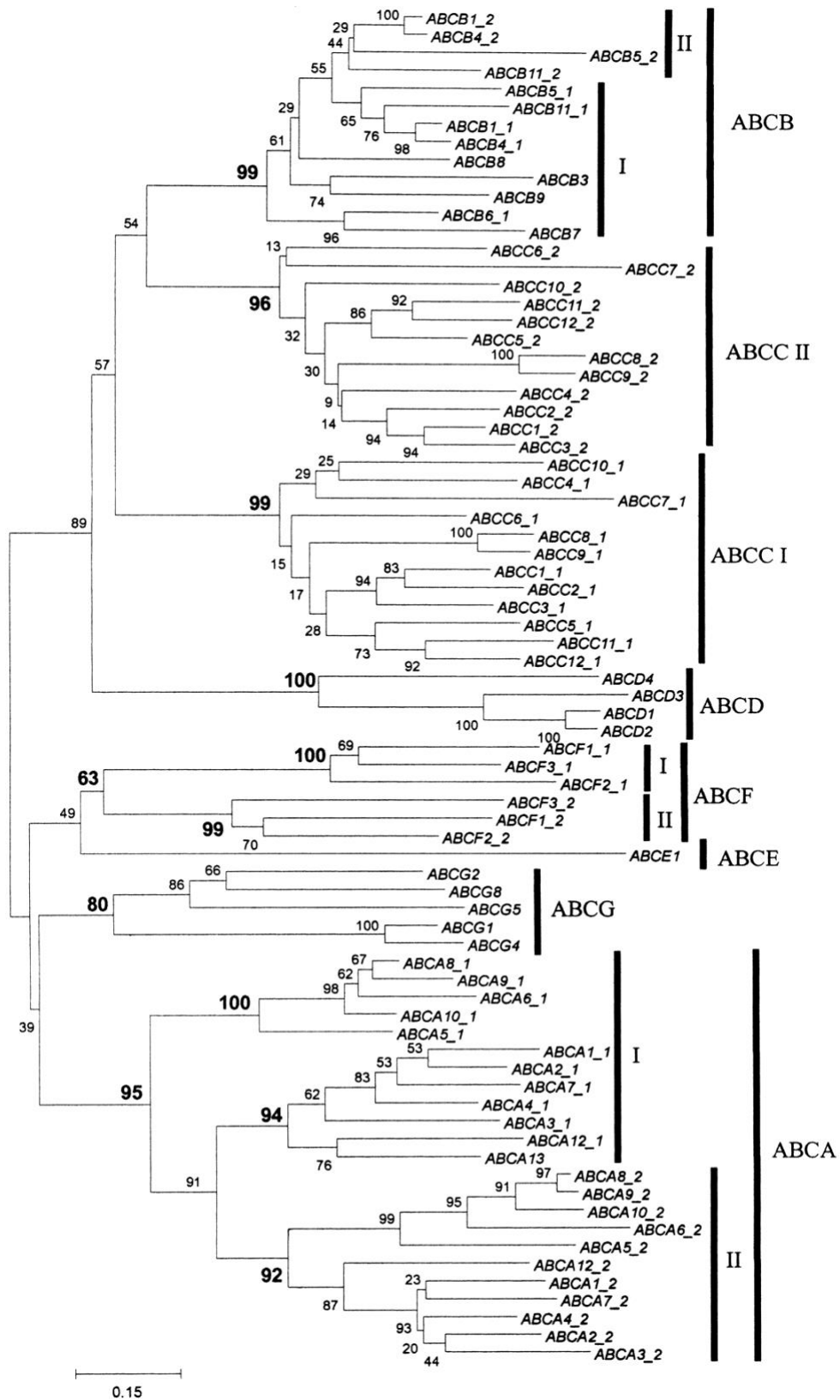


Figure 1 : Représentation phylogénique des transporteurs de la superfamille ABC

Source : Dean *et al* 2001 [2]

I.1.2. Transporteurs SLC

Chez l'Homme, plus de 300 transporteurs SLC ont été identifiés. Ils transportent à la fois des substances endogènes et exogènes. Ils comprennent principalement les transporteurs :

- OATPs/SLCO (organic anion-transporting polypeptides),
- OATs/SLC22As (organic anion-transporters),
- OCTs/SLC22As (organic cation-transporters),
- OCTNs/SLC22As (organic cation and carnitine transporters),
- PEPTs/SLC15As (peptide transporters),
- et MATEs/SLC47As (multidrug and toxin extrusions).

En général, les OCT transportent des cations organiques, les OATP transportent des anions organiques de grande taille et assez hydrophiles, les OAT transportent les anions organiques plus petits et plus hydrophiles, et les PEPT sont responsables de l'absorption de peptides et de médicaments de type peptidique. La plupart des transporteurs SLC ont une fonction d'influx, c'est-à-dire qu'ils assurent le passage de leurs substrats du milieu extra-cellulaire vers le milieu intra-cellulaire. Ce passage s'effectue soit par co-transport, selon un gradient de concentration ne nécessitant pas d'apport d'énergie, soit par transport secondairement actif, c'est-à-dire qu'ils transportent leurs substrats à travers la membrane contre un gradient en couplant le transport d'un autre substrat (**Figure 2**).

Bien que les MATEs appartiennent à la famille des SLC (génétiquement parlant), ils agissent comme des transporteurs d'efflux ou d'influx en fonction du pH. En effet, la direction du transport de MATE1 est définie par le gradient de concentration en protons : in vitro à un pH supérieur ou égal à 7,4, MATE1 se comporte comme un transporteur d'influx. A contrario, dans le tubule proximal (in vivo), il permet l'échange des cations intracellulaires contre des protons urinaires, assurant ainsi une fonction d'efflux de ses substrats.

Ces transporteurs SLC sont largement exprimés dans divers tissus, tels que l'intestin, le foie, les reins et le cerveau (**Figure 3**). Ils jouent ainsi des rôles clés pour la distribution des médicaments dans ces tissus en participant aux effets thérapeutiques ou à la toxicité [5,6].

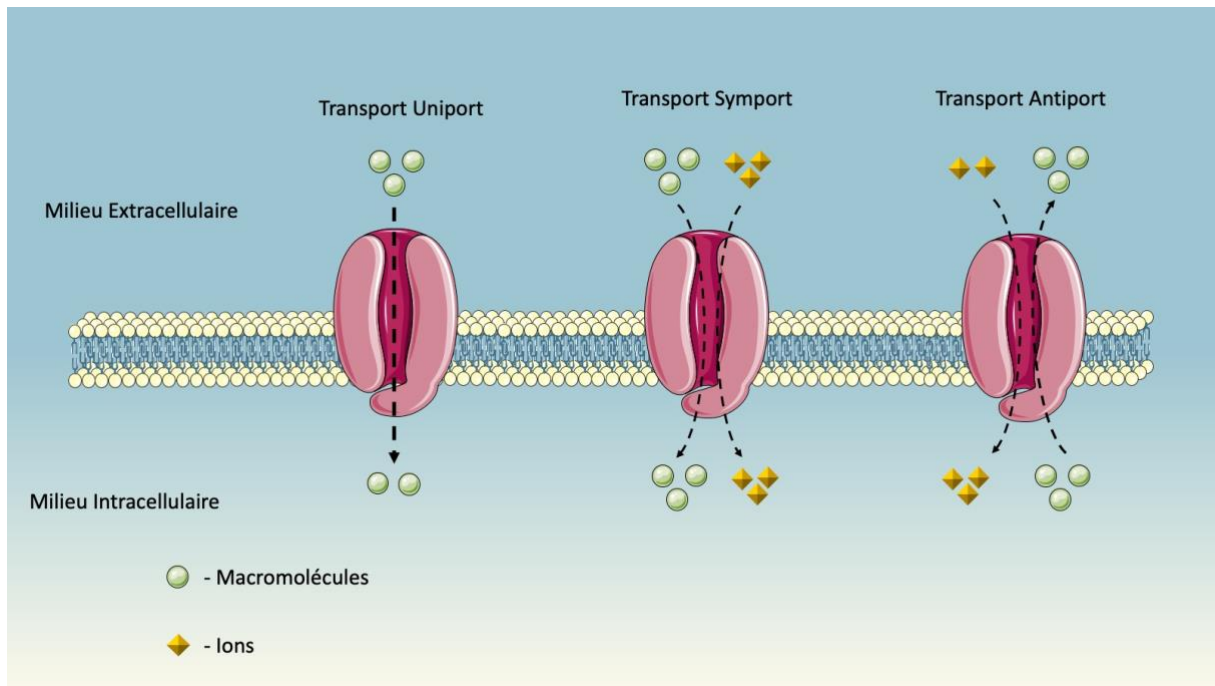


Figure 2 : Différents modes de fonctionnement des transporteurs SLC

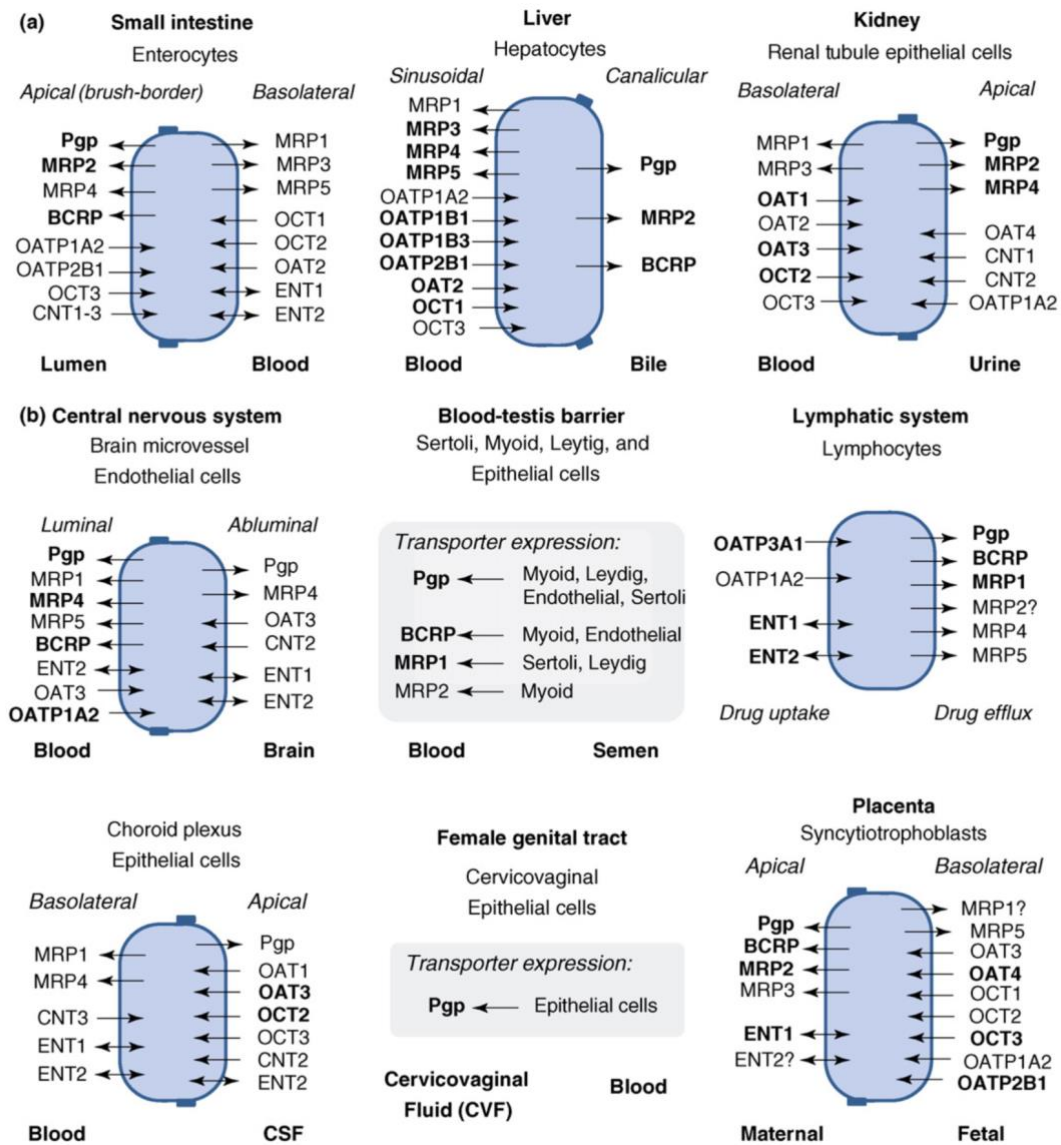


Figure 3 : Localisation des différents transporteurs ABC et SLC

Source : Kis *et al* 2010 [7]

I.2. Rôle des transporteurs

I.2.1. Rôle physiologique et communication inter-organes

Les transporteurs SLC et ABC, lorsqu'ils sont exprimés au niveau des barrières épithéliales, coordonnent le mouvement trans-épithélial d'une grande variété de substrats dont des nutriments, des toxines, des molécules de signalisation, des neurotransmetteurs et des xénobiotiques. De nombreux substrats sont des molécules de signalisation bien connues, tels que les nucléotides cycliques (AMPc et GMPc), les prostaglandines et les stéroïdes conjugués (**Tableau 2**). Ainsi, la répartition caractéristique de ces transporteurs dans les divers organes et les spécificités relatives de leurs substrats permettent à ces transporteurs de participer à un

vaste réseau de communication entre les organes/tissus en véhiculant ces molécules dites de signalisation.

La théorie du « remote sensing and signaling » proposée par Sanjay K. Nigam [8] explique comment les transporteurs travaillent de façon coordonnée à établir une communication à distance entre les tissus et les différents organes, contrôlant ainsi les flux des molécules de signalisation.

Plus précisément, des molécules synthétisées dans un organe peuvent être sécrétées via des transporteurs dans la circulation, où elles peuvent ensuite être absorbées dans les organes cibles via d'autres transporteurs et exercer leurs fonctions physiologiques. Ces molécules sont également acheminées dans les cellules rénales et éliminées de l'organisme par l'urine. Cela signifie d'une part, que les transporteurs rénaux maintiennent principalement l'homéostasie des substrats au niveau de l'organisme (en participant à leur élimination ou leur réabsorption) et d'autre part, que les transporteurs lorsqu'ils sont situés dans les organes cibles (à distance des lieux de synthèse) participent au maintien local de l'homéostasie des substrats.

L'exemple du transport des prostaglandines (PG) montre bien les différents rôles des différentes familles de transporteurs. Les PG sont produites dans la plupart des organes et tissus. Elles sont considérées comme des hormones agissant de manière paracrine ou autocrine (locale). Cependant, elles peuvent également être excrétées dans la circulation, permettant cette communication/action à distance. Ainsi, il est clairement établi que les transporteurs, en particulier le transporteur MRP4, est responsable de l'efflux (libération) de nombreuses PG [9]. D'autres transporteurs ABC tels que ABCA1 et MRP2 [10,11] peuvent également jouer un rôle dans la libération des PG cellulaires. D'autre part, plusieurs transporteurs SLC sont impliqués dans l'absorption cellulaire (influx) de certaines PG [9].

Le transporteur OATP2A1 était le premier identifié dans le transport des PG. D'autres transporteurs SLC, dont OAT3, ont été par la suite identifiés comme transporteur des PG [12]. Leur distribution tissulaire est corrélée au fait que les PG peuvent être localement transportées dans le but maintenir de faibles niveaux en circulation. Par exemple, à l'état basal, la PGE2 circulante est très faible [13], mais en cas de stimulation par des cytokines ou de fièvre, le niveau de PGE2 circulant peut être multiplié par quatre.

De fortes concentrations de PGE2 ont également été observées dans le liquide céphalorachidien, probablement dû à l'entrée de PGE2 à partir de la circulation périphérique [14].

Au niveau cérébral, la PGE2 et la PGD2 sont impliquées dans de multiples processus physiopathologiques, notamment la plasticité synaptique, la neuro-inflammation, la fièvre et le

sommeil. Ainsi, les concentrations de PGE2 et de PGD2 dans le cerveau et le liquide céphalorachidien (LCR) sont maintenues à des niveaux physiologiques pour un fonctionnement cérébral normal principalement grâce aux transporteurs d'influx/efflux présents au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et à la barrière sang-liquide céphalorachidien, notamment OAT3 et MRP4 [15–18]. D'autre part, il a été montré que certains lipopolysaccharides diminuent l'expression de OAT3 et donc l'élimination de la PGE2 à travers la BHE, ce qui conduit à une augmentation des niveaux de PGE2 dans le cerveau [19]. Il est intéressant de constater que des céphalosporines (céfazoline et céftriaxone) inhibent l'efflux de PGE2 par MRP4 dans le LCR, entraînant également une augmentation du niveau de PGE2 dans le cerveau [15,17,18]. Ceci semble expliquer des observations cliniques selon lesquelles certains antibiotiques de la famille des β -lactamines induisent une fièvre [20–22].

Enfin, un transporteur spécifique des PG au niveau du rein (OAT-PG) a été identifié [23]. Ce transporteur appartient à la famille des OAT et reconnaît les PG (tels que PGH2, PGB2, PGD2, PGE1, PGE2, PGF1 α , et PGF2 α). L'OAT-PG est situé sur la membrane baso-latérale des tubules proximaux et assure le transport de PGE2 dans les cellules tubulaires proximales, où elle peut être rapidement métabolisée en composé inactif, le 15-céto-PGE2 [23]. Ce transporteur participe donc à l'élimination de la PGE2 depuis la circulation.

Tableau 2: Principaux substrats endogènes des transporteurs ABC et SLC (liste non exhaustive)

Transporteurs	Localisations tissulaires	Substrats physiologiques
Transporteurs de la famille ABC		
MRP1	Poumons, testicules, rein, muscle squelettique, cœur, placenta	Glutathion (conjugué, réduit), LTC4, estradiol-17- β -glucuronide, bilirubine
MRP2	Foie, rein, intestin, placenta	Glutathion (conjugué, réduit), LTC4, conjugués de la bilirubine, LTD4, LTE4
MRP3	Foie, rein, intestin, glandes surrénales	LTC4, estradiol-17- β -glucuronide, cholate, glycocholate, taurocholate
MRP4	Foie, rein, intestin, SNC, plaquettes	cGMP, cAMP, dehydroepiandrosterone-3-sulphate, estradiol-17- β -glucuronide, PG _{E1} , PG _{E2} , LTC4, TXB2
MRP5	Placenta, SNC, cœur	cGMP, cAMP

Transporteurs de la famille SLC

OATP1A2	SNC, foie, rein	Bilirubine, estradiol-17- β -glucuronide, estrone-3-sulphate, PG _{E2} , taurocholate, thyroxine (T4)
OATP1B1	Foie	Bilirubine, cholate, dehydroepiandrosterone-3-sulphate, estradiol-17- β -glucuronide, estrone-3-sulphate, LTC ₄ , LTE ₄ , PG _{E2} , TXB ₂ , thyroxine (T4), triiodothyronine (T3)
OATP1B3	Foie	Bilirubine, cholate, estradiol-17- β -glucuronide, estrone-3-sulphate, glutathion, LTC ₄ , taurocholate, thyroxine (T4), triiodothyronine (T3)
OATP1C1	SNC, testicules	Estradiol-17- β -glucuronide, estrone-3-sulphate, thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), triiodothyronine reverse (T3r), Thyroxine sulfate (T4S)
OATP2A1	SNC, intestins, cœur, rein	PG _{H2} , PG _{E1} , PG _{E2} , PGF _{2α} , TXB ₂
OATP2B1	Foie, intestins, placenta, épiderme, cœur, muscle squelettique, SNC	Dehydroepiandrosterone-3-sulphate, estrone-3-sulphate, pregnenolone sulphate, PG _{E2} , Taurocholate, thyroxine (T4),
OATP3A1	Testicules, SNC, cœur, poumons, rate	PG _{E1} , PG _{E2} , thyroxine (T4),
OATP4A1	Cœur, placenta, poumons, foie, muscle squelettique, rein, pancréas	Estradiol-17- β -glucuronide, estrone-3-sulphate, thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), triiodothyronine reverse (T3r), PG _{E2} , taurocholate
OATP4C1	Foie	cAMP, estrone-3-sulphate, thyroxine (T4), triiodothyronine (T3)
OAT1	Rein, SNC, estomac, foie, pancréas	P-amino-hippurate, PG _{E2} , α -ketoglutarate
OAT2	Foie, rein	P-amino-hippurate, PG _{E2} , α -ketoglutarate, estrone-3-sulphate, cGMP, acide succinique, dehydroepiandrosterone-3-sulphate,
OAT3	Rein, SNC, muscle squelettique, foie, glandes surrénales	P-amino-hippurate, PG _{E2} , estrone-3-sulphate, acides biliaires
OAT4	Rein, placenta, glandes surrénales	P-amino-hippurate, urate, PG _{E2} , estrone-3-sulphate, acides biliaires

OCT 1	Foie, intestins, poumon, reins	
OCT 2	Reins, intestins, poumons	Créatinine, corticostérone, PG_{E2} , Choline, testostérone,
OCT 3	Rein, SNC, intestins, placenta, foie, glandes surrénales, cœur	Estrone-3-sulphate, L-carnitine, Catécholamines
MATE1	Foie, rein, muscle squelettique, glandes surrénales, testicules	
MATE2-K	Rein	

I.2.2. Rôle dans la pharmacocinétique des médicaments

Les transporteurs membranaires d'influx et d'efflux, en plus de participer à l'homéostasie des substances endogènes, jouent un rôle majeur dans la pharmacocinétique des médicaments.

Par exemple, la P-glycoprotéine (P-gp), présente au niveau intestinal, va s'opposer à l'absorption de nombreux médicaments. En cas d'interaction médicamenteuse conduisant à son inhibition, les médicaments pourront être ainsi mieux absorbés. Cela aura généralement pour conséquence une augmentation des concentrations plasmatiques et de l'exposition, donnant lieu dans certains cas à une augmentation des effets thérapeutiques ou à une toxicité (**Figure 4a**). Au contraire, une induction de l'expression de la P-gp entraînera une diminution des effets thérapeutiques.

La P-gp est également présente au niveau de la barrière hémato-encéphalique, où elle limite l'accès de certains médicaments au cerveau.

Au niveau du foie, les transporteurs d'influx tels que les transporteurs OATP et OCT favorisent l'entrée de xénobiotiques en vue de leur métabolisation ou de leur élimination. Lors de l'inhibition de ces transporteurs, on assiste également à une augmentation des concentrations plasmatiques des médicaments normalement substrats (**Figure 4b**).

Enfin, les cellules tubulaires proximales du rein sont un lieu de sécrétion de composés du sang vers l'urine et donc un élément clé de l'élimination. Ces cellules ont la particularité d'être polarisées avec un pôle basal (créant une interface sang-cellule) et un pôle apical (créant une interface cellule-urine primitive). Au niveau basal et apical, de nombreux transporteurs d'influx et d'efflux sont présents, et ce double système permet l'élimination des déchets de l'organisme mais aussi des xénobiotiques. Son inhibition peut avoir des conséquences diverses (**Figure 4c**).

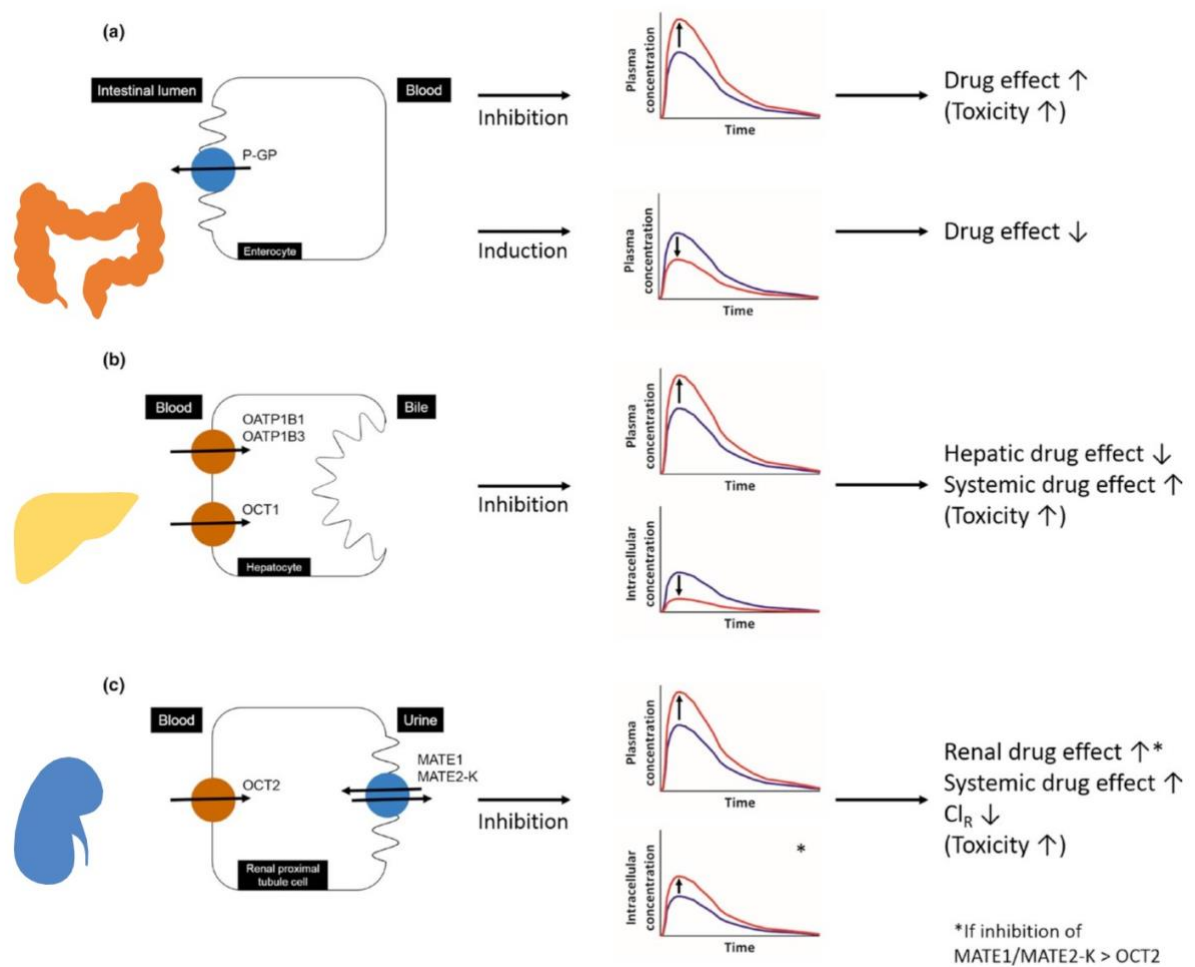


Figure 4 : Mécanismes d'interactions médicamenteuses sur les transporteurs participant à la pharmacocinétique des médicaments

Source : Gessner *et al* 2019 [24]

I.3. Interactions médicamenteuses impliquant les transporteurs : le cas des immunosuppresseurs

I.3.1. Ciclosporine

La ciclosporine est un médicament immunosuppresseur utilisé dans la prévention et le traitement du rejet de la greffe, ainsi que pour le traitement de certaines maladies auto-immunes.

La ciclosporine est fortement métabolisée dans le foie par les cytochromes P450 3A et interagit aussi avec plusieurs transporteurs d'influx et d'efflux tels que les OATP et la P-gp.

Elle est responsable de nombreuses interactions médicamenteuses complexes mêlant parfois inhibition ou induction des transporteurs mais aussi des enzymes du métabolisme. Il est d'ailleurs souvent difficile de déterminer quel type d'interaction présente un impact clinique significatif.

I.3.1.1. Interaction avec les transporteurs OATP

I.3.1.1.1. Statines

En inhibant le transporteur OATP1B1, la ciclosporine augmente significativement les concentrations plasmatiques de plusieurs médicaments de la classe des statines (hypolipémiants). Ainsi, la ciclosporine peut multiplier les AUC (aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps) par un facteur de 7 à 15 environ pour l'atorvastatine [25–27], de 4 pour la cérivastatine [28], de 3 à 4 pour la fluvastatine [29], de 20 pour la lovastatine [30], de 5 à 10 pour la pravastatine [31,32], de 7 pour la rosuvastatine [33] et de 3 à 8 pour la simvastatine [34,35].

L'inhibition du CYP3A4 peut expliquer en partie les effets observés de la ciclosporine sur la simvastatine, la lovastatine, l'atorvastatine et la cérivastatine mais il est intéressant de constater que les autres statines (rosuvastatine, pravastatine et pitavastatine), ne sont pas métabolisées par le CYP3A4 [36].

I.3.1.1.2. Répaglinide

Le répaglinide (antidiabétique insulino-sécréteur) est un substrat de l'OATP1B1, non métabolisé par les CYP3A entrant en interaction avec la ciclosporine. Les polymorphismes génétiques du gène codant pour ce transporteur (*SLCO1B1*) peuvent expliquer une grande partie de la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique du répaglinide et avoir un impact clinique important.

En effet, chez des sujets porteurs homozygotes de l'allèle *SLCO1B1* c.521CC, l'AUC du répaglinide était supérieure, à celle des sujets hétérozygotes *SLCO1B1* c.521TC ou c.521TT (non mutés) de 107 % et 188 %, respectivement [37].

Il a été par la suite montré que la ciclosporine pouvait inhiber le transport du répaglinide par l'OATP1B1. En effet, une étude chez des volontaires sains rapporte que l'administration de 100 mg de ciclosporine durant 2 jours précédant l'administration de répaglinide a pour conséquence de multiplier par 2,4 environ l'AUC du répaglinide [38]. Dans cette étude, il est intéressant de constater que l'augmentation de l'AUC du répaglinide (par la ciclosporine) était moins marquée (42 % plus faible) chez les patients porteurs du polymorphisme *SLCO1B1* c.521TC par rapport aux patients ayant le génotype de référence c.521TT, montrant ainsi le rôle de l'OATP1B1 dans cette interaction [38].

1.3.1.1.3. Bosentan

Le bosentan (antagoniste des récepteurs à l'endothéline) est un médicament utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire. Il est métabolisé par les CYP3A4 et 2C9 en un métabolite actif, le Ro 48-5033. Une étude clinique a montré que l'AUC du bosentan pouvait être doublée après 7 jours de traitement par la ciclosporine [39]. Cette interaction pouvait également être due à l'inhibition du CYP3A4 par la ciclosporine car en effet, l'administration chez des volontaires sains de bosentan avec du kétoconazole (puissant inhibiteur enzymatique du CYP3A4) montre une augmentation de la concentration maximale (C_{max}) et de l'AUC du bosentan (2,1 et 2,3 fois respectivement) [40]. De plus, chez le rat, suite à l'administration de ciclosporine, la C_{max} et l'AUC du bosentan étaient 4,4 et 17 fois plus élevées par rapport au bosentan administré seul [41].

Cependant, Il a été montré *in vitro* à l'aide de cellules surexprimant OATP1B1 et OATP1B3 que la ciclosporine pouvait fortement inhiber le transport du bosentan [42].

D'ailleurs, le résumé des caractéristiques du produit fait état d'une contre-indication entre la ciclosporine et le bosentan : « *Les études réalisées avec cette association ont révélé des taux plasmatiques résiduels du bosentan environ 30 fois supérieurs à ceux mesurés après administration du bosentan seul. A l'état d'équilibre, ces taux étaient 3 à 4 fois supérieurs à ceux mesurés avec le bosentan administré seul. Cette interaction s'explique très probablement par une inhibition des protéines de transport du bosentan dans les hépatocytes par la ciclosporine. Les concentrations plasmatiques de ciclosporine A (un substrat du CYP3A4) étaient diminuées d'environ 50 %. Cette observation est très probablement liée à l'effet inducteur du bosentan sur le CYP3A4* »

1.3.1.1.4. Irinotécan

L'irinotécan est un anti-cancéreux (inhibiteur de topoisomérase I) dont le métabolite actif le SN-38 est généré par une carboxylestérase puis transformé en métabolite glucuro-conjugué inactif par les UGT1A1 et 1A7 [43]. Une étude *in vitro* montre que l'irinotécan est substrat d'OATP1B1 [44]. De plus, une étude pharmacogénétique menée chez des patients asiatiques a révélé que la clairance plasmatique de l'irinotécan était 3 fois plus faible chez les patients porteurs de l'haplotype *SLCO1B1* *15 que chez les patients ayant le génotype de référence *1a/*1a [45]. D'autre part une étude de phase I chez des patients recevant de l'irinotécan et de la ciclosporine montrée que l'AUC du SN-38 était augmentée de 23 % à 630 %, alors que la clairance plasmatique d'élimination de l'irinotécan était diminuée de 39 % à 64 % [46].

Il est à noter que ces résultats étaient comparés à des données antérieures de traitement par l'irinotécan administré seul avec les mêmes doses et non sur les mêmes

patients. Une autre étude clinique menée chez des patients atteints de cancer du côlon métastatique réfractaire au 5-fluorouracile a montré que la clairance de l'irinotécan était 2,3 fois plus faible, et que l'AUC_{0-24 h} était 2,2 fois plus élevée en cas de co-administration de ciclosporine (5mg/kg) par voie orale deux fois par jour. Des augmentations similaires de l'AUC ont été observées pour le SN-38 [47].

1.3.1.1.5. Inhibiteurs de glucokinase

La glucokinase est une enzyme permettant la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate dans le pancréas, le foie, l'intestin et le cerveau et joue donc un rôle clé dans la synthèse du glycogène et la régulation de la production hépatique de glucose [48].

Un nouvel inhibiteur de glucokinase, le PF-04991532, a été spécialement conçu par le groupe Pfizer dans le but d'obtenir une sélectivité envers les OATP hépatiques et donc de minimiser ses effets hypoglycémisants systémiques. Leurs études indiquent qu'une dose unique de 600 mg de ciclosporine a multiplié par trois environ l'AUC du PF-04991532 chez les sujets sains [49].

1.3.1.1.6. Anti-viraux

Le simeprevir est un inhibiteur de la protéase NS3/4A utilisé dans le traitement de l'hépatite C. Le simeprevir est métabolisé par les cytochromes P450 (principalement le CYP3A4) et il est également un substrat et un inhibiteur des transporteurs P-gp, BCRP et OATP1B1/3 [50].

Une étude de phase IIa a été menée chez des patients présentant une infection récurrente par le génotype 1b du VHC à la suite d'une transplantation hépatique orthotopique et recevant de la ciclosporine (ou du tacrolimus) et du simeprevir. Dans cette étude, il a été observé des augmentations d'un facteur 5 à 6 pour les C_{max} et les AUC du simeprevir chez les sujets qui recevaient de la ciclosporine [50].

Une autre étude de phase I portant sur un nouvel inhibiteur de protéase NS3/4A, le danoprevir, montre également une interaction avec la ciclosporine en lien avec les OATP [51]. Il s'agissait d'une étude ouverte, randomisée, en trois étapes, menée sur des volontaires sains. Au cours de la première étape, les sujets ont été randomisés et recevaient soit une dose orale unique de 100 mg de danoprevir (en combinaison avec 100 mg de ritonavir), soit une dose orale unique de 100 mg de ciclosporine. Après une période de washout de 14 jours, les patients recevaient le traitement inverse (2^{ème} étape). Après une seconde période de washout de 14 jours (3^{ème} étape), tous les sujets recevaient l'association danoprevir/ritonavir et ciclosporine. Les résultats de cette étude ont montré une augmentation significative de l'exposition au danoprevir lorsque la ciclosporine était co-administrée.

1.3.1.1.7. Aliskiren

L'interaction observée entre l'aliskiren (antihypertenseur inhibant la production de rénine désormais retiré du marché français) et ciclosporine est un bon exemple d'inhibition multiple. L'aliskiren est substrat de la P-gp et d'OATP2B1 [52]. D'autre part, des études d'interactions avec des inhibiteurs du CYP3A4 et de P-gp tels que le kétoconazole, le vérapamil et l'itraconazole ont montré de fortes augmentations de l'exposition à l'aliskiren [53].

Ainsi, il a été observé dans une étude de phase I associant l'aliskiren et la ciclosporine que l'AUC et la C_{max} de l'aliskiren étaient augmentées de 4,28 et 2,49 fois respectivement pour une dose de ciclosporine de 200 mg, et de 4,99 et 2,48 fois respectivement pour une dose de 600 mg [54].

Bien que l'inhibition par ciclosporine du CYP3A4 et des transporteurs autres que l'OATP1B1 puisse expliquer certaines interactions médicamenteuses, ces exemples montrent qu'il est fort probable que l'inhibition de l'OATP1B1 par la ciclosporine contribue également aux interactions médicamenteuses observées cliniquement pour les substrats OATP1B1.

1.3.1.2. Interaction avec la P-gp

La ciclosporine est aussi un puissant inhibiteur et un substrat de la P-gp. La ciclosporine peut donc être sujette aux interactions concernant la P-gp.

1.3.1.2.1. Digoxine

Il s'agit de l'un des premiers médicaments à marge thérapeutique étroite identifiés comme substrat de la P-gp [55].

En effet, en l'absence de P-gp, des souris ont montré une très forte accumulation de digoxine et de ciclosporine dans leur cerveau [56].

Chez l'Homme, de graves toxicités aux digitaliques ont été rapportées après le début de traitement à la ciclosporine chez des individus qui attendaient une transplantation cardiaque et recevaient un traitement concomitant à la digoxine [57]. Afin d'explorer le mécanisme de cette interaction, Robieux *et al.* [58] ont étudié la pharmacocinétique de la digoxine chez sept patients en attente d'une transplantation cardiaque et un mois après une intervention chirurgicale, poursuivant un traitement au long court par la ciclosporine. Les résultats de cette étude ont montré que le volume de distribution apparent de la digoxine a été augmenté chez tous les patients après la transplantation, entraînant un prolongement de la demi-vie terminale calculée de la digoxine. Néanmoins, sa clairance totale n'a pas été modifiée. Ces résultats sont, à première vue, contradictoires avec ceux que ces mêmes auteurs avaient précédemment rapportés chez des patients en attente de transplantation [57]. Ils avaient en effet observé une diminution spectaculaire de la clairance de la digoxine lorsque la ciclosporine

était administrée avant la transplantation. Chez les patients dont les fonctions cardiaques et rénales étaient compromises, l'accumulation et la toxicité de la digoxine étaient proportionnelles à la réduction supplémentaire de la fonction rénale induite par la ciclosporine.

On peut toutefois se demander si dans cette situation, la ciclosporine ne réduirait pas l'élimination rénale de digoxine, en affectant le débit de filtration glomérulaire (par effet vasoconstricteur rénal). Inversement, dans l'étude plus récente, les améliorations de l'hémodynamique et de la filtration glomérulaire survenues après la transplantation cardiaque pourraient avoir contrebalancé tout effet inhibiteur de la ciclosporine sur l'élimination rénale de la digoxine. Néanmoins, dans cette étude, les auteurs n'avaient pas pris en compte la voie d'administration. En effet, la digoxine et la ciclosporine étaient administrées par voie intraveineuse. Ainsi, l'inhibition potentielle de la P-gp intestinale (pouvant majorer la biodisponibilité de la digoxine) par la ciclosporine lors d'une administration par voie orale n'a pas pu être observée. C'est d'ailleurs le cas pour l'interaction digoxine-talinolol, où l'inhibition de la P-gp intestinale par le talinolol induit une augmentation significative des concentrations plasmatiques de digoxine administrée par voie orale. Cependant, il n'y a pas d'effet observé sur les concentrations plasmatiques de digoxine lorsqu'elle est administrée par voie intraveineuse [59]. D'autre part, une étude *in vitro* sur des cellules épithéliales rénales surexprimant la P-gp [60] indique que la ciclosporine inhibe le transport trans-épithélial de la digoxine médié par la P-gp.

En conclusion, cet exemple illustre la difficulté à imputer un transporteur dans des interactions de ce type, qui peuvent faire intervenir des facteurs physiopathologiques ou pharmacocinétiques propres à la situation.

1.3.1.2.2. Colchicine

La colchicine est un médicament à marge thérapeutique étroite. Elle est aussi substrat de la P-gp [61] et des CYP3A [62]. Dans un essai de phase I, il a été constaté que la co-administration de ciclosporine (100 mg) était associée à une augmentation de la C_{max} et de l'AUC moyenne de la colchicine de 224 % et 215 %, respectivement [63]. Des cas ont également rapporté que des patients transplantés, traités par ciclosporine et colchicine, ont développé une rhabdomyolyse associée des défaillances d'organes multiples [64,65]. Une étude clinique s'est intéressée à la pharmacocinétique de la colchicine en association avec des inhibiteurs connus du CYP3A4 et de la P-gp (ciclosporine, kétoconazole, ritonavir, clarithromycine, azithromycine, vérapamil et diltiazem) dans le but de développer des algorithmes d'initiation de dose de la colchicine sans effets indésirables [66].

Concernant l'administration de ciclosporine, les résultats de cette étude ont montré une augmentation de l'exposition et de la demi-vie de la colchicine, lorsqu'elle était co-administrée

avec la ciclosporine. Lorsque la ciclosporine était co-administrée, la C_{max} moyenne de la colchicine a été augmentée de 270 %, et la valeur moyenne de l'AUC de 260 % environ. La clairance apparente totale a diminué de 72 % lorsque la colchicine était co-administrée avec la ciclosporine (13,4 litres/heure vs 48,2 litres/heure). Ainsi, les auteurs recommandent une réduction de la dose de colchicine de 33 à 66 % pour le traitement de la crise de goutte aiguë et de 50 à 75 % pour la prophylaxie en cas de traitement concomitant avec chaque médicament inhibiteur [66].

1.3.1.2.3. Anti-cancéreux

Les échecs aux traitements sont en partie expliqués par une surexpression de la P-gp pour certains anti-cancéreux [67,68]. La ciclosporine inhibe *in vitro* et *in vivo* le transport par la P-gp de l'étoposide, la vinblastine et la doxorubicine.

Il a été montré chez des souris que l'étoposide est substrat de la P-gp, de MRP2 et de MRP3 [69]. De plus l'administration intra-veineuse d'étoposide avec la ciclosporine chez des rats a révélé une diminution de la clairance plasmatique et une augmentation des concentrations plasmatiques et tissulaires d'étoposide. Cependant, le rapport des concentrations tissus/plasma de l'étoposide était inchangé [70].

Il a également été observé, dans une étude de phase I, que des patients recevant de la ciclosporine et de l'étoposide avaient une augmentation de 80 % de l'AUC de l'étoposide, ainsi qu'une diminution de 38 % de la clairance totale [71]. Ces modifications étaient cependant observées chez les patients ayant de fortes concentrations en ciclosporine (> 2000 ng/mL).

Plusieurs études de phase I ont rapporté une augmentation de l'AUC de doxorubicine lorsque la ciclosporine est co-administrée [72,73]. De plus, des travaux menés sur les souris ont montré que la ciclosporine pouvait inhiber la P-gp, ce qui avait pour conséquence d'augmenter les concentrations de vinblastine et de doxorubicine au niveau de l'oreille interne des souris [74]. Après 3 semaines de traitement, les seuils auditifs (mesurés par réponses auditives du tronc cérébral) étaient significativement augmentés. Cette même équipe a également montré l'importance de la P-gp au niveau de la barrière existante entre le sang et les nerfs périphériques. En effet, chez les souris *mdr1a*^{-/-}, les concentrations tissulaires de doxorubicine et de vinblastine dans les nerfs périphériques étaient significativement plus élevées que celles des souris *mdr1a*^{+/+} pour lesquelles la doxorubicine ou la vinblastine avaient été administrées seules. Pour les souris *mdr1a*^{+/+}, les concentrations tissulaires de doxorubicine et de vinblastine dans les nerfs périphériques étaient significativement plus élevées chez les souris prétraitées avec de la ciclosporine que chez les souris pour lesquelles la doxorubicine ou la vinblastine avaient été administrées seules. Ces travaux suggèrent ainsi que la ciclosporine inhibe la fonction de pompe d'efflux de la P-gp dans les nerfs périphériques

expliquant en partie les effets indésirables neurotoxiques des vincaalcaloïdes et des anthracyclines.

Le paclitaxel est également un anti-cancéreux substrat de la P-gp. Chez six patients recevant du paclitaxel (100 mg) par voie orale en association avec de la ciclosporine (10 mg/kg), il a été constaté que, l'administration conjointe de ciclosporine pouvait doubler l'AUC du paclitaxel (476 ± 254 ng.h/mL vs 967 ± 779 ng.h/mL) [75].

Dans une étude similaire menée chez 14 patients ayant reçu un traitement oral de 60 mg/m² de paclitaxel avec ou sans ciclosporine (15 mg/kg), il a été constaté que l'AUC et la C_{max} du paclitaxel en association avec la ciclosporine étaient respectivement huit fois plus élevées (de $170,78 \pm 85,39$ ng/mL vs $1451,63 \pm 768,51$ ng.h/mL) et deux fois plus élevées (de $85,39$ ng/mL vs $170,78$ ng/mL) [76].

Il a également été rapporté qu'après administration de paclitaxel (120 mg/m²) en combinaison avec l'élaclidar (inhibiteur sélectif de la P-gp) chez six patients, l'AUC et la C_{max} du paclitaxel étaient respectivement de $2792,25 \pm 1426,03$ ng.h/mL et de $307,40 \pm 145,16$ ng/mL. Dans cette même étude, la co-administration de ciclosporine montrait des résultats similaires sur ces deux paramètres ($2177,44 \pm 1955,43$ ng.h/mL et $264,71 \pm 111,01$ ng/mL) [77], révélant ainsi le rôle de la P-gp et de la ciclosporine dans l'exposition au paclitaxel.

1.3.1.2.4. Anti-psychotiques

Plusieurs médicaments anti-psychotiques sont également substrats de la P-gp. Une étude *in vitro* a montré que certains anti-psychotiques sont capables d'inhiber le transport du [³H] talinolol qui est un substrat de référence de la P-gp [78]. Dans cette étude, l'amisulpride a été administré chez des rats en combinaison avec la ciclosporine. Il en résulte que les concentrations sanguines et la distribution de l'amisulpride dans le cerveau étaient augmentés. D'autres travaux indiquent que la ciclosporine affecte la pharmacodynamie et la pharmacocinétique de l'amisulpride, en inhibant la P-gp. La co-administration de ciclosporine a montré un allongement de l'effet anti-psychotique (24h après l'administration du médicament), mesuré par la distance parcourue par les rats en open field [79]. De plus, l'AUC dans le sang et le cerveau était plus élevée chez les rats co-traités par la ciclosporine.

La dompéridone est un antagoniste périphérique des récepteurs dopaminergiques D2. Sa distribution au niveau du cerveau est limitée par la fonction d'efflux de la P-gp. Cependant, une étude chez le rat révèle que l'intensité des syndromes extra-pyramidaux provoqués à la suite d'administration de dompéridone était augmentée avec la ciclosporine. Parallèlement, les concentrations de dompéridone au niveau du cerveau étaient significativement augmentées en présence de ciclosporine [80].

1.3.1.2.5. Inhibiteurs calciques

La nifédipine est un inhibiteur calcique, substrat du CYP3A4 et probablement substrat de la P-gp [81]. En effet, une étude chez les rats [82] a montré que l'efflux de la nifédipine par la P-gp (mesurée par les concentrations observées dans les intestins) était significativement diminué en présence de ciclosporine. Curieusement, dans cette étude, les concentrations plasmatiques n'étaient pas modifiées suite à l'administration de ciclosporine, laissant penser que la ciclosporine pourrait également inhiber le métabolisme de la nifédipine par le CYP3A4 ou d'autres transporteurs ; ce qui compenserait la diminution de biodisponibilité.

Une autre étude menée chez le rat portant sur la nimodipine [83] a également montré le rôle inhibiteur de la ciclosporine sur la P-gp. Chez ces rats, les concentrations en nimodipine dans le cerveau étaient significativement plus élevées en présence de ciclosporine.

1.3.1.2.6. Interactions modifiant l'exposition à la ciclosporine

La ciclosporine peut aussi être « victime » d'interactions médicamenteuses en lien avec son métabolisme ou son transport membranaire. La quercétine et la rutine sont des flavonoïdes (anti-oxydants) retrouvés dans les aliments d'origine végétale, les herbes et les compléments alimentaires. Une étude *in vitro* mais aussi *in vivo* (chez le rat) s'est intéressée à leur effet sur la biodisponibilité de la ciclosporine [84]. Dans cette étude, la C_{max} et l' AUC_{0-540} de la ciclosporine étaient significativement diminuées (environ -60 % et -50 % pour la quercétine et la rutine respectivement) chez les rats pour lesquels, la quercétine et la rutine étaient administrées. Les études *in vitro* associées ont révélé que ces flavonoïdes augmentaient l'activité de la P-gp, mais aussi celle du CYP3A4.

Le jus de raisin interagit également avec la ciclosporine. Une étude chez l'homme [85] montre que 200 ml de jus de raisin pourrait réduire de manière significative l' AUC de la ciclosporine de 30 % et sa C_{max} de 28 % chez des volontaires sains sans modifier la demi-vie d'élimination, ce qui indique que cette interaction aurait probablement pour origine le processus d'absorption (biodisponibilité) plutôt que d'élimination, et impliquerait donc l'induction de la P-gp ou du CYP3A4 [86].

A l'inverse, le jus de pamplemousse pourrait augmenter la biodisponibilité de la ciclosporine, par inhibition de l'activité du CYP3A ou de la P-gp (ou des deux) dans l'intestin [87].

Les bêta-bloquants tels que le carvedilol peuvent également interagir avec la ciclosporine. Une étude rétrospective menée chez des patients ayant reçu une greffe cardiaque montre que l'introduction du carvedilol chez des patients traités avec de la ciclosporine provoque une augmentation des concentrations résiduelles de ciclosporine [88]. De plus dans cette étude, la dose de ciclosporine a dû être diminuée de 10 % afin de maintenir

des concentrations thérapeutiques. Le mécanisme de cette interaction avec la ciclosporine le plus probable est une inhibition de la P-gp. En effet, le carvedilol est principalement métabolisé par la sous-famille 2D6 (CYP2D6) du cytochrome P450, mais pas par le CYP3A4. De plus, il a été rapporté que le carvedilol inhibe l'activité de la P-gp [89].

Une autre étude sur le sang circulant et sur l'intestin extrait de rats vivants s'est intéressée à l'effet de l'inhibition/activation de la P-gp sur les concentrations de ciclosporine et de tacrolimus [90]. Les résultats montrent que ces dernières étaient augmentées de manière significative en cas de co-administration avec du vérapamil (inhibiteur de la P-gp), et étaient diminuées de manière significative en cas de co-administration avec de la rifampicine (inducteur de la P-gp). Cependant, les études *ex vivo* (intestins de rat) ont montré que l'absorption de la ciclosporine et du tacrolimus dans l'intestin grêle augmentaient en fonction du temps lorsque les médicaments étaient administrés avec ou sans vérapamil ou rifampicine. Il n'y avait néanmoins pas de différence dans l'absorption jéjunale ou iléale de la ciclosporine en présence ou absence de vérapamil/rifampicine.

I.3.1.3. Interaction avec BCRP

La protéine BCRP, également connue sous le nom de BCRP1/MXR/ABCP, a été isolée dans des cellules résistantes à la mitoxantrone n'exprimant pas la P-gp ou d'autres transporteurs MRP [91–94]. Il s'agit d'un "demi-transporteur" de la famille des transporteurs ABC. On pense qu'une dimérisation ou la formation des multimères sont nécessaires pour assurer un transport efficace du substrat [92,94].

Il a été observé que la protéine BCRP est associée à des résistances aux traitements pour la mitoxantrone, pour la daunorubicine, pour la doxorubicine, ainsi qu'une résistance croisée aux inhibiteurs de la topoisomérase I. Ce n'est pas le cas pour les taxanes, les vincaalcaloïdes ou le cisplatine [95,96]. Par ailleurs, la transfection de l'ADN de la protéine BCRP dans des cellules de cancer du sein initialement sensible aux anti-cancéreux a montré une résistance de ces cellules à la mitoxantrone [92].

L'expression de la protéine BCRP est observée dans des lignées cellulaires sélectionnées par la mitoxantrone dérivées de cellules humaines de myélome multiple et de fibrosarcome, ainsi que de cellules de cancer du sein, du côlon et de l'estomac. Au niveau des tissus sains, BCRP est fortement exprimée dans la membrane apicale des syncytiotrophoblastes placentaires, dans la membrane apicale de l'épithélium de l'intestin grêle et au niveau de la membrane canaliculaire du foie [97,98].

Ainsi, une étude s'est intéressée à l'effet de la ciclosporine sur des cellules résistantes aux traitements anti-cancéreux (mitoxantrone et doxorubicine) et sur-exprimant BCRP [99]. La co-administration de ciclosporine et de mitoxantrone sur ces cellules résistantes a permis

d'observer une accumulation de mitoxantrone et une augmentation de la cytotoxicité de cette dernière. Cette étude montre ainsi qu'en inhibant l'efflux de la mitoxantrone avec la ciclosporine, les cellules retrouvent leur sensibilité aux anti-cancéreux. Si la ciclosporine est capable d'inhiber la protéine BCRP, il existe en revanche peu d'interactions médicamenteuses en lien avec ce transporteur.

1.3.1.3.1. Topotécan et mitoxantrone

Une étude *in vitro* s'est intéressée à déterminer si la ciclosporine, le tacrolimus et le sirolimus sont des inhibiteurs et/ou des substrats de la BCRP [100]. L'effet des immunosuppresseurs sur l'activité de la BCRP dans les cellules HEK surexprimant la BCRP (HEK/482R) a été mesuré par cytométrie en flux. Les auteurs ont observé que la ciclosporine, le tacrolimus et le sirolimus inhibent de manière significative l'efflux des substrats BCRP tels que le phéophorbide A, la mitoxantrone et la BODIPY-prazosin. Ces immunosuppresseurs ont également permis d'annihiler la résistance au topotécan et à la mitoxantrone des cellules HEK/482R, initialement conférée par BCRP.

1.3.1.3.2. Eltrombopag

L'eltrombopag est un médicament stimulant la production des plaquettes, et substrat de BCRP (information de Novartis). Une étude de phase I évaluant l'association de l'eltrombopag et de la ciclosporine montre que suite à l'administration de ciclosporine à 600 mg et d'eltrombopag à 50 mg, l'AUC et la C_{max} étaient augmentées de 22 et 39 % respectivement [101]. Le T_{max} était également augmenté d'une heure environ. Cependant, ces modifications de l'exposition n'ont pas été jugées cliniquement significatives car la dose d'eltrombopag est ajustée sur la base de la numération plaquettaire, mais aussi parce que le traitement était globalement bien toléré dans cette étude.

1.3.1.3.3. Apixaban

L'apixaban est un anticoagulant oral direct inhibant l'activité du facteur Xa de la coagulation. L'apixaban est métabolisé par le cytochrome 3A4 dans l'intestin et le foie mais également de façon moindre par les cytochromes 1A2, 2C8, 2C9, 2C19 et 2J2 [102] (données sur l'apixaban de BMS). Il est également substrat de la P-gp et de BCRP [103].

Ainsi, une étude de phase I s'est intéressée aux interactions médicamenteuses entre la ciclosporine et le tacrolimus et l'apixaban chez 12 volontaires sains [104]. Les résultats de cette étude révèlent que la co-administration de ciclosporine (100mg) et d'apixaban (10mg) entraîne une augmentation de la C_{max} et de l'AUC de l'apixaban de 143 et 120 %. Inversement, le tacrolimus administré à 5 mg diminue la C_{max} et l'AUC de l'apixaban de 87 et 78 %. Les auteurs soulignent toutefois que les changements observés ne modifient pas de façon

substantielle les paramètres pharmacocinétiques de l'apixaban, et par conséquent, que les ajustements de dose d'apixaban ne sont pas justifiés lors de sa co-administration avec de la ciclosporine et du tacrolimus.

1.3.1.3.4. Acides ginkgoliques

Le *ginkgo biloba* est largement utilisé dans le monde comme médicament pour la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires. Les acides ginkgoliques (AG), présents dans les feuilles, les noix et l'enveloppe externe des graines de *G. biloba* L. Ils correspondent à des mélanges d'une série de composés d'acide n-alkylphénolique structurellement apparentés, contenant 13 à 19 atomes de carbone de chaîne latérale avec 0 à 3 doubles liaisons de chaîne latérale. Ces molécules pourraient causer une cytotoxicité par contact direct, une allergie et une neurotoxicité. Malgré les effets indésirables potentiels, les AG ont des activités pharmacologiques contre les maladies cardiovasculaires, les tumeurs, les infections bactériennes et l'inflammation [105–107].

Une étude s'est intéressée au transport de ces acides ginkgoliques. En utilisant un modèle cellulaire de surexpression de P-gp et de BCRP, il a été observé que les AG sont substrats de ces deux transporteurs. De plus, l'administration de ciclosporine a montré chez le rat une augmentation de l'AUC et des concentrations cérébrales des acides ginkgoliques [108].

1.3.2. Tacrolimus

Le tacrolimus est, comme la ciclosporine, un inhibiteur de la calcineurine. Cependant, il génère moins d'interactions médicamenteuses en lien avec les transporteurs.

La majorité des interactions est liée à son métabolisme car il est substrat des CYP3A4 et 3A5. Néanmoins, il est également un substrat de la P-gp [109]. Cette dernière semble être un déterminant mineur de la biodisponibilité orale du tacrolimus.

En effet, une étude chez les rats a montré que l'absorption intestinale du tacrolimus était limitée par la P-gp, tout comme celle d'autres substrats de ce transporteur tels que la ciclosporine ou le vérapamil [110]. Dans cette étude, la ciclosporine et le vérapamil augmentaient de manière significative l'absorption de la méthylprednisolone et de la vinblastine, via une puissante inhibition de la P-gp intestinale. Le tacrolimus était lui sans effet. Lorsque la ciclosporine et le tacrolimus ont été administrés par voie intra-veineuse aux rats, l'absorption de la digoxine a été considérablement augmentée par la ciclosporine, mais pas par le tacrolimus. Lorsque le tacrolimus a été co-administré avec du clotrimazole, un inhibiteur spécifique du CYP3A, les concentrations de tacrolimus mesurées dans l'intestin grêle du rat ont été multipliées par plus de sept par rapport aux concentrations observées lors

d'administration du tacrolimus seul. Ces résultats suggèrent fortement que l'interaction entre le tacrolimus et la P-gp est limitée au niveau de l'intestin grêle du rat, et que le métabolisme important assuré par les enzymes du CYP3A est en réalité le principal facteur responsable de la faible biodisponibilité orale du tacrolimus.

I.3.2.1. Interaction avec la P-gp

I.3.2.1.1. Ranolazine

Un cas rapporte une interaction entre le tacrolimus et la ranolazine (traitement de l'angor). Chez un patient, vingt-quatre heures après l'initiation de la ranolazine, les concentrations résiduelles de tacrolimus sont passées de 7,0-10,1 ng/mL à 17,8 ng/mL [111]. Par conséquent, la dose de tacrolimus a finalement été réduite de 70 % (3 mg deux fois par jour) pour maintenir des concentrations résiduelles stables entre 6,6 et 7,9 ng/mL, tout en poursuivant le traitement par ranolazine. La ranolazine, est à la fois un substrat et un faible inhibiteur du CYP3A, ainsi qu'un substrat et un inhibiteur intermédiaire de la P-gp [112]. Le mécanisme de cette interaction peut être lié à l'inhibition des cytochromes ou de la P-gp.

I.3.2.1.2. Kétoconazole

Il existe également une interaction entre le tacrolimus et le kétoconazole (antifongique azolé puissamment inhibiteur du CYP3A). Floren *et al.* [113] ont étudié l'interaction pharmacocinétique entre ces deux molécules. Bien que les médicaments aient été administrés à 10 heures d'intervalle, la co-administration de kétoconazole a doublé la biodisponibilité orale du tacrolimus (14 ± 5 % sans kétoconazole contre 30 ± 8 % avec le kétoconazole). Le kétoconazole n'a cependant pas eu d'effet significatif sur la clairance du tacrolimus, le volume de distribution à l'équilibre ou la biodisponibilité hépatique. Ceci suggère que l'augmentation de l'exposition et de la biodisponibilité orale étaient très probablement liés à un effet inhibiteur local sur le métabolisme intestinal et/ou l'activité de la P-gp. Ce même phénomène a aussi été observé dans une étude clinique réalisée chez 19 adultes ayant reçu une greffe de rein [114].

I.3.2.1.3. Rispéridone

Dans un cas clinique [115] Watanabe *et al.* ont rapporté, chez un patient traité par tacrolimus pour une greffe de moelle, que suite à l'administration de voriconazole, le rapport concentration/dose de tacrolimus été multiplié par 8. Le voriconazole est un antifongique connu pour sa forte capacité à inhiber les CYP3A. Les auteurs étaient toutefois surpris car l'interaction observée était beaucoup plus importante que prévu. En retraçant l'historique des administrations, ils ont constaté que le patient était également traité par rispéridone (anti-psychothique). Ils ont émis l'hypothèse que l'inhibition du cytochrome P450 (CYP)3A dans l'intestin grêle par le voriconazole et l'inhibition de la P-gp dans l'intestin grêle par la rispéridone

exerçaient un effet synergique sur la biodisponibilité du tacrolimus. Ainsi, les auteurs ont montré *in vitro*, sur des cellules caco-2, qu'après une incubation de 120 minutes, le transport apical-basal (A-B) de la rhodamine 123 (substrat de la P-gp) était augmenté de 47,1 %, alors que celui dans la direction B-A était diminué de 61,7 % en présence de rispéridone. Ces résultats indiquent que la rispéridone a un effet inhibiteur sur le transport de rhodamine 123 médié par la P-gp (impliqué dans le transport Basal-Apical). Ensuite, les auteurs ont observé que transport A-B du tacrolimus était augmenté de 21,7 %, alors que celui dans le sens B-A était diminué de 10,7 % en présence de rispéridone. Ces résultats suggèrent que la rispéridone était au moins partiellement impliquée dans le mécanisme observé chez le patient.

1.3.2.1.4. Amlodipine

Chez l'Homme, le tacrolimus est principalement métabolisé par les cytochromes 3A4 et 3A5, qui sont exprimés principalement dans le foie et l'intestin grêle, alors que chez le rat il est substrat du CYP3A2 [116]. L'amlodipine est un inhibiteur du CYP3A2 chez le rat [117] et un substrat de la P-gp [118]. Une étude chez le rat s'est intéressée à l'inhibition par l'amlodipine du transport du tacrolimus par la P-gp [119]. Après administration par voie orale ou intra-veineuse d'amlodipine, il existait une diminution de la clairance et une augmentation des concentrations sanguines de tacrolimus chez les rats. La demi-vie du tacrolimus n'était cependant pas significativement affectée par l'amlodipine. Les auteurs ont conclu que l'amlodipine augmentait les concentrations sanguines de tacrolimus chez les rats, probablement en inhibant la P-gp et le CYP3A2.

1.3.2.1.5. Maribavir

Une interaction entre le maribavir (nouvel antiviral anti-CMV) et le tacrolimus a été mise en évidence lors d'une étude clinique randomisée, en double aveugle, contrôlée par placebo, conçue afin d'évaluer l'interaction pharmacocinétique potentielle de l'administration concomitante de maribavir et de tacrolimus [120].

Il a ici été montré qu'en cas de co-administration maribavir / tacrolimus, la C_{max} moyenne du tacrolimus augmentait de 38 %, les concentrations minimales du tacrolimus (12h après la dose) augmentaient de 57 %, de même que l'AUC du tacrolimus (augmentée de 51 %). D'autre part, la clairance apparente du tacrolimus diminuait de 34 % et le temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale (T_{max}) était retardé d'une demi-heure.

Le mécanisme de l'interaction pharmacocinétique entre le maribavir et le tacrolimus n'a pas été entièrement élucidé. Selon les auteurs, il est très probablement lié à l'inhibition de l'activité des cytochromes P450 et de la P-gp intestinale. Le maribavir et le tacrolimus sont tous deux métabolisés par le CYP 3A4 dans le foie et l'intestin grêle et sont des substrats de la P-glycoprotéine intestinale (données sur le maribavir du fabricant ViroPharma).

I.3.3. Évériolimus

L'évérolimus est un immunosuppresseur agissant par inhibition de la protéine mTOR. Il est également de plus en plus utilisé en oncologie avec une indication dans le cancer du sein positif aux récepteurs hormonaux et HER2 négatif, le cancer du rein métastatique avancé et certaines tumeurs neuroendocrines [121]. Dans ce contexte, de nouvelles interactions médicamenteuses sont attendues en raison des multiples médicaments susceptibles d'être prescrits pour traiter ces maladies et leurs comorbidités.

L'évérolimus est substrat de la P-gp et des CYP3A4/5 et 2C8 [122,123].

I.3.3.1. Interaction avec la P-gp

I.3.3.1.1. Lapatinib

Une étude conduite chez des souris démontre une interaction entre le lapatinib et l'évérolimus mettant en jeu la P-gp [124]. Les résultats de cette étude confirment que l'évérolimus est substrat de la P-gp et révèlent une augmentation significative de l'AUC de l'évérolimus (1,3 fois) chez les souris déficientes pour la P-gp. De plus, suite à un prétraitement pendant 2 jours au lapatinib, il a été observé une augmentation significative de l'AUC (2,6 fois) de l'évérolimus par rapport au groupe de souris traitées par l'évérolimus seul, cependant les demi-vies d'élimination apparentes étaient similaires. Cette observation était également accompagnée d'une diminution significative (38,5 %) de l'expression de la P-gp au niveau du duodénum dans le groupe prétraité par le lapatinib par rapport au groupe témoin. Ainsi, les auteurs ont conclu que la diminution de l'expression intestinale de la P-gp était responsable de l'augmentation de l'absorption de l'évérolimus. Une inhibition du CYP 450 n'était cependant pas exclue.

Une étude de phase I a été menée dans le but de déterminer la sécurité et la pharmacocinétique de l'association lapatinib/évériolimus chez des patientes atteintes de cancer du sein [125]. Il a été montré que pour 54 patientes traitées à la dose maximale tolérée (1,250 mg de lapatinib et 5 mg d'évérolimus), le T_{max} moyen pour l'évérolimus été augmenté de 44 % ($p=0,06$), et la clairance moyenne diminuée de 25 % ($p=0,08$), lorsqu'il était administré conjointement avec le lapatinib. Bien que ces différences ne soient pas statistiquement significatives, cette modification de l'élimination de l'évérolimus n'exclue pas le mécanisme d'une possible interaction médicamenteuse.

I.3.3.1.2. Clarithromycine

Plusieurs cas rapportent une interaction probable entre l'évérolimus et la clarithromycine, via une inhibition du CYP3A4/P-gp. Les données disponibles ne permettent pas de dissocier le rôle de la P-gp et du CYP3A4 dans l'interaction, en partie car les

métabolites de l'évérolimus ne sont pas quantifiés en routine. Un cas rapporte que chez une patiente de 78 ans ayant reçu une transplantation cardiaque, suite à un traitement par clarithromycine pour une pneumopathie infectieuse, les concentrations résiduelles d'évérolimus sont passées de 3-8 ng/mL à plus de 20 ng/mL [126]. Après l'arrêt de la clarithromycine, les concentrations d'évérolimus sont progressivement redescendues dans la fenêtre thérapeutique.

Un autre cas rapporte qu'un patient de 56 ans traité par évérolimus pour un carcinome rénal a également reçu de la clarithromycine en vue de traiter une suspicion de gastrite à *Helicobacter pylori*. Douze jours suivant le début du traitement, le patient a développé une insuffisance rénale aiguë, nécessitant une hospitalisation et les concentrations résiduelles d'évérolimus mesurées étaient alors de 110 ng/mL. Durant l'hospitalisation, l'évérolimus a été suspendu jusqu'à atteindre un seuil normal [127].

Un autre rapport a observé une interaction avec la clarithromycine chez un adolescent recevant une faible dose d'évérolimus pour une transplantation cardiaque où il a été nécessaire de diminuer de moitié la dose d'évérolimus afin de maintenir une concentration à 8 ng/mL [128].

1.3.3.1.3. Vérapamil

Une étude clinique s'est intéressée à l'influence du vérapamil (inhibiteur du CYP3A et de la P-gp) sur la pharmacocinétique de l'évérolimus [129]. Dans cette étude, en 2 étapes menée sur 16 volontaires sains, les sujets ont reçu dans un premier temps une dose orale unique de 2 mg d'évérolimus. Dans un second temps, les sujets ont reçu du vérapamil à la dose de 80 mg trois fois par jour pendant 6 jours au total, ainsi qu'une dose unique de 2 mg d'évérolimus à partir du deuxième jour suivant le traitement au vérapamil.

Lorsque le vérapamil était co-administré, la concentration maximale d'évérolimus a été multipliée par 2,3 et l'AUC a été multipliée par 3,5. La demi-vie de l'évérolimus n'était cependant pas modifiée en présence de vérapamil. Cela suggère que cette interaction entraîne une augmentation de la biodisponibilité de l'évérolimus, par inhibition du CYP3A ou de la P-gp. Ici encore, il est impossible de savoir dans quelle mesure la P-gp participe à l'interaction

1.3.3.1.4. Anti-tuberculeux

Un cas rapporte une diminution importante des concentrations résiduelles d'évérolimus chez un patient de 63 ans ayant reçu une greffe hépatique suite à l'instauration d'un traitement anti-tuberculeux à base de rifampicine (600 mg/jour), isoniazide (250 mg/jour), pyrazinamide (1500 mg/jour) et éthambutol (1200 mg/jour) [130]. Malgré l'augmentation des doses

d'évérolimus jusqu'à 8 mg trois fois par jour, les concentrations résiduelles d'évérolimus étaient inférieure à 5 ng/mL. L'acide mycophénolique (un autre immunosuppresseur) a dû être instauré afin d'éviter un rejet aigu de greffe tout en continuant l'évérolimus. Après 45 jours de traitement les concentrations résiduelles d'évérolimus étant toujours très faibles, un switch de la rifampicine par la rifabutine (450 mg/j) a été mis en place. En quelques jours, les concentrations d'évérolimus ont augmenté ; les doses d'évérolimus ont été progressivement réduites à 5,25 mg/jour sur une période de 30 jours, ce qui a permis d'obtenir des concentrations résiduelles d'évérolimus de $10,3 \pm 1,8$ ng/mL.

Les rifamycines sont de puissants inducteurs du cytochrome 3A4 (CYP3A4) et de la P-gp et présentent des interactions médicamenteuses importantes avec la plupart des immunosuppresseurs [131]. Cet article suggère donc d'utiliser la rifabutine à la place de la rifampicine chez des patient sous évérolimus en cas de tuberculose.

D'autre part, une étude clinique menée chez 12 volontaires sains montre qu'après 8 jours de prétraitement avec la rifampicine, la clairance apparente de l'évérolimus après une dose unique de 4 mg était significativement augmentée (172 % en moyenne) [132]. Cela s'est également traduit par une diminution de la concentration maximale chez tous les sujets, en moyenne de 58 %, et par une diminution moyenne de l'AUC dans l'ensemble de la population étudiée, de 63 %. La demi-vie de l'évérolimus a été réduite de manière significative, passant de 32 heures à 24 heures en moyenne.

Cet exemple décrit une interaction par induction pour laquelle il est à difficile de dissocier l'effet de l'augmentation d'expression des CYP3A de celui de la P-gp. Néanmoins, la rifabutine est décrite par certains comme un inducteur moins puissant des CYP3A que la rifampicine [133,134]. L'interaction étant moins prononcée avec ce produit, le rôle de la P-gp pourrait être ainsi limité.

1.3.3.1.5. Maribavir

Une interaction entre le maribavir et l'évérolimus est également fortement suspectée. En effet, chez un patient de 59 ans ayant reçu une greffe rénale, il a été rapporté que les concentrations résiduelles d'évérolimus initialement situées entre 6 à 8 ng/mL (avec une dose quotidienne totale de 3,5 mg) sont passée à 17,2 ng/mL suite à l'instauration d'un traitement par maribavir [135]. En conséquence, l'administration d'évérolimus a été interrompue pendant 1 jour, et la dose a été réduite à 2,5 mg par jour.

Le mécanisme proposé pour cette interaction est une inhibition du CYP3A4 ou de la P-gp. La voie du CYP2C8 pourrait également être envisagée car elle est impliquée dans le métabolisme de l'évérolimus. Elle reste cependant à étudier pour le maribavir.

1.3.3.1.6. Autres anti-cancéreux

Le vandétanib est un inhibiteur du récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR) et du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) ainsi que de certaines tyrosines kinases. Il est utilisé dans la prise en charge de cancers médullaires de la thyroïde et fait l'objet d'études cliniques pour le traitement de certaines tumeurs cérébrales [136,137]. Une étude chez les souris a révélé que la co-administration d'évérolimus et de vandétanib permettait d'inhiber efficacement l'activité de la P-gp, entraînant une augmentation significative des concentrations de vandétanib dans le cerveau. Ceci pouvait ainsi accroître l'efficacité des traitements à base de vandétanib [138].

L'ocréotide est un analogue synthétique de la somatostatine, utilisé initialement pour la gestion des symptômes gastro-intestinaux associés aux tumeurs carcinoïdes fonctionnelles. Il est indiqué dans le traitement des tumeurs neuroendocrines. Il inhibe l'augmentation pathologique de la sécrétion de l'hormone de croissance, de peptides et de la sérotonine produits par le système endocrinien gastro-entéro-pancréatique.

Dans une étude de phase III, il a été observé une augmentation de la concentration minimale de l'ocréotide chez des patients co-traités par évérolimus [139]. L'ocréotide n'est pas métabolisé par le cytochrome P450 et il se lie peu aux protéines plasmatiques (données de Novartis ; [140]). Il est peu probable que l'augmentation observée des concentrations d'ocréotide résultent d'une interaction au niveau du métabolisme ou d'une interaction avec la liaison aux protéines plasmatiques par l'évérolimus. Le mécanisme réel de l'interaction n'est pas connu. L'ocréotide est éliminé sous forme inchangée dans les urines (32 % de la dose administrée, donnée de Novartis). De plus, les données *in vitro* indiquent que l'absorption hépatique de l'ocréotide se fait par transport actif [141] et l'ocréotide est un substrat pour de la P-gp et de MRP2 au niveau des tubules proximaux du rein [142].

Ainsi, l'augmentation observée de l'exposition à l'ocréotide, lorsqu'il est co-administré avec l'évérolimus, pourrait résulter de l'inhibition par l'évérolimus de ces transporteurs au niveau du foie et des reins.

1.3.4. Sirolimus

Le sirolimus est également un immunosuppresseur de la classe des inhibiteurs de mTOR. Par rapport à l'évérolimus, il demeure moins prescrit car il a une indication essentiellement restreinte à la greffe rénale. De ce fait, peu d'interactions avec les transporteurs membranaires ont été décrites dans la littérature. Cependant, le sirolimus est substrat de la P-gp ainsi que des CYP3A [143,144].

I.3.4.1. Interaction avec la P-gp

Les médicaments connus pour inhiber ou induire la P-gp peuvent modifier l'exposition sanguine au sirolimus. Les études menées chez des volontaires sains lors du développement clinique du sirolimus montrent que la ciclosporine, le diltiazem, l'érythromycine, le kétoconazole et le vérapamil ont augmenté de manière significative l'exposition au sirolimus, probablement par inhibition des enzymes du CYP3A et de la P-gp [145]. En effet, chacun des médicaments ayant augmenté l'AUC du sirolimus sont des inhibiteurs du CYP3A et de la P-gp, à l'exception du kétoconazole, qui n'est qu'inhibiteur de CYP3A. La rifampicine a diminué de manière significative l'exposition au sirolimus. Cependant, l'exposition au sirolimus n'a pas été modifiée par l'aciclovir, l'atorvastatine, la digoxine, l'éthinylestradiol/norgestrel, le glyburide, la nifédipine ou le tacrolimus. Parmi tous les médicaments étudiés, le sirolimus a montré une augmentation significative de l'exposition à l'érythromycine et au S-(-)vérapamil seulement.

I.3.4.1.1. Antifongiques azolés

Un cas rapporte une forte interaction entre l'itraconazole et le sirolimus mettant en jeu la P-gp ainsi que les CYP3A [146]. Une patiente de 50 ans ayant reçu une greffe rénale a été traitée par une dose de charge de sirolimus de 15 mg sur deux jours, suivis de 10 mg pendant un jour, et d'une dose d'entretien de 5 mg/jour afin d'atteindre des concentrations comprises entre 8 et 12 ng/ml 3 jours après la greffe. Après une période de reprise du greffon, la créatinine sérique a augmenté brutalement le 9ème jour après la transplantation et une biopsie rénale a été effectuée. L'examen histologique a révélé un rejet aigu (grade IA au score de Banff) et étonnamment, la biopsie montrait un granulome épithélioïde avec une structure fongique positive à la coloration PAS (Periodic Acid Schiff) et une tache argentée positive en son centre. L'examen microscopique n'a pas permis d'identifier plus précisément le champignon. Ainsi, la patiente a été traitée avec de l'itraconazole à une dose initiale de 600 mg/jour, suivie de 400 mg/jour. Les hémocultures ainsi que l'antigénémie *Aspergillus* étaient négatives. L'impact d'une septicémie fongique étant considéré comme grave, il a été décidé de traiter cette patiente pendant au moins 3 à 6 mois. La concentration résiduelle de sirolimus dans le sang était de 9,6 ng/ml le jour où l'itraconazole a été commencé (jour 10 de sirolimus avec une dose quotidienne de 8 mg). Comme la concentration minimale suivante (6,8 ng/ml le 11e jour) était inférieure à l'objectif fixé, la dose de sirolimus a été augmentée à 10 mg/jour. À partir du 12ème jour de traitement, soit 2 jours après instauration de l'itraconazole, les concentrations minimales de sirolimus ont commencé à augmenter rapidement, jusqu'à atteindre 82,5 ng/ml les 15èmes et 16èmes jours. L'administration de sirolimus a été arrêtée le 17ème jour, et les concentrations sanguines de sirolimus ont rapidement chuté par la suite. Le traitement à l'itraconazole devait se poursuivre pendant au moins six mois.

Ce cas démontre clairement que les agents antifongiques azolés, connus comme étant des inhibiteurs du CYP3A et de la P-gp peuvent provoquer des interactions médicamenteuses significative sur le plan clinique avec le sirolimus, entraînant des concentrations sanguines toxiques. De plus, l'itraconazole a déjà été signalé comme inhibiteur puissant de l'élimination du sirolimus chez d'autres patients [147].

La littérature rapporte également des interactions significatives entre sirolimus et voriconazole, itraconazole, fluconazole et érythromycine [148]). La concentration sanguine résiduelle normalisée par la dose a montré une augmentation de sept fois en moyenne avec la co-administration de ces médicaments. Pour tous, le mécanisme supposé est une inhibition des CYP3A et de la P-gp.

1.3.4.1.2. Ranolazine

A l'instar du tacrolimus, il a également été rapporté une interaction entre le sirolimus et la ranolazine [149] chez un homme de 57 ans ayant subi une greffe de rein (stable depuis des années sous sirolimus) qui avait des antécédents d'angor chronique, pour lequel on lui a prescrit de la ranolazine. Suite à l'augmentation de la dose de ranolazine, les concentrations de sirolimus dans le sang ont fortement augmenté, atteignant des concentrations non mesurables (> 60 ng/mL). Après une diminution progressive des doses de sirolimus (jusqu'à 3 mg/jour), les concentrations sont revenues dans la zone thérapeutique, tout en poursuivant le traitement par ranolazine. Comme la ranolazine est un inhibiteur connu de la P-gp et du CYP3A, et que le sirolimus est un substrat connu pour ces deux protéines, les auteurs ont proposé que l'inhibition de la P-gp et du CYP3A4 par la ranolazine a contribué à l'augmentation significative de l'exposition au sirolimus.

Ainsi, lorsque l'administration conjointe de tacrolimus, évérolimus ou sirolimus avec un inhibiteur/inducteur connu de la P-gp et des CYP3A4/5 est nécessaire chez un patient transplanté, une surveillance étroite des concentrations sanguines des immunosuppresseurs mais aussi des autres médicaments potentiellement impactés est nécessaire pour orienter les ajustements de la dose en l'absence d'interactions significatives préalablement établies dans des études cliniques.

1.3.5. Acide Mycophénolique

L'acide Mycophénolique (MPA) est un immunosuppresseur inhibant l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), qui est une enzyme permettant la synthèse de novo de bases purique (guanine monophosphate) [150]. Il est généralement administré par voie orale sous sa forme estérifiée : le mycophénolate mofétil (MMF) ou sous forme de sel de sodium. Après absorption par l'estomac, ces 2 formes sont rapidement hydrolysées [151] par des estérases en métabolite actif, l'acide mycophénolique. Les voies du métabolisme du MPA

sont complexes et font appel à de nombreux transporteurs. L'étude de son transport et des interactions médicamenteuses en lien est détaillée dans l'article 2 et dans la partie III.

I.4. Synthèse

Les transporteurs membranaires jouent un rôle très important dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs. Dans les exemples suscités, les médicaments interagissant avec les enzymes du métabolisme (CYP) ont également une interaction avec la P-gp et il est souvent difficile de déterminer le mécanisme précis lors d'interactions médicamenteuses. De plus, certaines situations physiopathologiques peuvent aussi diminuer ou augmenter l'élimination rénale (vasoconstriction/vasodilatation) ou hépatique (insuffisance hépatique) indépendamment des mécanismes d'inhibition ou d'induction des transporteurs membranaires.

Ainsi, chez des patients transplantés et recevant des immunosuppresseurs, il convient d'être vigilant aux interactions médicamenteuses en lien avec la P-gp et les OATP mais également avec les inducteurs et ou inhibiteurs des enzymes du métabolisme. Le suivi thérapeutique pharmacologique devrait être proposé lorsqu'un médicament substrat des OATP, P-gp et du CYP3A4 est administré avec les immunosuppresseurs afin d'ajuster les doses des médicaments car dans de tels cas, le risque d'interactions médicamenteuse est possiblement élevé.

Le **tableau 3 a,b** ci-après résume l'ensemble des interactions entre les immunosuppresseurs et les transporteurs membranaires. On constate que parmi les immunosuppresseurs, la ciclosporine semble être la molécule ayant le plus d'interactions médicamenteuses avec les transporteurs membranaires.

Tableau 3: Récapitulatif des interactions entre les immunosuppresseurs et les transporteurs

3a)

Médicament	P-gp	OATP	MRP2	BCRP
<i>Ciclosporine</i>	Substrat/inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur
<i>Tacrolimus</i>	Substrat/inhibiteur	—	—	Inhibiteur
<i>Évérolimus</i>	Substrat/inhibiteur	Inhibiteur	—	—
<i>Sirolimus</i>	Substrat/inhibiteur	Inhibiteur	—	Inhibiteur
<i>Acide</i>	—	Substrat	Substrat	—
<i>Mycophénolique</i>		(MPAG)	(MPAG)	

3b)

<i>Transporteur</i>	Médicament interférent	Médicament affecté par l'interaction	Modification observée in vivo	REF
OATP1B1	Ciclosporine	Atorvastatine	AUC x 7-15	[25–27]
	Ciclosporine	Cérovastatine	AUC x 4	[28]
	Ciclosporine	Fluvastatine	AUC x 3-4	[29]
	Ciclosporine	Lovastatine	AUC x 20	[30]
	Ciclosporine	Pravastatine	AUC x 5-10	[31,32]
	Ciclosporine	Rosuvastatine	AUC x 7	[33]
	Ciclosporine	Simvastatine	AUC x 3-8	[34,35]
	Ciclosporine	Répaglinide	AUC x 2,4	[38]
	Ciclosporine	Bosentan	AUC x 2	[39]
	Ciclosporine	Irinotécan	Augmentation de l'AUC du SN-38 de 23 à 630 % et diminution de la clairance d'élimination de l'irinotécan de 39 à 64 %	[46]
	Ciclosporine	PF-04991532	AUC x 3	[49]
	Ciclosporine	Danoprévir	Cmax x 7 AUC x 14 C12h x 23	[51]
P-gp	Ciclosporine	Colchicine	Augmentation de l'AUC et du Cmax de 224-260 et 215-270 % respectivement	[66]
	Ciclosporine	Étoposide	Augmentation de de l'AUC de 80 %	[71]
	Ciclosporine	Paclitaxel	AUC x 2	[75]
	Jus de raisin	Ciclosporine	Diminution de l'AUC et du Cmax de 30 et 28 % respectivement	[86]
	Carvédilol	Ciclosporine	Augmentation des concentrations résiduelles	[88]
	Ranolazine	Tacrolimus	Augmentation des concentrations résiduelles	[111]

	Maribavir	Tacrolimus	Augmentation des concentrations résiduelles, de la C _{max} et de l'AUC de 57, 38 et 51 % respectivement	[120]
	Lapatinib	Évérolimus	Augmentation du T _{max} de 44% et diminution de la clairance de 25%	[125]
	Clarithromycine	Évérolimus	Augmentation des concentrations résiduelles	[126–128]
	Vérapamil	Évérolimus	C _{max} x 2,3 AUC x 3,5	[129]
	Rifampicine	Évérolimus	Diminution de la C _{max} et de l'AUC de 58 et 63%	[132]
	Maribavir	Évérolimus	Augmentation des concentrations résiduelles	[135]
	Évérolimus	Vandétanib	Augmentation des concentrations résiduelles	[138]
	Itraconazole	Sirolimus	Augmentation des concentrations résiduelles	[146]
	Ranolazine	Sirolimus	Augmentation des concentrations résiduelles	[149]
BCRP	Ciclosporine	Eltrombopag	Augmentation l'AUC et de la C _{max} de 22 et 39 % respectivement	[101]
	Ciclosporine Tacrolimus	Apixaban	Augmentation l'AUC et de la C _{max} de 120-78 et 143-87 % respectivement	[104]

I.5. Article 1: Multidrug resistance-associated protein 4 in pharmacology: Overview of its contribution to pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics

Le transporteur MRP4, appartenant à la famille des transporteurs ABC, ne fait pas systématiquement l'objet d'une étude réglementaire lors du développement pré-clinique des médicaments. Cependant, de nombreux travaux ont montré qu'il agit en tant que protéine d'efflux et participe au transport de molécules endogènes, de médicaments et de xénobiotiques, principalement au niveau intestinal, hépatique, rénal et au niveau de la barrière hémato-encéphalique.

L'objectif de cette revue de littérature était de recenser les études ayant exploré la capacité du transporteur MRP4 à modifier la pharmacocinétique et/ou la pharmacodynamie de médicaments, mais également à engendrer des interactions médicamenteuses.

La littérature est assez riche. Il pourrait être retenu de prime abord les notions suivantes :

- Dans le rein, MRP4 se situe au niveau du tube contourné proximal et plusieurs travaux montrent que son absence, à ce niveau, participe à l'accumulation de médicaments comme des céphalosporines, des diurétiques et des anti-viraux.
- MRP4 joue un rôle de protection au niveau du système nerveux central. Il est localisé au niveau des plexus choroïdes et dans la lumière des capillaires cérébraux. De nombreux travaux ont démontré son implication dans la neurotoxicité des anti-cancéreux comme le topotécan ou le cyclophosphamide.
- Assez paradoxalement, la littérature n'est pas abondante en ce qui concerne le rôle de MRP4 au niveau hépatique. Dans des modèles murins, il a été montré qu'il joue un rôle de détoxification, la prise de médicaments hépatotoxiques ou l'accumulation de médicaments entraînant une augmentation de son expression en vue de favoriser l'élimination.
- MRP4 est un acteur important des phénomènes d'activation et d'agrégation des plaquettes. Son absence est à l'origine de syndromes de saignements et des travaux ont montré son rôle dans les mécanismes d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou du dipyridamole.
- A l'instar d'autres protéines d'efflux, sa surexpression au niveau des cellules cancéreuses est responsable de résistances aux traitements. Des études ont montré son rôle dans des échecs suite à des protocoles comprenant du docétaxel ou de la 6-mercaptopurine, dans différents contextes.
- Il a été montré que les patients VIH positifs présentent une expression plus importante de MRP4 que les sujets sains. Plus précisément, il est probable que cette surexpression soit liée aux traitements anti-viraux eux-mêmes. Des travaux montrent que l'ajout d'inhibiteurs de MRP4 permet de restaurer l'activité de certains anti-rétroviraux au niveau de lymphocytes devenus résistants.
- En ce qui concerne les interactions médicamenteuses, des travaux ont essentiellement été menés pour la classe des anti-cancéreux et des anti-viraux, avec des études explorant l'impact d'ajout d'inhibiteurs de MRP4 (comme les AINS) sur leur toxicité, leur efficacité et leurs concentrations circulantes.

- Ces mêmes études menées pour les anti-cancéreux et les anti-viraux ont exploré le rôle des variants alléliques du gène *ABCC4*. Ces polymorphismes (12 variants « significatifs ») pourraient expliquer en partie les différences de biodisponibilité de médicaments, conduisant à une augmentation de la toxicité ou à une diminution d'efficacité d'un traitement. Toutefois, leur implication est difficile à estimer car les substrats de MRP4 peuvent également être pris en charge par d'autres transporteurs.



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Review article

Multidrug resistance-associated protein 4 in pharmacology: Overview of its contribution to pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics

Joseph Berthier^{a,b}, H el ene Arnion^a, Franck Saint-Marcoux^{a,b}, Nicolas Picard^{a,b,*}^aINSERM, UMR 1248, F-87000 Limoges, France^bCHU Limoges, Service de pharmacologie, toxicologie et pharmacovigilance, F-87000 Limoges, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Pharmacogenetics
Drug-drug interactions
Multidrug resistance-associated protein 4
Anti-infectious and anti-cancer drugs

ABSTRACT

MRP4 is an ABC membrane transporter involved in clinical outcomes as it is located in many tissues that manages the transport and the elimination of many drugs. This review explores the implication of MRP4 in clinical pharmacology and the importance of its genetic variability. Although there is no specific recommendation regarding the study of MRP4 in drug development, it should be considered when drugs are eliminated by the kidney or liver or when drug-drug interactions are expected.

1. Introduction

The transport of xenobiotics across organ membranes is mediated by transporters related to the ATP-binding cassette (ABC) transporter or the Solute Carrier (SLC) superfamilies. The present review focuses on MRP4 (Multidrug resistance-associated protein 4), the fourth member of the ABC family (*ABCC4* gene). MRP4 acts as an unidirectional export pump for conjugates which contributes to cellular detoxification. This transporter has been much less considered than other important members of the ABC superfamily such as the P-glycoprotein (P-gp, ABCB1). However, MRP4 obviously has an important role in clinical pharmacology since it contributes to the export of xenobiotics and it is known to be associated with situations of multi-drug resistance.

MRP4 is encoded by the *ABCC4* gene (MRP4 refers to the protein). Its substrates are mainly organic anions and glucuronide conjugates. [1,2] According to GeneCards (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCC4&keywords=ABCC4>) this gene is located on the minus strand of chromosome 13 (GRCh38/hg38: 95,019,829-95,301,475). The related protein is composed of 1325 amino acids and has a molecular mass of 149.5 kDa. Alternative splicing leads to 4 isoforms of MRP4.

So far, only isoform #1 has been studied. It is expressed in different organs such as the brain, liver, kidneys and blood cells [3] (Fig. 1). MRP4 contains two transmembrane domains (TMDs) and two nucleotide binding domains (NBDs) where the catalytic sites are found [4] (Fig. 2).

2. The roles of MRP4 in pharmacology

2.1. Substrates, inhibitors and related clinical application fields

Table 1 shows the main substrates and inhibitors of MRP4 as reported by Ivanyuk et al. and Russel et al. [5,6]. The drugs are related to 9 different clinical domains. Several substrates belong to cardiovascular, anti-infectious and anti-cancer drugs. In most cases these substrates are also inhibitors.

2.2. The role of MRP4 in drug pharmacokinetics

MRP4 is present in multiple organs and can modify cellular exposure to drugs or metabolites with different consequences. Here, we address the expected role of MRP4 in major organs involved in pharmacokinetics. Most of the studies listed below were performed in animals or derived from in vitro data. Extrapolation from these studies to clinical pharmacokinetics in humans requires careful interpretation.

2.2.1. Kidney

MRP4 is localized at the apical membrane of kidney proximal tubules (Fig. 1B) where it participates in the elimination of many drugs [2]. Various studies have shown that the absence of MRP4 can lead to an accumulation of the drugs in kidney cells and significantly modify their tubular excretion.

This phenomenon has been demonstrated for cephalosporins when

* Corresponding author at: CHU Limoges, B atiment CBRS, Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, 2 avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France.

E-mail address: nicolas.picard@unilim.fr (N. Picard).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.06.015>

Received 5 April 2019; Received in revised form 4 June 2019; Accepted 5 June 2019

Available online 07 June 2019

0024-3205/  2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

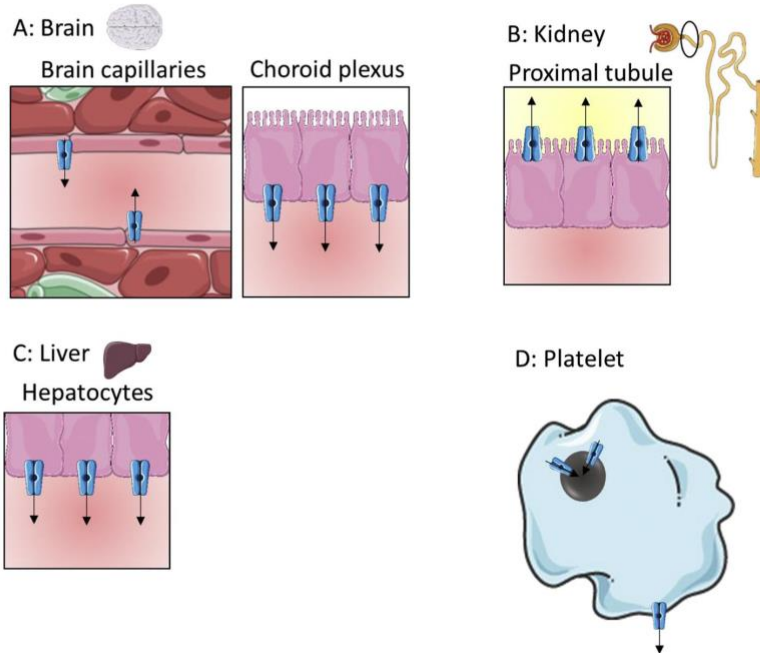


Fig. 1. MRP4 tissue localization. Arrows indicate the substrate transport direction. (A) MRP4 is localized at the basolateral membrane of the choroid plexus epithelium and also at the luminal side of brain capillaries. (B) In the kidney, MRP4 is localized at the apical side of proximal tubules. (C) In the liver, it is expressed at the basolateral side of hepatocytes. (D) In platelets, it can be found at the dense granule as well as at the plasma membrane.

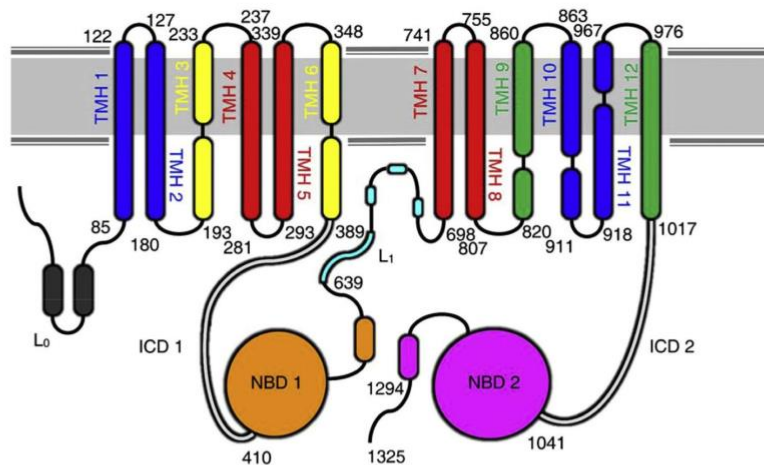


Fig. 2. MRP4 structure. Recent determination taken from and reprinted with permission from Chantemargue et al. [4]. TMH = Transmembrane helix, L1 and L0 = Linker 1 and 0, NBD = nucleotide binding domain, ICD = intra-cytoplasmic domain.

administered to mice [7]. Ci et al. reported that intra-kidney concentrations of ceftizoxime and cefazolin was 2 to 3-fold higher in *Mrp4*^{-/-} mice compared to wild-type mice. The accumulation of the two drugs in the kidney was found to decrease the renal clearances (about 10-fold and 3-fold, respectively) of both drugs, but was not associated with a significant modification in their steady-state plasma concentrations [7].

In a very similar study, Hasegawa et al. observed that the clearance of two different diuretics (hydrochlorothiazide and furosemide) was reduced of about 35 to 40% in *Mrp4*^{-/-} mice [8]. In deficient mice, the intra-kidney concentration of hydrochlorothiazide was almost doubled as compared to wild-type mice. Here again, the accumulation in the

kidney and decrease in the renal excretion of the diuretics was not associated with a modification in drug plasma concentrations (similar area under the time-concentration (AUC) values of furosemide in deficient and control mice).

The same research team also demonstrated that the absence of MRP4 could double the intra-kidney concentrations of tenofovir and adefovir, two antiviral agents with strong and selective activity against retroviruses [9]. For both drugs, the renal luminal efflux clearance was estimated to be 37% in *Mrp4*^{-/-} mice and 46% in wild-type mice [9].

2.2.2. Brain

MRP4 is localized in the basolateral membrane of the choroid plexus

Table 1
MRP4 substrates and inhibitors reported in the literature and their related clinical application fields, adapted from Russel and Ivanyuk [5,6].

Drugs	Substrates (Yes/No/ND) (Km if available)	Inhibitor (Yes/No/ND) (IC50 if available)	Clinical application field: drug class
Simvastatin	ND	Yes ^a	Cardiovascular system: hypolipidemic agents
Dipyridamole	ND	Yes (< 1–12 μM)	Cardiovascular system: antithrombotic agents
Ticlopidine	ND	Yes	Cardiovascular system: Diuretics
Furosemide	Yes	Yes	Cardiovascular system: Diuretics
Hydrochlorothiazide	Yes	Yes ^a	Cardiovascular system: Diuretics
Irbesartan	ND	Yes (10 μM)	Cardiovascular system: Renin-angiotensin system
Losartan	ND	Yes ^a	Cardiovascular system: Renin-angiotensin system
Olmesartan	Yes (26 μM)	Yes	Cardiovascular system: Renin-angiotensin system
DHEAS	Yes (2 μM)	Yes	Endocrinology: Sex corticosteroids
Estradiol-17β-glucuronide	Yes (30 μM)	Yes	Endocrinology: Sex corticosteroids
Tamoxifen	ND	Yes ^a	
Cefazoline	Yes ^a (80 μM)	Yes	Anti-infectious agents: β-lactam antibiotics
Cefmetazole	Yes ^a (28 μM)	Yes	Anti-infectious agents: β-lactam antibiotics
Cefotaxime	Yes	Yes	Anti-infectious agents: β-lactam antibiotics
Ceftizoxime	Yes ^a (18 μM)	Yes	Anti-infectious agents: β-lactam antibiotics
Piperacillin	Yes ^a	ND	Anti-infectious agents: β-lactam antibiotics
Nitrofurantoin	ND	Yes ^a	Anti-infectious agents: Other antibacterials
Sulfasalazine	ND	Yes ^a	Anti-infectious agents: Other antibacterials
Micafungin	ND	Yes ^a	Anti-infectious agents: Antifungal agents
Adefovir	Yes ^a (> 1000 μM)	ND	Anti-infectious agents: Antiviral agents
Tenofovir disoproxil fumarate	Yes ^a (> 1000 μM)	ND	Anti-infectious agents: Antiviral agents
Leucovorin	Yes (640 μM)	Yes	Antineoplastic agents
Methotrexate	Yes ^a (220–1300 μM)	Yes	Antineoplastic agents
Mitoxantrone	ND	No (enhanced [³ H]-MTX efflux)	
Sorafenib	ND	Yes ^a	
Topotecan	Yes	ND	
Mycophenolic acid	Yes	Yes ^a	Immunosuppressants
Celecoxib	35 (μM)	Yes	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
Flurbiprofen	ND	Yes ^a	
Ibuprofen	ND	Yes ^a	
Indomethacin	5–22 (μM)	Yes ^a	
Naproxen	ND	Yes ^a	
Sulindac	Yes (2 μM)	Yes ^a	
Allopurinol	ND	No (Enhanced urate efflux)	Anti-gout and uricosuric drugs
Benzbromarone		Yes ^a	
Probenecid	Yes (100 μM)	Yes	
Edaravone and glucuronide	Yes (9.8 μM)	ND	Central nervous system drugs: Others
Sildenafil	Yes (20 μM)	Yes	Other xenobiotics

^a Indicates substantial contribution of MRP4 to drug transport or important inhibition potency (i.e. for substrates: drug eliminated by tubular secretion for at least 25% of its total clearance, predominantly through MRP4; for inhibitors, Ki or IC50 within the 10-fold range of plasma unbound maximal concentration, or when a pharmacokinetic interaction clinically significant was reported). ND indicates no data. Km: Michaelis-Menten's constant; IC 50: half maximal inhibitory concentration.

epithelium and also at the luminal side of brain capillaries (Fig. 1A) [10]. It reduces the transfer of many xenobiotics into the brain by extruding them from blood capillaries to the plasma. The impact of this phenomenon has been explored for different classes of drugs.

Some authors have focused on anticancer drugs because accumulation into the brain can promote neurotoxicity. Leggas et al. reported that 6 h after an intravenous injection of 2 mg/kg of topotecan, whole-brain concentration of the drug was approximately six times higher in

Mrp4^{-/-} mice than in wild-type mice [11]. Similarly, they observed that topotecan concentrations in cerebrospinal fluid 3 h after the perfusion were about 10-fold higher in *Mrp4*^{-/-} mice. Of note, DeVries et al. showed that BCRP (breast cancer resistance protein) and P-gp could also contribute to this phenomenon [12]. In another study performed in mice with a similar design, it was also observed that methotrexate, raltitrexed (two folate analogues) and cyclophosphamide (an alkylating agent) can significantly accumulate in the brain when MRP4 is not functional [13].

Oseltamivir is an anti-influenza virus drug whose active moiety is called Ro 64–0802. Two hours after an injection of 1 mM of Ro 64–0802 to mice, Ose et al. reported that its amount in the brain was about 5-times higher in *Mrp4*^{-/-} as compared to control mice [14] (0.32 nmol versus 0.060 nmol). However, the authors also considered organic anion transporter 3 (OAT3/SLC22A8), which is present in the abluminal and luminal membranes of brain capillaries and acknowledged that is difficult to clearly assess its role in brain distribution of the drug. This enlightens an important point: whatever the drug, multiple transporters are involved in membrane crossing processes and it is very difficult to discriminate their respective contributions.

2.2.3. Liver

MRP4 is localized at the basolateral membrane of human (Fig. 1C), rat, and mouse hepatocytes. It is also present in the human hepatoma HepG2 cells. It transports, among multiple substances, reduced glutathione and bile salts [15]. Only a few comprehensive studies concerning the impact of MRP4 liver expression on drug pharmacokinetics have been performed. Most of the data derived from in vitro studies.

Using different vesicular models expressing MRP4 or not, Ferslew et al. demonstrated that enalaprilat (the active metabolite of enalapril, an antihypertensive drug) is a substrate of MRP4 using human sandwich-cultured hepatocytes. The authors observed that the hepatic basolateral efflux clearance of enalaprilat was significantly reduced in presence of the MRP4 inhibitor MK-571 [16].

Interestingly, many transporters, including MRP4, are probably up regulated in the case of primary biliary cirrhosis and ingestion of toxic doses of acetaminophen [17]. In these situations, changes in hepatobiliary efflux transporters expression might modify the process of drug elimination. Indeed, Aleksunes et al. observed increased mRNA and protein expressions of multidrug resistance-associated proteins 2–4 (Mrp2–4) in mouse liver after exposure to a hepatotoxic dose of acetaminophen [18,19]. In another study, they showed that mice treated with acetaminophen reached maximal MRP4/3 up regulation in 48 h and that mice pre-treated with acetaminophen had less hepatotoxicity than those treated with placebo [20]. Consequently, the authors concluded that an increased expression of efflux transporters may help to prevent the accumulation of potentially toxic compounds within hepatocytes, thus contributing to acquired resistance [21].

Methotrexate (MTX) is the most widely recommended drug for the treatment of rheumatoid arthritis and is frequently associated to leflunomide in order to increase its clinical efficacy. MTX is a substrate of MRP4. Le Wang et al. [22] reported that, in mice, leflunomide significantly decreases the bile excretion of both MTX and its metabolite (7-hydroxy-MTX) and that it increases their concentrations in the liver, kidneys and plasma. Additionally, they observed an up regulation of MRP4 and MRP3 and a down regulation of MRP2 gene expression in the liver. These results suggest an enhanced basolateral efflux of MTX when associated to leflunomide.

2.2.4. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Only few data are available to explore the links between the pharmacokinetics of drugs and MRP4-related transport in PBMC.

Neutropenia is a common side effect when treating children for serious infections with long courses of antibiotics. In a study of approximately 100 children, Hahn et al. [23] observed that homozygous patients for *MRP4* c.3348 A > G given a prolonged therapy with β-

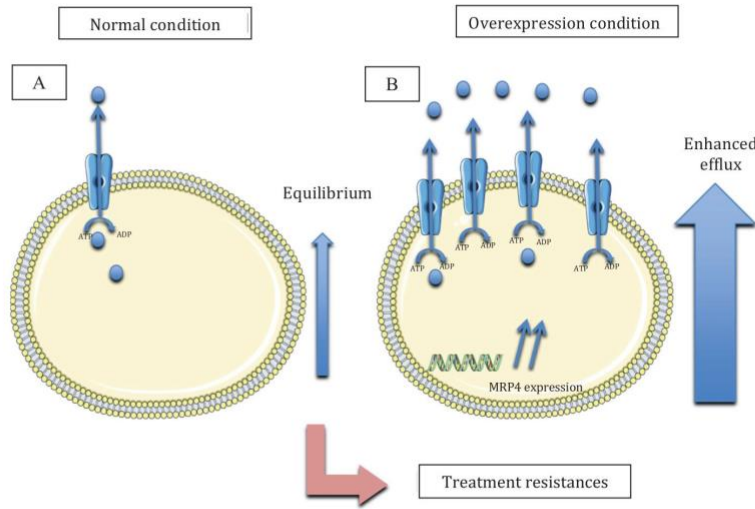


Fig. 3. Impact of MRP4 overexpression on drug efflux. Cells expressing MRP4 (blue) A. In normal cell life conditions; B. in case of overexpression (long term treatment for cancer, infection...), substrate (blue dots) efflux is increased. This may result in resistance to treatment. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

lactam (penicillin, cephalosporin or carbapenem) were 5.3 times (95% CI: 0.6–49.2) more likely to develop neutropenia ($p = 0.171$); though the pharmacokinetics of the antibiotics remains unchanged in these patients.

Ganciclovir (GCV) is the most widely used treatment for cytomegalovirus infections. However, neutropenia is a frequent associated adverse effect leading to a decrease in the GCV dose or discontinuation of the therapy, thereby favoring viral resistance. In renal transplant patients, Billat et al. [24] observed a significant association between GCV-triphosphate intracellular concentrations and the decrease in the neutrophil count over the first 3 months of GCV treatment. The authors identified one MRP4 genetic variant contributing to the decrease of neutrophils count [25] (see Section 3.2: genetic polymorphisms).

2.3. The role of MRP4 in drug pharmacodynamics

MRP4 is not considered to be a drug target but it can modify drug pharmacokinetics (as mentioned above), which can contribute to side effects or changes in drug efficacy (i.e. a decrease in MRP4 activity can enhance toxicity by decreasing drug elimination from cells; (Fig. 3). In addition, MRP4 is directly involved in physiological functions such as platelet aggregation and it participates in the mechanism of drug action. As shown in Fig. 3, MRP4 has an impact on the response to treatment.

2.3.1. The role of MRP4 in platelets

In platelets, MRP4 is mainly located at the dense granule membrane and to a lesser extent at the plasma membrane (Fig. 1D) [26]. At the dense granule membrane, it promotes the storage of ADP which is required for platelet activation and aggregation whereas at the plasma membrane, it promotes efflux from the platelet.

It was reported that patients suffering from Hermansky-Pudlak syndrome (i.e. the δ -storage pool deficiency; a defect in dense granule components) have no MRP4 at the dense granule membrane [26,27]. These patients present extensive bleeding. Mattiello et al. reported that aspirin and salicylic acid can be transported by MRP4 both at the dense granule and at the plasma membrane [28]. After inhibition of MRP4 by dipyridamole (a phosphodiesterase 5 inhibitor) and MK-571, they observed an increase in aspirin and salicylic acid concentrations in the cytoplasm of platelets and a higher COX-1 activity. Additionally, it seems that aspirin modifies the expression of MRP4. In fact, Mattiello et al. observed an increased expression of MRP4 at the plasma

membrane in patients treated by aspirin after coronary artery bypass graft surgery [28]. Massimi et al. [29] confirmed these results as they also observed that platelets MRP4 mRNA was more abundant in patients with chronic aspirin treatment than in patients treated for < 1 month. Additionally, patients with higher MRP4 mRNA levels had higher serum Thromboxane B2 levels and collagen-induced platelet aggregation (i.e., parameters signing higher platelet aggregation). This suggests that MRP4 has a role in reducing aspirin inhibition of COX-1 when it is overexpressed in platelets.

Temperilli et al. observed a similar phenomenon with other NSAIDs [30]. They found a higher expression of MRP4 (mRNA and protein levels) and an increase in ADP-induced platelet aggregation in osteoarthritis patients given NSAIDs for > 4 weeks. They also demonstrated that DAMI cells (human megakaryocytic cell line) treated with celecoxib, diclofenac, and naproxen had increased expression of MRP4 mRNA. These results suggest that NSAIDs treatment can result in MRP4 overexpression in platelets.

A recent work by Mendes-Silverio et al. [31] suggests that MRP4 plays an additional role in platelets. BAY 60-2770 is a soluble guanylyl cyclase activator that potently inhibits human platelet aggregation and adhesion through overstimulation of the cGMP-PKG signaling pathway [32]. In the presence of the MRP4 inhibitor MK 571, the anti-aggregating effect of BAY 60-2770 in collagen- and thrombin-activated platelets was significantly increased. Pre-incubation with MK 571 increased the intracellular and decreased the extracellular levels of cGMP (cyclic GMP) in response to BAY 60-2770, while the cyclic AMP (cAMP) levels remained unchanged. This resulted in an increase of the phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 in BAY 60-2770-treated platelets. In labelled platelets, BAY 60-2770 reduced the intracellular Ca^{2+} levels, an effect significantly potentiated by MK 571. Flow cytometry assays showed that BAY 60-2770 reduced integrin $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa) activation, which was further reduced by MK 571 treatment. Blocking MRP4-mediated efflux of cGMP may be a potential mechanism to enhance the antiplatelet efficacy of soluble guanylyl cyclases activators.

In the light of these in vitro findings, further studies have been performed in MRP4 deficient mice models. Decouture et al. [33] showed that arterial occlusion was delayed and tail bleeding time was prolonged in mice lacking MRP4 as compared to control mice.

2.3.2. MRP4 and cancer

The expression of MRP4 in cancer cells is also pivotal for treatment

issues as the protein can efflux many anticancer drugs or interfere with physiopathological processes.

Ho et al. [34] showed that MRP4 mRNA and protein levels were increased in prostate cancer cells. However, this overexpression was lower in patients pre-operatively treated with androgen castrative therapy, compared to uncastrated prostate cancer patients who had normal testosterone levels. This suggests an androgenic regulation of the transporter. The authors concluded that these data strongly suggested that MRP4 is an androgen-regulated gene important in the progression to prostate cancer and may be a potential drug target. These findings were confirmed using docetaxel resistant C4-2 (C4-2/D) cells (castration resistant prostate cancer cell line) that present an overexpression of MRP4. In fact, treatment with dihydrotestosterone increased MRP4 expression in C4-2/D cells whereas antiandrogenic treatments reversed the sensitivity of these cells to docetaxel chemotherapy by decreasing MRP4 overexpression [35].

Another study performed in CEM cells (human T-lymphoblastic leukemia cell line) demonstrated the role of MRP4 overexpression in 6-mercaptopurine (6-MP) resistance. In this case, MRP4 was up-regulated in tumorous cells but influx transporters were also down-regulated, which resulted in an increase of the efflux of 6-MP and a better survival rate of resistant cells [36]. In clinical settings, the overexpression of both MRP4 and MRP1 were significantly associated with poor prognosis in neuroblastoma [37,38]. These examples clearly show that overexpression of MRP4 in cancer cells contribute to treatment resistances.

MRP4 also manages the efflux of cAMP in human myeloid leukemia cells (U937, HL-60 and KG-1a) and inhibition of MRP4 is associated with an increase in intracellular cAMP, leading to the end of proliferation and promotion of cell differentiation [39]. MRP4 was also found to be highly expressed in non-small cell lung cancer. The inhibition of MRP4 expression with shRNA inhibited cell growth and increased the percentage of cells in G1 phase [40].

2.3.3. MRP4 in infectious diseases

Turizziani et al. isolated PMBC from HIV patients and healthy donors and measured MRP4 mRNA expression in lymphocytes T CD4 cells [41]. They observed that MRP4 mRNA expression was significantly higher in HIV patients. Moreover, they showed that treatments can modify MRPs and P-gp mRNA expression.

Clemente et al. [42] studied lymphocytes infected with HIV type-1_{NL4.3}, CEM and CEM3TC (overexpressing MRP4) cells treated with zidovudine, emtricitabine and tenofovir (MRP4 substrates) with or without different NSAIDs (ibuprofen, indomethacin and probenecid; MRP4 inhibitors). They observed a reduced efflux of zidovudine (AZT) in presence of these previously quoted inhibitors. Interestingly, the antiretroviral activity (measured by the decrease of p24 antigenemia (Agp24) during 3 days following infection) in infected lymphocytes and CEM3TC cells was significantly enhanced by NSAIDs mediated inhibition of MRP4. They also demonstrated that activation of peripheral blood lymphocytes from healthy donors with Phytohaemagglutinin can increase MRP4 expression from 6 to 8% to 25–60%. Additionally, after incubation with AZT, it was observed that MRP4 levels were increased by approximately 10% in total lymphocytes. The authors suggested that MRP4 inhibition can improve anti-retroviral treatment and proposed a possible mechanism of resistance of HIV by MRP4 overexpression. Adachi et al. [43] demonstrated a similar phenomenon with GCV treatment, by demonstrating that cells overexpressing MRP4 are more resistant to GCV cytotoxic effects.

3. Variability of MRP4 activity and consequences in clinical pharmacology

3.1. Drug-drug interactions

Drug-drug interactions concerning efflux transporters can lead to increased intracellular substrate concentrations through transport

inhibition. The increase of transporter expression at the cell membrane can lead to drug exclusion from the cells and to the increase in drug blood concentrations with several consequences depending on the drug properties (increased activity or toxicity or increased elimination of the drugs by the kidney). This section lists examples related to drug-drug interaction with MRP4.

3.2. Antiviral therapies

As discussed above, it was demonstrated in HIV-1 infected T cells that the inhibition of MRP4 by NSAIDs such as ibuprofen and indomethacin led to a significant increase of activity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (zidovudine, abacavir, lamivudine and tenofovir) [42].

Diclofenac is a MRP4 inhibitor [44] and tenofovir is a substrate of MRP4 [9]. A case study has reported a HIV patient treated for a long period of time with tenofovir who developed a severe, biopsy-proven, acute tubular necrosis with proximal tubule dysfunction, after introduction of diclofenac [45]. In a retrospective study conducted in HIV patients, 14.6% of the patients developed acute kidney injury shortly after initiating diclofenac treatment [46], suggesting that the drug-drug interaction between diclofenac and tenofovir is clinically relevant.

Other antiretroviral drugs might be involved in drug-drug interaction with tenofovir. In a study conducted in HIV patients of African origin, an increase in tenofovir trough concentrations was found in patients given lopinavir/ritonavir when compared to other therapies (i.e. tenofovir/emtricitabine/nevirapine; tenofovir/emtricitabine/zidovudine or tenofovir/emtricitabine/efavirenz). Nevertheless, the mean GFR (calculated using the CKD-EPI formula) was not substantially altered after 48 weeks of treatment compared to baseline ($-8.2 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, $P < 0.05$) [47]. The authors did not conclude whether the increase in tenofovir concentration was due to an inhibition of influx (by Organic anion transporter OAT1) or efflux (by MRP4 or MRP2). Knowing that lopinavir and ritonavir are mild OAT1/3 and MRP4/2 inhibitors [48,49] and that tenofovir is mainly eliminated by OAT1 and MRP4 [50], it was reported that tenofovir renal clearance can be decreased by 17,5% in HIV patients treated by lopinavir/ritonavir [51].

3.3. Anticancer therapies

MTX is a substrate of both MRP4 and MRP2 and its transport (and that of its glucuronide conjugates) was found to be inhibited by NSAIDs [44,52] in vesicular transport assays.

When concomitantly administered with MTX, NSAIDs (including indomethacin, ibuprofen, and naproxen) increase its exposure and toxicity. For example, Dupuis et al. reported that the use of MTX with NSAIDs in one patient increased mean MTX half-life [53]. Tracy et al. [54] also reported that the apparent systemic clearance of MTX was significantly reduced in patients treated with magnesium trisilicylate, ibuprofen and naproxen. Thyss et al. [55] analysed retrospectively 118 cycles of high dose MTX and demonstrated that simultaneous administration of ketoprofen is associated with prolonged detectable MTX levels.

Irinotecan is a drug known to cause severe diarrhea and is another substrate of MRP4. It has been shown that inhibition of cAMP-MRP4 mediated efflux by irinotecan increases cAMP intracellular level near the plasma membrane. This enables the formation of MRP4-CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) macromolecular complex (linked by PDZ motif) that activates the CFTR channel and causes diarrhea [56].

An in vitro study illustrated the role of MRP4 in resistance to oxazophorine drugs. HepG2 (human liver cancer cell line) and HepG2-MRP4 cells were treated with cyclophosphamide (CP) and ifosfamide (IF) for 48 h, with or without inhibitors. The inhibition of CP and IF's MRP4 dependent transport by either DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine, celecoxib, diclofenac or MK571 caused an increase in cytotoxicity in

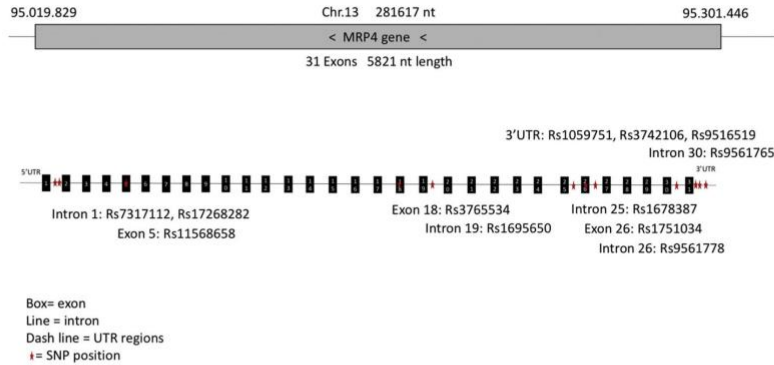


Fig. 4. Overview of relevant SNPs. In grey, MRP4 gene localization on chromosome 13. Black boxes represent exons, full lines correspond to introns and dash lines to untranslated regions. Red stars show the different SNPs listed in this review. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 2

List of the 12 *ABCC4* variants associated with substantial clinical consequences (according to <https://www.pharmgkb.org>).

Variant ID	Nucleotide change (consequences)	Drug impacted	Consequences	Level of proof	Ref
rs1059751	c.*879T > C (3'-UTR SNP)	Tenofovir	Increase of beta2-microglobulinuria in tenofovir HIV patients related to kidney tubular dysfunction	3	[65]
rs1751034	c.3348G > C/A (Missense Variant)	Tenofovir	<i>ABCC4</i> c.3348G allele carriers had higher TFV-DP concentrations than wild type carriers.	2B	[66]
rs3742106	c.*38T > G (3'-UTR SNP)	Tenofovir	Patients carrying <i>ABCC4</i> c.*38 TG or GG genotype had, on average, a 30% higher mean tenofovir plasma concentration than patients carrying the TT genotype <i>ABCC4</i> c.*38G allele carriers had 20% higher 3TC-triphosphate concentrations than non-carriers	3	[67]
rs11568658	c.559G > T (Missense Variant)	Zidovudine Latanoprost	<i>ABCC4</i> c.559 T carrier had significantly lower decrease in intraocular pressure than non-carriers at day 7 and day 30 of latanoprost treatment. <i>ABCC4</i> c.559 T carriers had significant higher risk of neutropenia following valganciclovir treatment than non-carriers.	3	[68] [69]
		(Val)ganciclovir	Decrease of MRP4 mediated efflux in vesicular transport assay		[25]
		Methylated arsenic metabolites (MMA(GS) ₂)			[70]
rs1678387	g.240795A > G (Intronic variant)	Biphosphonates	Allele A is weakly associated with an increased likelihood of Osteonecrosis when treated with Biphosphonates as compared to allele G.	3	[71]
rs16950650	g.183269G > A (Intron variant)	Cisplatin Irinotecan	Variant allele carriers had shorter overall survival for small-cell lung cancer when treated by irinotecan and cisplatin than wild type carriers.	3	[72]
rs17268282	g.33387C > A (Intron variant)	Furosemide	This variant was associated with weight loss when using furosemide in decompensated heart failure patients.	3	[73]
rs3765534	c.2269G > A (Missense Variant)	Azathioprine, Mercaptopurine	Increase of 6-Thioguanine nucleotide levels and decrease of white blood cells in carriers of the variant.	3	[74]
rs7317112	g.35178T > C (Intron variant)	Methotrexate (MTX)	Wild type genotype was associated with more frequent mucositis in Acute lymphoblastic leukemia patients treated with MTX	3	[75]
rs9516519	c.*1372A > G/C (3'-UTR SNP)	Methotrexate (MTX)	TT genotype was associated with higher MTX plasma levels compared to GG + GT genotype when exposed to MTX in children with acute Leukemia, B-Cell.	3	[76]
rs9561765	g.275458C > T (Intron variant)	Imatinib	<i>ABCC4</i> TT genotype was associated with reduced time to progression disease in gastrointestinal stromal tumors	3	[77]
rs9561778	g.244986C > T (Intron variant)	Cyclophosphamide	This variant was associated with gastrointestinal toxicity and leukopenia/neutropenia when using Cyclophosphamide based combination in breast cancer patient	3	[78]

Nucleotide changes are given according to *ABCC4* transcript variant 1 (i.e. NM_005845.4) or to the RefSeq for intronic variants. PharmGKB criteria for levels of evidence [79] are the following: **2B**: Annotation for a variant–drug combination with moderate evidence of an association. The association must be replicated, but there may be some studies that do not show statistical significance, and/or the effect size may be small. **3**: Annotation for a variant–drug combination based on a single significant (not yet replicated) study or annotation for a variant–drug combination evaluated in multiple studies but lacking clear evidence of an association.

Table 3
Minor allelic frequencies (MAF) of MRP4 variants in different ethnic groups.

MAF	AFR	AMR	EAS	EUR	SAS
< 1%	rs3765534; rs11568658		rs9516519; rs17268282; rs11568695	rs3765534; rs16950650; rs11568695	rs11568695
1–10%	rs9561765; rs17268282; rs1678387	rs9561765; rs3765534; rs17268282; rs16950650; rs1678387; rs11568695; rs11568658	rs3765534; rs16950650	rs9561765; rs17268282; rs1678387; rs11568658	rs9561765; rs9516519; rs3765534; rs17268282; rs16950650; rs1678387; rs11568658
10–20%	rs9561778; rs16950650; rs11568695	rs9561778; rs9516519	rs11568658	rs9561778; rs9516519; rs1751034	rs9561778; rs1751034
> 20%	rs9516519; rs3742106; rs1751034; rs1059751; rs7317112	rs7317112; rs3742106; rs1751034; rs1059751	rs9561778; rs9561765; rs7317112; rs3742106; rs1751034; rs1678387; rs1059751	rs7317112; rs3742106; rs1059751	rs7317112; rs3742106; rs1059751

AFR: Africans, AMR: Americans, EAS: East Asian, EUR: European, SAS: South Asian.

HepG2-MRP4 cells compared to untransfected cells [57]. According to these results, there is a probable drug-drug interaction between oxazophorine and some NSAIDs associated with MRP4 inhibition.

3.4. Genetic polymorphisms

According to dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 30,185 SNPs were reported for MRP4, two thirds of which are located in intronic sequences. Some of them have direct or indirect clinical implications (see Fig. 4, Tables 2 and 3). In this section, only MRP4 variations unambiguously associated with clinical outcomes have been discussed.

MRP4 transports many antivirals and anticancer drugs. In all the studies listed in Table 1, variants were associated with drug toxicities, efficacy or pharmacokinetics. The direct effects of MRP4 variants can be difficult to ascertain, since drugs can be transported by other transporters bearing polymorphisms, contributing to the differences observed in clinical outcomes. Some studies also suffer from lack of power. For example, MTX is transported by MRP4 and MRP2 with different affinities [58]. The reduced function of one transporter due to a genetic variation (or to the inhibition through drug-drug interaction) can be compensated by overexpression of the second transporter. In the case of PMEAs (9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine), initially described as a MRP4 substrate, an up regulation of BCRP in various tissues was described in MRP4 Knock Out mice and was associated with decreased tissue concentrations of PMEAs [59]. Based on this observation, it has been confirmed that BCRP transports and confers resistance to the purine prodrug Bis(POM)PMEA also known as adefovir dipivoxil used in treatment for Hepatitis B. MRP4 expression in kidneys was also found to be increased in MRP2 deficient rats strain as compared to wild type rats but the efflux of cAMP (a MRP4 substrate) was not increased [60]. Both of these transporters are expressed at the apical membranes of proximal tubule cells and this study suggested that MRP4 can take over MRP2 substrates but it has not been tested with common substrates of these transporters. Indeed, the urinary excretion of cysteinyl leukotrienes and acetaminophen–glucuronide conjugate known as MRP2 substrates were increased in MRP2 deficient rat and Dubin-Johnson patients [61–63], suggesting a compensatory MRP4 transporter up regulation.

4. Conclusion

This review provides a better understanding regarding MRP4 drug transport and its implication in efficacy or toxicity. Based on recommendations from the International Transporter Consortium [64], regulatory instances such as the European Medicines Agency (EMA) and the Food and Drugs Administration (FDA) currently recommend investigating the role of only 7 transporters in the process of drug development (i.e. OAT1, OAT3, OCT2, OATP1B1, OATP1B1, P-gp and BCRP). MRP4 is not yet included in the list. Special attention should be given to MRP4 when dealing with anti-cancer, anti-infectious drugs or NSAIDs.

References

- [1] K. Lee, M.G. Belinsky, D.W. Bell, J.R. Testa, G.D. Kruh, Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter, *Cancer Res.* 58 (1998) 2741–2747.
- [2] R.A.M.H. van Aubel, P.H.E. Smeets, J.G.P. Peters, R.J.M. Bindels, F.G.M. Russel, The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 595–603.
- [3] Membrane transporters in drug development, *Nat. Publ. Group* 9 (2010) 215–236, <https://doi.org/10.1038/nrd3028>.
- [4] B. Chantemargue, F. Di Meo, K. Berka, N. Picard, H. Arnion, M. Essig, et al., Structural patterns of the human ABCC4/MRP4 exporter in lipid bilayers rationalize clinically observed polymorphisms, *Pharmacol. Res.* 133 (2018) 318–327, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.029>.
- [5] A. Ivanyuk, F. Livio, J. Biollaz, T. Buclin, Renal drug transporters and drug

- interactions. *Clin. Pharmacokinet.* (2017) 1–68, <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0506-8>.
- [6] F. Russel, J. Koenderink, R. Masereeuw, Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules, *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (2008) 200–207, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.01.006>.
- [7] L. Ci, H. Kusuvara, M. Adachi, J.D. Schuetz, K. Takeuchi, Y. Sugiyama, Involvement of MRP4 (ABCC4) in the luminal efflux of ceftizoxime and cefazolin in the kidney, *Mol. Pharmacol.* 71 (2007) 1591–1597, <https://doi.org/10.1124/mol.106.031823>.
- [8] M. Hasegawa, H. Kusuvara, M. Adachi, J.D. Schuetz, K. Takeuchi, Y. Sugiyama, Multidrug resistance-associated protein 4 is involved in the urinary excretion of hydrochlorothiazide and furosemide, *J. Am. Soc. Nephrol.* 18 (2006) 37–45, <https://doi.org/10.1681/ASN.2005090966>.
- [9] T. Imaoka, H. Kusuvara, M. Adachi, J.D. Schuetz, K. Takeuchi, Y. Sugiyama, Functional involvement of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the renal elimination of the antiviral drugs adefovir and tenofovir, *Mol. Pharmacol.* 71 (2007) 619–627, <https://doi.org/10.1124/mol.106.028233>.
- [10] A.T. Nies, G. Jedlitschky, J. König, C. Herold-Mende, H.H. Steiner, H.P. Schmitt, et al., Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1–MRP6 (ABCC1–ABCC6), in human brain, *Neuroscience* 129 (2004) 349–360, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.051>.
- [11] M. Leggas, M. Adachi, G.L. Scheffer, D. Sun, P. Wielinga, G. Du, et al., MRP4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 7612–7621, <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7612-7621.2004>.
- [12] N.A. de Vries, J. Zhao, E. Kroon, T. Buckle, J.H. Beijnen, O. van Tellingen, P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 6440–6449, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1335>.
- [13] K. Kanamitsu, H. Kusuvara, J.D. Schuetz, K. Takeuchi, Y. Sugiyama, Investigation of the importance of multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4/Abcc4) in the active efflux of anionic drugs across the blood-brain barrier, *J. Pharm. Sci.* 106 (2017) 2566–2575, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.040>.
- [14] A. Ose, M. Ito, H. Kusuvara, K. Yamatsugu, M. Kanai, M. Shibasaki, et al., Limited brain distribution of [3R,4R,5S]-4-Acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate phosphate (Ro 64-0802), a pharmacologically active form of oseltamivir, by active efflux across the blood-brain barrier mediated by organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8) and multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4/Abcc4), *Drug Metab. Dispos.* 37 (2009) 315–321, <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024018>.
- [15] M. Rius, Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane, *Hepatology* 38 (2003) 374–384, <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50331>.
- [16] B.C. Ferslew, K. Köck, A.S. Bridges, K.L.R. Brouwer, Role of multidrug resistance-associated protein 4 in the basolateral efflux of hepatically derived enalaprilat, *Drug Metab. Dispos.* 42 (2014) 1567–1574, <https://doi.org/10.1124/dmd.114.057554>.
- [17] S.N. Barnes, L.M. Aleksunes, L. Augustine, G.L. Scheffer, M.J. Goedken, A.B. Jakowski, et al., Induction of hepatobiliary efflux transporters in acetaminophen-induced acute liver failure cases, *Drug Metab. Dispos.* 35 (2007) 1963–1969, <https://doi.org/10.1124/dmd.107.016170>.
- [18] L.M. Aleksunes, A.M. Slitt, N.J. Cherrington, M.S. Thibodeau, C.D. Klaassen, J.E. Manautou, Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride, *Toxicol. Sci.* 83 (2005) 44–52, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi013>.
- [19] L.M. Aleksunes, G.L. Scheffer, A.B. Jakowski, I.M. Pruimboom-Brees, J.E. Manautou, Coordinated expression of multidrug resistance-associated proteins (MRPs) in mouse liver during toxicant-induced injury, *Toxicol. Sci.* 89 (2006) 370–379, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi332>.
- [20] L.M. Aleksunes, S.N. Campion, M.J. Goedken, J.E. Manautou, Acquired resistance to acetaminophen hepatotoxicity is associated with induction of multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4) in proliferating hepatocytes, *Toxicol. Sci.* 104 (2008) 261–273, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn093>.
- [21] M. Banerjee, M.W. Carew, B.A. Roggenbeck, B.D. Whitlock, H. Naranmandura, X.C. Le, et al., A novel pathway for arsenic elimination: human multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) mediates cellular export of dimethylarsinic acid (DMAV) and the diglutathione conjugate of monomethylarsonous acid (MMAIII), *Mol. Pharmacol.* 86 (2014) 168–179, <https://doi.org/10.1124/mol.113.091314>.
- [22] L. Wang, L. Ma, Y. Lin, X. Liu, L. Xiao, Y. Zhang, et al., Leflunomide increases hepatic exposure to methotrexate and its metabolite by differentially regulating multidrug resistance-associated protein MRP2/3/4 transporters via peroxisome proliferator-activated receptor α activation, *Mol. Pharmacol.* 93 (2018) 563–574, <https://doi.org/10.1124/mol.117.110593>.
- [23] A. Hahn, T. Fukuda, D. Hahn, T. Mizuno, R.W. Frenck, A.A. Vinks, Pharmacokinetics and pharmacogenomics of β -lactam-induced neutropenia, *Pharmacogenomics* 17 (2016) 547–559, <https://doi.org/10.2217/pgs-2015-0008>.
- [24] P.-A. Billat, J.-B. Woillard, M. Essig, F.-L. Sauvage, N. Picard, S. Alain, et al., Plasma and intracellular exposure to ganciclovir in adult renal transplant recipients: is there an association with haematological toxicity? *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (2016) 484–489, <https://doi.org/10.1093/jac/dkv342>.
- [25] P.-A. Billat, T. Ossman, F. Saint-Marcoux, M. Essig, J.-P. Rerolle, N. Kamar, et al., Multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) controls ganciclovir intracellular accumulation and contributes to ganciclovir-induced neutropenia in renal transplant patients, *Pharmacol. Res.* (2017) 1–29, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.012>.
- [26] G. Jedlitschky, The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage, *Blood* 104 (2004) 3603–3610, <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4330>.
- [27] G. Jedlitschky, M. Cattaneo, L.E. Lubenow, D. Rosskopf, A. Lecchi, A. Artoni, et al., Role of MRP4 (ABCC4) in platelet adenine nucleotide-storage: evidence from patients with delta-storage pool deficiencies, *Am. J. Pathol.* 176 (2010) 1097–1103, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090425>.
- [28] T. Mattiello, R. Guerriero, L.V. Lotti, E. Trifirò, M.P. Felli, A. Barbarulo, et al., Aspirin extrusion from human platelets through multidrug resistance protein-4-mediated transport: evidence of a reduced drug action in patients after coronary artery bypass grafting, *J. Am. Coll. Cardiol.* 58 (2011) 752–761, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.03.049>.
- [29] I. Massimi, L.V. Lotti, F. Temperilli, M. Mancone, G. Sardella, S. Calcagno, et al., Enhanced platelet MRP4 expression and correlation with platelet function in patients under chronic aspirin treatment, *Thromb. Haemost.* 116 (2016) 1100–1110, <https://doi.org/10.1160/TH16-04-0316>.
- [30] F. Temperilli, M. Di Franco, I. Massimi, M.L. Guarino, M.P. Guzzo, G. Valesini, et al., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in-vitro and in-vivo treatment and multidrug resistance protein 4 expression in human platelets, *Vasc. Pharmacol.* 76 (2016) 11–17, <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.06.016>.
- [31] C.B. Mendes-Silverio, C.H. Lescano, T. Zaminelli, C. Sollon, G.F. Anhé, E. Antunes, et al., Activation of soluble guanylyl cyclase with inhibition of multidrug resistance protein inhibitor-4 (MRP4) as a new antiplatelet therapy, *Biochem. Pharmacol.* 152 (2018) 165–173, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.03.028>.
- [32] C.B. Mendes-Silverio, L.O.S. Leiria, R.P. Morganti, G.F. Anhé, S. Marcondes, F.Z. Mónica, et al., Activation of haem-oxidized soluble guanylyl cyclase with BAY 60-2770 in human platelets lead to overstimulation of the cyclic GMP signaling pathway, *PLoS One* 7 (2012) e47223, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047223>.
- [33] B. Decouture, E. Dreano, T. Belleville-Rolland, O. Kuci, B. Dizier, A. Bazaa, et al., Impaired platelet activation and cAMP homeostasis in MRP4-deficient mice, *Blood* 126 (2015) 1823–1830, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-631044>.
- [34] L.L. Ho, J.G. Kench, D.J. Handelsman, G.L. Scheffer, P.D. Stricker, J.G. Grygiel, et al., Androgen regulation of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in prostate cancer, *Prostate* 68 (2008) 1421–1429, <https://doi.org/10.1002/pros.20809>.
- [35] Y.-F. Li, H.-H. Ji, Z.-L. Zhang, T.-T. Zhang, W. Gan, S.-F. Zhang, Targeting MRP4 expression by anti-androgen treatment reverses MRP4-mediated docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer, *Oncol. Lett.* 14 (2017) 1748–1756, <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6357>.
- [36] X.-X. Peng, Z. Shi, V.L. Damaraju, X.-C. Huang, G.D. Kruh, H.-C. Wu, et al., Up-regulation of MRP4 and down-regulation of influx transporters in human leukemic cells with acquired resistance to 6-mercaptopurine, *Leuk. Res.* 32 (2008) 799–809, <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.09.015>.
- [37] M.D. Norris, J. Smith, K. Tanabe, P. Tobin, C. Flemming, G.L. Scheffer, et al., Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro, *Mol. Cancer Ther.* 4 (2005) 547–553, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0161>.
- [38] M.D. Norris, S.B. Bordow, G.M. Marshall, P.S. Haber, S.L. Cohn, M. Haber, Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 231–238, <https://doi.org/10.1056/NEJM199601253340405>.
- [39] S. Copsel, C. Garcia, F. Diez, M. Vermeulen, A. Baldi, L.G. Bianciotti, et al., Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 6979–6988, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.166868>.
- [40] X. Zhao, Y. Guo, W. Yue, L. Zhang, M. Gu, Y. Wang, ABCC4 is required for cell proliferation and tumorigenesis in non-small cell lung cancer, *Oncotargets Ther* 7 (2014) 343–351, <https://doi.org/10.2147/OTT.S56029>.
- [41] O. Turriziani, N. Gianotti, F. Falasca, A. Boni, A.R. Vestri, A. Zoccoli, et al., Expression levels of MDR1, MRP1, MRP4, and MRPs in peripheral blood mononuclear cells from HIV infected patients failing antiretroviral therapy, *J. Med. Virol.* 80 (2008) 766–771, <https://doi.org/10.1002/jmv.21152>.
- [42] M.I. Clemente, S. Álvarez, M.J. Serranía, O. Turriziani, M. Genebat, M. Leal, et al., Non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the antiretroviral activity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors in HIV type-1-infected T-lymphocytes: role of multidrug resistance protein 4, *Antivir. Ther.* (Lond.). 14 (2008) 1101–1111, <https://doi.org/10.3851/IMP1468>.
- [43] M. Adachi, J. Sampath, L.-B. Lan, D. Sun, P. Hargrove, R. Flatley, et al., Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 38998–39004, <https://doi.org/10.1074/jbc.M203262200>.
- [44] A.A.K. El-Sheikh, J.J.M.W. van den Heuvel, J.B. Koenderink, F.G.M. Russel, Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate transport, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320 (2007) 229–235, <https://doi.org/10.1124/jpet.106.110379>.
- [45] J. Morelle, L. Labriola, M. Lambert, J.-P. Cosyns, F. Jouret, M. Jadoul, Tenofovir-related acute kidney injury and proximal tubule dysfunction precipitated by diclofenac: a case of drug-drug interaction, *Clin. Nephrol.* 71 (2009) 567–570.
- [46] M. Bickel, P. Khaykin, C. Stephan, K. Schmidt, M. Buettner, K. Amann, et al., Acute kidney injury caused by tenofovir disoproxil fumarate and diclofenac co-administration, *HIV Medicine* 14 (2013) 633–638, <https://doi.org/10.1111/hiv.12072>.
- [47] M.P. Lê, R. Landman, S. Koulla-Shiro, C. Charpentier, P.-S. Sow, M.-B. Diallo, et al., Tenofovir plasma concentrations related to estimated glomerular filtration rate changes in first-line regimens in African HIV-infected patients: ANRS 12115 DAYANA substudy, *J. Antimicrob. Chemother.* 70 (2015) 1517–1521, <https://doi.org/10.1093/jac/dku532>.
- [48] T. Cihlar, A.S. Ray, G. Laflamme, J.E. Vela, L. Tong, M.D. Fuller, et al., Molecular assessment of the potential for renal drug interactions between tenofovir and HIV

- protease inhibitors, *Antivir. Ther. (Lond.)* 12 (2007) 267–272.
- [49] W.F.W. Bierman, G.L. Scheffer, A. Schoonderwoerd, G. Jansen, M.A. van Agtmael, S.A. Danner, et al., Protease inhibitors atazanavir, lopinavir and ritonavir are potent blockers, but poor substrates, of ABC transporters in a broad panel of ABC transporter-overexpressing cell lines, *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (2010) 1672–1680, <https://doi.org/10.1093/jac/dkq209>.
- [50] J.J. Kohler, S.H. Hosseini, E. Green, A. Abuin, T. Ludaway, R. Russ, et al., Tenofovir renal proximal tubular toxicity is regulated by OAT1 and MRP4 transporters, *Lab. Invest.* 91 (2011) 852–858, <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.48>.
- [51] J.J. Kiser, M.L. Carten, C.L. Aquilante, P.L. Anderson, P. Wolfe, T.M. King, et al., The effect of Lopinavir/ritonavir on the renal clearance of Tenofovir in HIV-infected patients, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 83 (2007) 265–272, <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100269>.
- [52] A. Kawase, T. Yamamoto, S. Egashira, M. Iwaki, Stereoselective inhibition of methotrexate excretion by glucuronides of nonsteroidal anti-inflammatory drugs via multidrug resistance proteins 2 and 4, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 356 (2016) 366–374, <https://doi.org/10.1124/jpet.115.229104>.
- [53] L.L. Dupuis, G. Koren, A. Shore, E.D. Silverman, R.M. Laxer, Methotrexate-nonsteroidal antiinflammatory drug interaction in children with arthritis, *J. Rheumatol.* 17 (1990) 1469–1473.
- [54] T.S. Tracy, K. Krohn, D.R. Jones, J.D. Bradley, S.D. Hall, D.C. Brater, The effects of a salicylate, ibuprofen, and naproxen on the disposition of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 42 (1992) 121–125.
- [55] A. Thyss, G. Milano, J. Kubar, M. Namer, M. Schneider, Clinical and pharmacokinetic evidence of a life-threatening interaction between methotrexate and ketoprofen, *Lancet* 1 (1986) 256–258.
- [56] C. Moon, W. Zhang, A. Ren, K. Arora, C. Sinha, S. Yarlaga, et al., Compartmentalized accumulation of cAMP near complexes of multidrug resistance protein 4 (MRP4) and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to drug-induced diarrhea, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 11246–11257, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.605410>.
- [57] J. Zhang, K.-Y. Ng, P.C. Ho, Interaction of oxazaphosphorines with multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4), *AAPS J.* 12 (2010) 300–308, <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9189-x>.
- [58] A.A.K. El-Sheikh, R. Greupink, H.M. Wortelboer, J.J.M.W. van den Heuvel, M. Schreurs, J.B. Koenderink, et al., Interaction of immunosuppressive drugs with human organic anion transporter (OAT) 1 and OAT3, and multidrug resistance-associated protein (MRP) 2 and MRP4, *Transl. Res.* (2016) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.08.003>.
- [59] K. Takenaka, J.A. Morgan, G.L. Scheffer, M. Adachi, C.F. Stewart, D. Sun, et al., Substrate overlap between MRP4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution, *Cancer Res.* 67 (2007) 6965–6972, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4720>.
- [60] C. Chen, A.L. Slitt, M.Z. Dieter, Y. Tanaka, G.L. Scheffer, C.D. Klaassen, Up-regulation of MRP4 expression in kidney of MRP2-deficient TR- rats, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 1088–1095, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.06.019>.
- [61] M. Huber, A. Guhlmann, P.L. Jansen, D. Keppler, Hereditary defect of hepatobiliary cysteinyl leukotriene elimination in mutant rats with defective hepatic anion excretion, *Hepatology* 7 (1987) 224–228.
- [62] E. Mayatepek, W.D. Lehmann, Defective hepatobiliary leukotriene elimination in patients with the Dubin-Johnson syndrome, *Clin. Chim. Acta* 249 (1996) 37–46.
- [63] C. Chen, G.E. Hennig, J.E. Manautou, Hepatobiliary excretion of acetaminophen glutathione conjugate and its derivatives in transport-deficient (TR-) hyperbilirubinemic rats, *Drug Metab. Dispos.* 31 (2003) 798–804.
- [64] K.M. Hillgren, D. Keppler, A.A. Zur, K.M. Giacomini, B. Stieger, C.E. Cass, et al., Emerging transporters of clinical importance: an update from the international transporter consortium, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 94 (2013) 52–63, <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.74>.
- [65] S. Likanonakul, B. Suntasukklappon, R. Nitiyanontakij, W. Prasithsirikul, E.E. Nakayama, T. Shioda, et al., A single-nucleotide polymorphism in ABCC4 is associated with Tenofovir-related Beta2-Microglobulinuria in Thai patients with HIV-1 infection, *PLoS One* 11 (2016) e0147724, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147724>.
- [66] J.J. Kiser, C.L. Aquilante, P.L. Anderson, T.M. King, M.L. Carten, C.V. Fletcher, Clinical and genetic determinants of intracellular tenofovir diphosphate concentrations in HIV-infected patients, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 47 (2008) 298–303.
- [67] K. Rungtivasuwan, A. Avihingsanon, N. Thammajarak, S. Mitruk, D.M. Burger, K. Ruxrungtham, et al., Influence of ABCC2 and ABCC4 polymorphisms on tenofovir plasma concentrations in Thai HIV-infected patients, *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 3240–3245, <https://doi.org/10.1128/AAC.04930-14>.
- [68] P.L. Anderson, J. Lamba, C.L. Aquilante, E. Schuetz, C.V. Fletcher, Pharmacogenetic characteristics of indinavir, zidovudine, and lamivudine therapy in HIV-infected adults: a pilot study, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 42 (2006) 441–449, <https://doi.org/10.1097/01.qai.0000225013.53568.69>.
- [69] L.-C. Gao, D. Wang, F.-Q. Liu, Z.-Y. Huang, H.-G. Huang, G.-H. Wang, et al., Influence of PTGS1, PTGFR, and MRP4 genetic variants on intraocular pressure response to latanoprost in Chinese primary open-angle glaucoma patients, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 71 (2015) 43–50, <https://doi.org/10.1007/s00228-014-1769-8>.
- [70] M. Banerjee, V. Marensi, G. Conseil, X.C. Le, Susan P.C. Cole, E.M. Leslie, Polymorphic variants of MRP4/ABCC4 differentially modulate the transport of methylated arsenic metabolites and physiological organic anions, *Biochem. Pharmacol.* 120 (2016) 72–82, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.016>.
- [71] P. Nicoletti, V.M. Cartos, P.K. Palaska, Y. Shen, A. Floratos, A.I. Zavras, Genomewide pharmacogenetics of bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: the role of RBMS3, *Oncologist* 17 (2012) 279–287, <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0202>.
- [72] J.-Y. Han, Y.-S. Lee, E.S. Shin, J.-A. Hwang, S. Nam, S.-H. Hong, et al., A genome-wide association study of survival in small-cell lung cancer patients treated with irinotecan plus cisplatin chemotherapy, *Pharmacogenomics* 14 (2014) 20–27, <https://doi.org/10.1038/tj.2013.7>.
- [73] S. de Denuis, J.L. Rouleau, D.L. Mann, G.S. Huggins, T.P. Cappola, S.H. Shah, et al., A pharmacogenetic investigation of intravenous furosemide in decompensated heart failure: a meta-analysis of three clinical trials, *Pharmacogenomics* 17 (2017) 192–200, <https://doi.org/10.1038/tj.2016.4>.
- [74] H. Ban, A. Andoh, H. Imaeda, A. Kobori, S. Bamba, T. Tsujikawa, et al., The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease, *J. Gastroenterol.* 45 (2010) 1014–1021, <https://doi.org/10.1007/s00535-010-0248-y>.
- [75] M.A.H. den Hoed, E. Lopez-Lopez, M.L. te Winkel, W. Tissing, J.D.E. de Rooij, A. Gutierrez-Camino, et al., Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia, *Pharmacogenomics* 15 (2015) 248–254, <https://doi.org/10.1038/tj.2014.63>.
- [76] E. Lopez-Lopez, J. Ballesteros, M.A. Piñan, J. Sanchez de Toledo, N. Garcia de Andoin, P. Garcia-Miguel, et al., Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia, *Pharmacogenet. Genomics* 23 (2013) 53–61, <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835c3b24>.
- [77] S. Angelini, M.A. Pantaleo, G. Ravagnini, C. Zenesini, G. Cavrini, M. Nannini, et al., Polymorphisms in OCTN1 and OCTN2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy, *Pharmacol. Res.* 68 (2013) 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.015>.
- [78] S.-K. Low, K. Kiyotani, T. Mushiroya, Y. Daigo, Y. Nakamura, H. Zembutsu, Association study of genetic polymorphism in ABCC4 with cyclophosphamide-induced adverse drug reactions in breast cancer patients, *J. Hum. Genet.* 54 (2009) 564–571, <https://doi.org/10.1038/jhg.2009.79>.
- [79] M. Whirl-Carrillo, E.M. McDonagh, J.M. Hebert, L. Gong, K. Sangkuhl, C.F. Thorn, et al., Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 92 (2012) 414–417, <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.96>.

Partie II. Méthodes d'études des transporteurs

Les protéines membranaires assurant le transport de xénobiotiques sont exprimées dans de nombreux tissus du corps humain ou animal, avec des spécificités variables. La compréhension du rôle des transporteurs est donc très importante pour appréhender la pharmacocinétique, la pharmacodynamie et les mécanismes de toxicité ou d'interaction médicamenteuse. Après avoir été longtemps négligée, l'étude de l'interaction entre un médicament et un transporteur est aujourd'hui une étape essentielle dans le développement des médicaments. Elle doit reposer sur l'utilisation de méthodes appropriées. Ces dernières années, de nombreuses approches *in vitro*, *in situ* / *ex vivo* et *in vivo* ou encore *in silico* ont été proposées pour étudier les interactions entre transporteurs membranaires et médicaments.

Les principaux types de modèles *in vitro* utilisés pour les études de transport de médicaments sont représentés par :

- Des modèles utilisant un support membranaire (ex. vésicule permettant une mesure de l'activité ATPase) ;
- Et/ou par des modèles cellulaires (lignées primaires, immortalisées et lignées cellulaires transfectées avec des transporteurs uniques ou des transporteurs multiples). Les cellules peuvent être cultivées de façon traditionnelle, en monocouche sur un support particulier (ex. caco-2) ou en sandwich (ex des hépatocytes).

Les modèles *in situ* / *ex vivo* peuvent correspondre à des organes, ou des tissus isolés et perfusés (par exemple, intestin, poumon, foie, cerveau perfusé *in situ* ou rein isolés et perfusés).

Les modèles *in vivo* sont généralement des modèles animaux éventuellement mutants, ou humanisés.

II.1. Tests basés sur les membranes cellulaires

Les membranes peuvent être préparées à partir de n'importe quel type de cellules ou de tissu et permettent d'étudier les interactions entre les médicaments et les transporteurs. Il existe un certain nombre de protocoles qui fournissent des préparations de membranes de différentes puretés, avec des caractéristiques physiques différentes.

Il est également important de connaître les avantages et les inconvénients des membranes provenant de différentes sources.

II.1.1. Isolation des membranes

Les travaux précoces et révolutionnaires de Steck et Kant ont donné à la recherche les outils permettant de réaliser des préparations de membranes formant des vésicules à orientation membranaire inversée (inside-out) (**Figure 5**) [152,153]. Cette méthode de préparation est basée, d'une part, sur l'utilisation de tampons phosphate alcalins ayant une faible force ionique permettant la formation de vésicules, et d'autre part, sur l'utilisation d'ions divalents ($MgSO_4$) permettant de stabiliser les vésicules en orientation inside-out. Cette technique reste la méthode la plus utilisée pour préparer les membranes des cellules et des tissus pour les études sur les transporteurs ABC.

Récemment, la méthode de cavitation par l'azote a été également utilisée. Cette autre méthode de vésiculation s'effectue en une étape et fonctionne avec des tampons non hypotoniques. Elle donne cependant un nombre comparable de vésicules en orientations inside-out et right side-out [154,155]. Après plusieurs centrifugations, le culot contenant ces préparations membranaires peut être remis en suspension dans un tampon hypotonique [156] ou isotonique [157], puis stocké à $-80^{\circ}C$ ou dans l'azote liquide.

Les fragments de membrane générés par l'une ou l'autre de ces méthodes puis recueillis par ultracentrifugation sont souvent désignés comme des préparations membranaires « partiellement purifiées » ou « brutes ». La plupart des chercheurs utilisent des préparations membranaires « brutes » pour étudier les interactions entre les médicaments et les transporteurs ABC. Les préparations disponibles dans le commerce sont également des membranes « brutes ».

Les tests de mesure de l'activité de l'ATPase sont réalisés en utilisant des membranes en suspension uniquement dans des tampons hypotoniques [156,158], tandis que les tests de transport vésiculaire peuvent être réalisés à la fois dans des tampons hypotoniques [159] et isotoniques [157]. Les préparations membranaires « brutes » contiennent trois types de particules membranaires : des lamelles, des vésicules inside-out et des vésicules right-side-out (**Figure 5**). Ces fragments de membrane proviennent de la membrane plasmique ou, dans une moindre mesure, des membranes intra-cellulaires [160]. Bien que les transporteurs ABC isolés à partir des membranes intra-cellulaires ne soient pas entièrement glycosylés, il a été démontré dans plusieurs études que la glycosylation ne module pas les caractéristiques biochimiques de ces transporteurs [161,162].

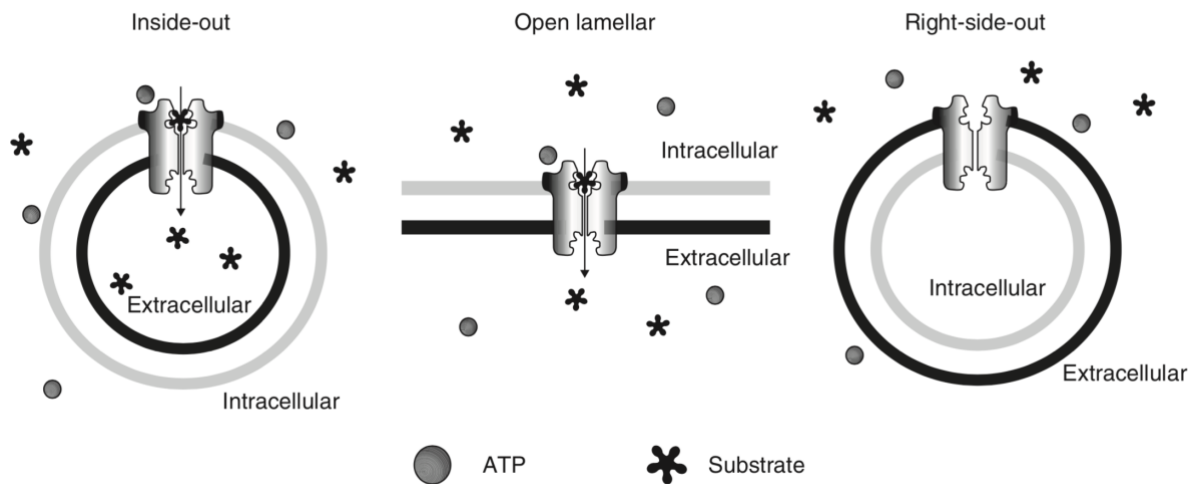


Figure 5 : Orientation des membranes dans une préparation membranaire partiellement purifiée (brute) la plus fréquemment utilisée dans la recherche sur les transporteurs ABC

Certaines des membranes forment des vésicules inside-out ou right-side-out, tandis que d'autres sont en configuration lamellaire ouverte (Open lamellar). D'autres étapes de purification peuvent être utilisées (par exemple, la centrifugation avec gradient de saccharose) pour diminuer la quantité de fragments de membranes lamellaires ouvertes et enrichir les vésicules en inside-out.

Source : Glavinas *et al* [163]

Il est important de noter que les transporteurs localisés dans des fragments de membrane ayant des orientations différentes ne participent pas tous à la fonctionnalité des essais biochimiques (test de l'ATPase et transport vésiculaire). Par exemple, dans le test de l'ATPase, les lamelles et les vésicules inside-out contribuent à l'activité du test. Ce n'est pas le cas des vésicules right-side-out car le domaine de liaison de l'ATP des transporteurs est situé à l'intérieur de la vésicule (domaine intra-cellulaire). Dans les expériences de transport vésiculaire, seule l'activité des transporteurs dans les vésicules de type inside-out est détectée. Les préparations membranaires peuvent être purifiées davantage pour diminuer la teneur en conformation lamelles et ainsi augmenter le ratio vésicules inside-out / vésicules right-side-out. Ceci est généralement réalisé par ultracentrifugation en présence d'un gradient de saccharose [160]. La concavoline A, qui se lie uniquement aux domaines extra-cellulaires glycosylés des protéines (D-mannose et au D-glucose), a également été utilisée afin de limiter la teneur en conformation lamelles et right-side-out des préparations membranaires « brutes » [164,165]. Bien que ces préparations soient d'une pureté supérieure, elles n'offrent généralement pas de performances significativement meilleures (rapport signal/ bruit de fond) dans les tests de mesure de l'activité l'ATPase ou dans le transport vésiculaire. Ceci explique pourquoi l'utilisation de membranes « brutes » est plus répandue.

II.1.2. Mesure de l'activité ATPase

Les transporteurs ABC utilisent l'ATP comme source d'énergie pour véhiculer les substrats à travers les membranes cellulaires. Le test ATPase nécessite d'incuber des membranes contenant le transporteur avec les substrats à tester. La mesure de l'activité de l'ATPase est basée sur le principe que les composés interagissent avec le transporteur et modulent l'activité de l'ATPase de ce dernier. L'activité ATPase peut ainsi être mesurée en fonction de la quantité de phosphate inorganique libérée par l'enzyme en présence du substrat [156]. (**Figure 6**). Ce test est couramment utilisé pour l'étude des transporteurs ABC tels que la P-gp ou BCRP, mais il est également disponible pour les différents transporteurs de la famille MRP [166–168]. Il est généralement admis que l'hydrolyse de l'ATP est étroitement liée à la translocation du substrat [169]. Ainsi, des mutations dans le domaine de l'ATPase entraînent une perte de la fonction de transport [170]. Par ailleurs, l'activité des transporteurs ABC dans les cellules résistantes aux médicaments est associée à un appauvrissement cellulaire rapide de l'ATP lorsque la synthèse de l'ATP est inhibée [171].

Lors de la mesure de l'activité de l'ATPase, la plupart des substrats testés à des concentrations croissantes montrent une courbe en forme de cloche mettant en évidence un phénomène particulier : pour des concentrations faibles en substrat, l'activité de l'ATPase augmente proportionnellement à cette concentration ; à partir d'un certain niveau de concentrations plus élevées, l'activité ATPase diminue.

L'hypothèse admise pour ce phénomène est l'existence de deux sites de liaison distincts pour la molécule substrat sur le transporteur : un site de haute affinité (site d'activation/transport, localisé dans les domaines cytoplasmique ou transmembranaire) et un second site, de faible affinité, inhibiteur, probablement localisé dans les domaines extra-cellulaires, souvent appelé "site de relargage" [172–174]. L'affinité relative pour les deux sites de liaison est différente en fonction des substrats, ce qui se traduit par des courbes d'ATPase différentes. Si les affinités des deux sites de liaison sont très différentes (affinité du site inhibiteur inférieur à l'affinité du site activateur), on observe alors des courbes de type Michaelis-Menten (**Figure 7A**) caractéristiques d'un transport saturable. Si les affinités de liaison sont proches l'une de l'autre, la courbe observée est alors en forme de cloche (**Figure 7B**). Pour ne pas méconnaître d'interactions, il est donc important d'effectuer ce test avec des concentrations multiples, situées dans une large gamme de concentration en substrat. D'autre part, cette courbe en forme de cloche peut également résulter d'une interférence du substrat avec la réaction colorée (lors du relargage de phosphate inorganique après hydrolyse de l'ATP) pour des concentrations élevées du composé à tester [175]. Il faut prendre aussi en compte le fait que certains composés sont transportés très lentement par le transporteur ce

qui entraîne un taux d'hydrolyse de l'ATP tellement lent qu'il ne génère pas une quantité suffisamment détectable de phosphate inorganique.

Un exemple typique de telles interactions est le transport de la ciclosporine par la P-gp. Bien qu'il ait été démontré que la ciclosporine est transportée par la P-gp [176], aucune stimulation de l'activité ATPase du transporteur ne peut être détectée dans le test de mesure l'ATPase (activation).

Pour réduire le nombre de faux négatifs, des expériences d'inhibition de l'activité de l'ATPase doivent être également effectuées. Dans ce cas, on s'intéresse à la modulation de l'activité ATPase d'un substrat transporté rapidement (fort taux d'hydrolyse de l'ATP). Les composés transportés lentement (faible taux d'hydrolyse de l'ATP) entreront en concurrence avec les substrats transportés rapidement, inhibant ainsi l'activité de l'ATPase du transporteur. Ce test ne fera pas la distinction entre les substrats transportés lentement et les inhibiteurs (par exemple, la ciclosporine A et le GF120918, respectivement : **Figure 7 C, D**). Cependant, il indiquera qu'une interaction existe pour les substrats transportés lentement n'ayant pas été détectés lors des tests d'activation de l'ATPase.

Ainsi, les modèles reposant sur une mesure de l'activité de l'ATPase sont parmi ceux les plus utilisés dans l'industrie pharmaceutique. Il s'agit d'un test simple et reproductible qui détecte la plupart des interactions transporteur-médicament lorsqu'il est effectué à la fois en mode d'activation et d'inhibition. L'utilisation de ce type d'expérimentation est à considérer comme une première approche dans l'identification de modulateurs des transporteurs ; les résultats obtenus doivent néanmoins être confirmés par une autre approche.

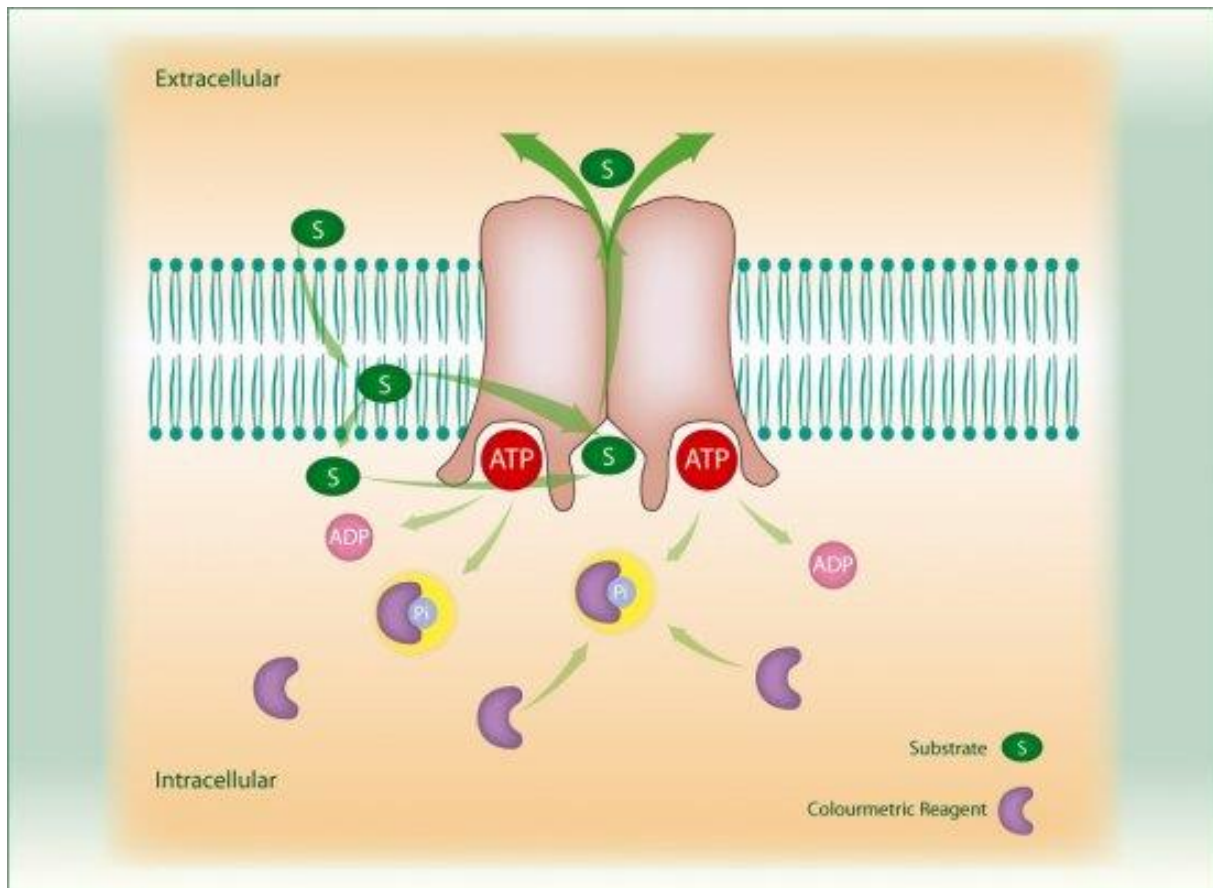


Figure 6 : Principe du fonctionnement des tests de mesure de l'activité ATPase

Source : SOLVO Biotechnology (www.solvobiotech.com)

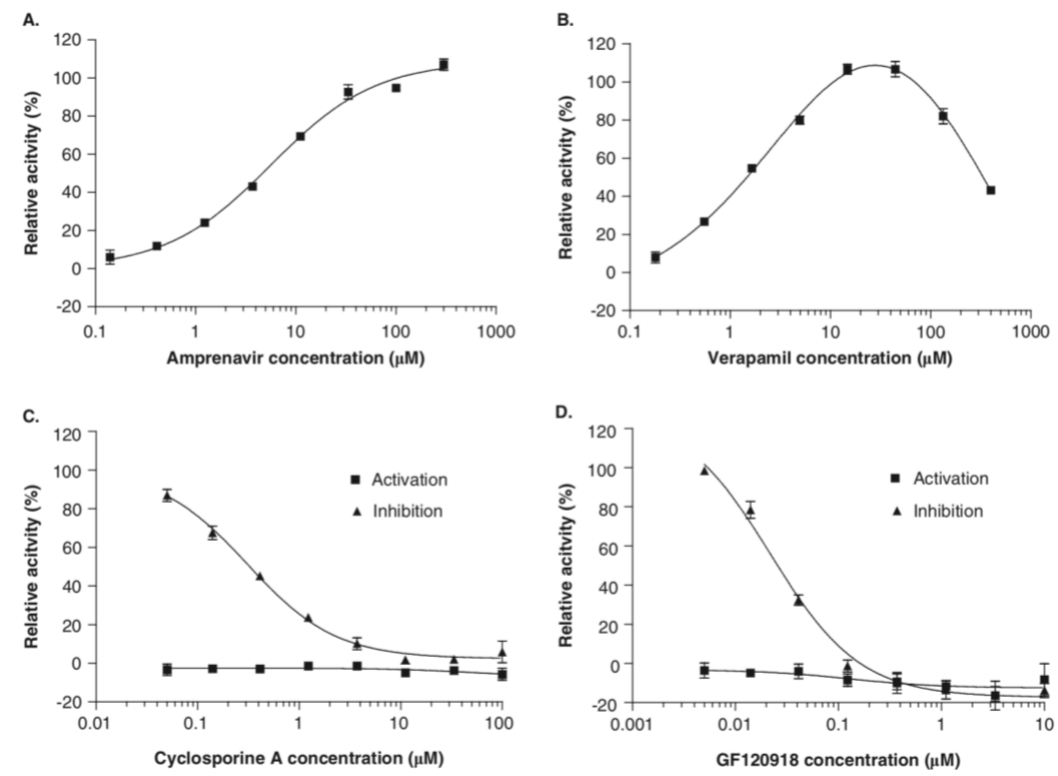


Figure 7 : Exemple de type de courbes obtenues lors de test de mesure de l'activité ATPase

Certains substrats des transporteurs ABC stimulent l'activité ATPase suivant une courbe de Michaelis-Menten (**A**). D'autres substrats stimulent l'activité de l'ATPase à des concentrations faibles mais agissent comme des inhibiteurs à des concentrations plus élevées, ce qui donne une courbe en forme de cloche (**B**). L'inhibition à des concentrations plus élevées est due à un site de liaison secondaire de moindre affinité dans la partie extra-cellulaire du transporteur. Les composés et les inhibiteurs transportés lentement ne stimulent pas l'activité ATPase mais inhibent l'activité ATPase mesurée en présence d'un substrat fort (rapidement transporté). Ces deux types d'interactions (**C**, **D**) ne peuvent pas être distingués à l'aide des tests de l'ATPase.

Source : Glavinas *et al* [163]

II.1.3. Transport vésiculaire

Historiquement, le test de transport vésiculaire a été le premier type de tests membranaires inventés pour détecter la translocation directe des molécules par les transporteurs ABC. Les membranes, quand elles sont préparées dans des conditions appropriées [152], contiennent des vésicules orientées de l'intérieur vers l'extérieur (inside-out), c'est-à-dire que le site de liaison de l'ATP et le site de liaison du substrat du transporteur font face à l'extérieur de la vésicule (**Figure 8**).

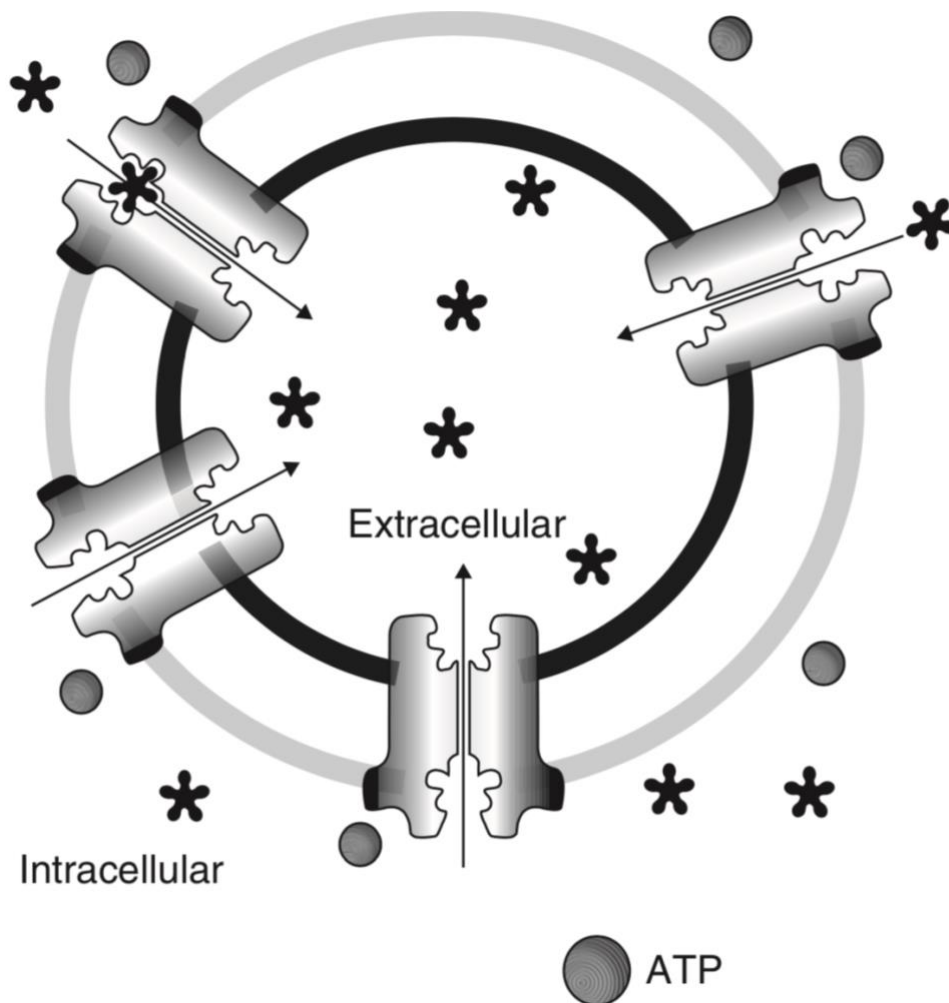


Figure 8 : Représentation schématique du principe du transport vésiculaire

Source : Glavinas *et al* [163]

Les substrats du transporteur ABC vont pénétrer dans les vésicules en présence d'ATP. Ensuite une étape de filtration rapide utilisant des filtres en fibre de verre ou des membranes de nitrocellulose est nécessaire pour séparer les vésicules de la solution d'incubation (contenant le substrat en excès). Le substrat test est alors piégé à l'intérieur des vésicules retenues sur le filtre [177]. Après plusieurs lavages des filtres, suivi d'une lyse des vésicules, la quantité de molécules transportées peut être déterminée à l'aide de méthodes chromatographiques couplées à une détection en photométrie ou spectrométrie de masse. Pour les composés radiomarqués ou fluorescents, la quantité de substrats transportés dans les vésicules s'effectue par mesure de la radioactivité ou de la fluorescence retenue sur le filtre.

Les études de transport vésiculaire peuvent être réalisées en utilisant divers types de membranes issues de cellules transfectées d'insectes [177,178], de lignées de cellules de mammifères ou de vésicules membranaires artificielles [179]. Ce type d'essai a l'avantage de mesurer le transport réel du substrat à travers la membrane cellulaire, qui est ATP-dépendant. Son inconvénient est que les composés ayant une perméation passive moyenne voire élevée ne sont pas retenus à l'intérieur des vésicules, ce qui rend difficile la mesure directe du transport.

Des études utilisant des vésicules surexprimant le transporteur MRP2 ont montré comment les mesures directes du transport vésiculaire permettent l'analyse détaillée du transport. Ce transporteur est situé au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes et est responsable du transport de molécules glucurono-conjuguées et conjuguées au glutathion dans la bile. Ces métabolites de phase II sont des composés très peu perméables et conviennent donc aux études sur le transport vésiculaire. Cependant, d'autres molécules glucurono-conjuguées sont également étudiées de manière plus approfondie en tant que substrats test, car les conjugués glucuronides de la bilirubine ne sont généralement pas disponibles dans le commerce. Les études de transport vésiculaire utilisant l'E₂17βG (estradiol 17β-D-glucuronide) comme substrat ont permis d'identifier deux sites de liaison coopératifs sur le transporteur MRP2. Plus intéressant encore, l'ajout à de faibles concentrations de certains substrats et modulateurs n'étant pas substrats ont montré une stimulation plutôt qu'une inhibition du transport de E₂17βG. Il a été suggéré que le transporteur MRP2 comporte deux sites, l'un étant le site de transport et l'autre, le site modulateur [159,180].

Le test de transport vésiculaire peut également être réalisé de manière "indirecte" ; les médicaments que l'on teste interagissent et modulent le transport d'un composé substrat de référence [157]. Un exemple typique d'essai de transport indirect est la détection de l'inhibition du transport de taurocholate par le transporteur BSEP (Bile Salt Export Pump). Tout comme le transporteur MRP2, BSEP est localisé au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes et est responsable du transport des conjugués de cholates dans la bile [181]. Les déficits génétiques de ce transporteur sont liés à la cholestase familiale progressive [182], un trouble grave entraînant des lésions hépatiques dues à la cholestase causée par un mauvais transport des conjugués de cholate des cellules du foie vers la bile. Il a été proposé que l'inhibition de la fonction du transporteur BSEP par des médicaments pourrait conduire à des conditions similaires [157].

Ainsi, afin de prédire le potentiel cholestatique d'un composé, des tests d'inhibition du transport du taurocholate peuvent être facilement appliqués en utilisant le test de transport vésiculaire indirect.

Ce type d'essai indirect est donc particulièrement adapté à la détection d'éventuelles interactions entre médicaments, et entre médicaments et substrats endogènes. En revanche, il ne permet pas de s'affranchir de la perméation passive des composés à étudier. Il peut détecter donc tout composé interagissant, et empêcher de savoir si le composé testé est un inhibiteur ou un substrat du transporteur.

II.2. Tests basés sur les cellules

L'utilisation de lignées cellulaires immortalisées ou de cellules primaires isolées présente de nombreux avantages, notamment une architecture cellulaire intacte, une membrane fonctionnelle, des éléments cytoplasmiques et des ions co-transporteurs, qui pourraient donner des résultats plus aboutis dans la caractérisation des fonctions de transport.

Toutefois, ces lignées cellulaires immortalisées et ces cellules primaires manquent souvent d'expression de certaines protéines de transport particulières. Les tests de transport sont généralement effectués en utilisant des lignées cellulaires stables ou des lignées cellulaires recombinantes exprimant le ou les transporteur(s) à étudier [183,184]. Les lignées cellulaires telles que MDCKII, LLC-PK1, CHO, HEK293, et les cellules HeLa sont couramment utilisées.

II.2.1. Transport direct

Les essais de transport direct nécessitent des cellules immortalisées, primaires ou bien des lignées cellulaires transfectées par un transporteur. Ces cellules doivent former une monocouche avec des jonctions étroites et avoir une localisation polarisée du transporteur (basal-apical). Les caractéristiques du transport des composés (transport passif ou transport actif) s'effectuent par l'analyse du transport bidirectionnel de ces composés à travers la monocouche. Les cellules sont cultivées sur une membrane perméable (système trans-well®) jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence et la pleine différenciation. Ensuite, la polarisation des cellules définit le compartiment liquide apical et baso-latéral, qui sont directement en contact avec le domaine membranaire respectif des cellules (**Figure 9**). Le transfert d'un médicament entre les deux compartiments est une somme de diffusion, de perméabilité passive et d'interactions avec le transporteur exprimé dans la membrane des cellules (transport actif).

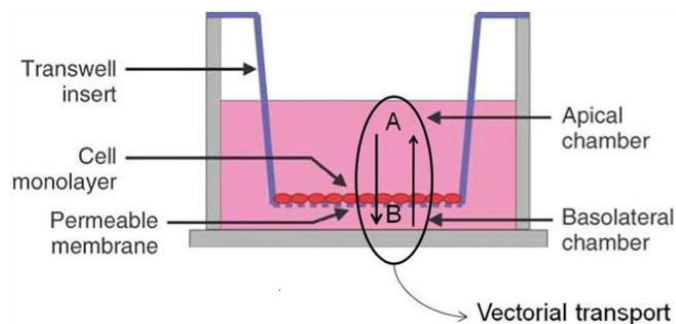


Figure 9 : Schéma du système de culture cellulaire sur système trans-well ®

Les cellules sont cultivées sur une membrane perméable permettant la différenciation des cellules en pôle basal (B) et apical (A). Les composés à tester sont préparés dans du milieu de culture et ajoutés dans les chambres apicale ou baso-latérale. Après incubation à 37°C pendant un temps défini, des aliquots sont prélevés dans les chambres apicale (A) et basale (B) afin de déterminer le sens du transport

Source : <https://brunswicklabs.com>

Les expériences de transport direct sont les suivantes : premièrement, les cellules sontensemencées sur la membrane perméable pour former une monocouche ; deuxièmement, l'étanchéité de la monocouche cellulaire doit être validée en mesurant la résistance transépithéliale de la monocouche (TEER) ; troisièmement, la vitesse de transport du médicament dans les directions apicale à baso-latérale (A-B) et baso-latérale à apicale (B-A) est estimée à partir de la quantité de médicament présente dans les différents compartiments en fin d'expérimentation. La perméabilité apparente (P_{app}) peut être calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \times A \times C_0}$$

où ΔQ est la quantité de médicament transportée pendant le changement de temps (Δt), A est la surface de la membrane, et C_0 est la concentration initiale du médicament dans le compartiment.

Le rapport d'efflux (ER) entre les perméabilités apparentes baso-latérale vers apicale ($P_{app, B-A}$) et apicale vers baso-latérale ($P_{app, A-B}$) est également estimé :

$$ER = \frac{P_{app, B-A}}{P_{app, A-B}}$$

Si ER est supérieur à 1, le médicament est transporté du sens basal vers apical.

Si ER est inférieur à 1, le médicament est transporté du sens apical vers basal.

II.2.2. Test d'influx

Les études utilisant un modèle cellulaire *in vitro* sont importantes pour caractériser les mécanismes d'absorption ou de distribution tissulaire d'un médicament, et son interaction potentielle avec des transporteurs. Les paramètres cinétiques du transport (K_m , V_{max} et IC_{50}) sont généralement déterminés par l'expérimentateur. Les transporteurs d'influx sont rattachés à la superfamille SLC, dans laquelle on retrouve les transporteurs d'acides aminés de type L (LAT), les transporteurs de peptides (PEPT), les co-transporteurs de sodium-glucose (SGLT), les transporteurs de glucose (GLUT), les transporteurs de monocarboxylates (MCT), les polypeptides de transport d'anions organiques (OATP), les transporteurs d'anions organiques (OAT) et les transporteurs de cations organiques (OCT).

Il est possible d'identifier directement si un médicament est substrat ou inhibiteur d'un transporteur en mesurant l'influx du médicament dans les cellules. Pour la caractérisation des substrats, ces essais sont souvent réalisés en utilisant des lignées cellulaires surexprimant les gènes des transporteurs en comparaison avec des lignées cellulaires de type sauvage. L'affinité du médicament pour le transporteur d'influx peut être évaluée en mesurant la quantité présente dans les cellules après un certain temps d'incubation. Dans la plupart des cas, un inhibiteur spécifique du transporteur est utilisé pour confirmer la spécificité du substrat vis-à-vis du transporteur à étudier [185]. Un composé fluorescent ou radiomarqué peut également être utilisé comme substrat, permettant de suivre les quantités de substrat dans les cellules sans avoir à les lyser. Le test d'influx peut aussi être un test à haut débit pour le criblage des inhibiteurs de transporteurs [186].

II.2.3. Test d'efflux

Les tests d'efflux sont également adaptés à l'identification des composés qui interfèrent avec les transporteurs d'efflux. Ces essais peuvent être réalisés en utilisant des suspensions cellulaires ou des cellules adhérentes. Les transporteurs d'efflux de médicaments sont principalement des transporteurs ABC tels que la P-gp, les MRPs, BCRP et BSEP. Les cellules sont pré-incubées avec le composé d'intérêt. Ensuite, la quantité résiduelle de substrat dans les cellules est mesurée après incubation avec des inhibiteurs. En général, les inhibiteurs du transporteur d'efflux diminuent l'efflux du substrat, ce qui entraîne une accumulation intracellulaire de substrat plus importante que dans les cellules témoins (sans inhibiteurs). A l'inverse, les inducteurs ou activateurs de transporteurs d'efflux augmentent l'efflux des substrats. Ainsi, la méthode est souvent utilisée pour caractériser les inhibiteurs, les inducteurs ou les activateurs d'efflux [187].

II.2.4. Exemples de modèles cellulaires d'étude du transporteur MRP4

De nombreux modèles cellulaires ont été utilisés pour l'étude du transporteur MRP4. Ces modèles ont généralement été obtenus par surexpression génique du transporteur (transfection). Par exemple, des cellules de type MDCKII triple transfectées OATP1B1/MRP2/MRP4 et OATP1B1/MRP2/MRP3 ont été générés afin de modéliser le transport hépatique du E217 β -glucuronide, gemfibrozil-Glucuronide, et du troglitazone-glucuronide selon la méthode de transport direct (trans-well ®) [188]. Les résultats de cette étude *in vitro* ont montré que la surexpression des OATP1B2 et de MRP2 augmente le transport basal vers apical de ces substrats. Cependant, le transport basal vers apical du E217 β -glucuronide et du gemfibrozil-glucuronide était plus faible pour les cellules OATP1B1/MRP2/MRP4 triple transfectées par rapport à des cellules OATP1B1/MRP2 double transfectées. Ce modèle peut ainsi s'avérer utile lorsque l'on s'intéresse aux mécanismes de transport de composés du sang vers les hépatocytes. En effet les transporteurs OATP1B1 présents au niveau basal des hépatocytes permettent l'entrée des composés alors que les transporteurs MRP3 et MRP4 permettent la sortie vers le sang de ces composés. Le transporteur MRP2 présent au niveau des canalicules biliaires permet d'éliminer vers la bile les composés présents dans les hépatocytes.

Des modèles basés sur des cellules HEK 293 surexprimant MRP4 sont également couramment utilisés. Une étude *in vitro* s'est intéressée à la découverte de potentiels inhibiteurs de MRP4 pouvant inhiber l'efflux de la 6-mercaptopurine ainsi que la viabilité cellulaire [189]. Les auteurs ont également testé, en parallèle des inhibiteurs connus de MRP4 tels que le MK571, diclofénac, indométhacine, sildénafil, probénécide ou le dipyridamole. Sur les 39 composés testés, un seul composé était lié à une forte accumulation intracellulaire de la 6-mercaptopurine accompagnée d'une diminution de la viabilité des cellules. En termes d'inhibition, ce composé présentait une activité similaire au MK571. De plus les études de la relation structure-activité montrent que la plupart des inhibiteurs connus de MRP4 ont un groupement acide carboxylique, le composé identifié en était dépourvu. Ainsi cette étude relève l'existence de nouveaux inhibiteurs en se basant sur leur structure chimique.

II.3. Modèles d'études *in situ* / *ex vivo*

Les modèles *in situ* / *ex vivo*, tels que les modèles d'intestin, de poumon, de foie, de cerveau ou de rein isolés et perfusés, sont souvent utilisés pour étudier le transport des médicaments. Par rapport aux essais *in vitro*, ces modèles offrent un environnement plus physiologique pour la détermination des fonctions de transport. Par rapport aux modèles *in vivo*, les modèles *in situ* / *ex vivo* n'ont pas la contrainte des effets d'autres organes pour l'élimination des médicaments et permettent donc de cibler des organes particuliers.

Les différents protocoles sont les suivants : l'organe est directement perfusé par un tampon physiologique tel que du sang artificiel, du plasma ou une solution saline via le principal vaisseau sanguin qui fournit le sang à l'organe. Ce tampon physiologique, contenant le médicament testé à une concentration particulière, est perfusé en continu à travers l'organe. Après un certain temps, la concentration du médicament ou des métabolites (dans l'organe, le perfusat et les liquides physiologiques) est déterminée [190–192].

A titre d'exemple, des foies de rats isolés et perfusés ont été utilisés afin d'étudier les effets de la rifampicine (inhibiteur de l'OATP2) et de la quinidine (inhibiteur de la P-gp) sur l'élimination hépatique de la digoxine. Les résultats ont montré que l'exposition à la digoxine dans le liquide de perfusion était significativement augmentée par la rifampicine et diminuée par la quinidine. En revanche, l'exposition au métabolite de la digoxine était augmentée par la quinidine et diminuée par la rifampicine. Ces résultats indiquent que la rifampicine limite l'absorption hépatique de la digoxine et réduit l'exposition hépatique de la digoxine au CYP3A en inhibant la fonction OATP2 baso-latérale, alors que la quinidine augmente l'exposition hépatique de la digoxine au CYP3A en inhibant la fonction P-gp canalair. Ceci démontre l'importance des transporteurs d'influx et d'efflux sur le métabolisme hépatique des médicaments [193].

Des études utilisant des reins de rats perfusés comme modèle ont également montré que la P-gp était responsable de l'élimination rénale de la digoxine [194].

II.4. Modèles d'études *in vivo*

Les modèles cités précédemment sont couramment utilisés pour évaluer le potentiel d'interaction avec les transporteurs d'influx et d'efflux et servent également à déterminer les paramètres pharmacocinétiques de base. Ces essais ont été utilisés avec succès pour identifier de nombreux substrats et inhibiteurs de transporteurs. Bien que les approches de modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK) ou les techniques d'extrapolation *in vitro* à *in vivo* (IVIVE) puissent également être utiles pour prédire les interactions médicamenteuses résultant de l'inhibition des transporteurs chez l'Homme [195], les données provenant des modèles *in vitro* ou *in situ* / *ex vivo* ne permettent pas à elles seules de prédire exactement les effets des transporteurs sur la pharmacocinétique et les interactions médicamenteuses potentielles.

Ces modèles *in vivo* sont nécessaires pour comprendre les différentes fonctions des transporteurs, mais aussi leurs rôles coordonnés avec d'autres processus dans divers organes *in vivo* dans le but d'assurer un meilleur lien avec la clinique. Dans le développement de médicaments, les données sur le substrat du transporteur provenant des études précliniques *in vivo* peuvent ainsi fournir des informations importantes pour comprendre la

pharmacocinétique, la distribution tissulaire, l'efficacité et la sécurité du médicament. Les modèles d'inactivation des gènes des transporteurs et les modèles animaux mutants naturels sont devenus des outils utiles pour comprendre le rôle des transporteurs dans la pharmacocinétique des médicaments.

Ainsi, avec le développement des technologies d'édition du génome (CRISPR-cas-9...), des modèles animaux ayant des gènes modifiés voire supprimés pour les transporteurs sont maintenant disponibles dans le commerce. En revanche, un nouveau type de modèle *in vivo* dit humanisé, portant le gène humain correspondant au transporteur à la place du gène animal (murin...), est de plus en plus populaire [196].

II.4.1. Modèles d'étude *in vivo* obtenus par inhibition pharmacologique de l'activité des transporteurs

Les modèles *in vivo* les plus couramment utilisés et les plus simples sont ceux dont l'inhibition de l'activité d'un transporteur est obtenue par l'utilisation d'une ou plusieurs molécule(s). Ces modèles fournissent des informations utiles sur les effets des transporteurs dans l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des médicaments.

Les animaux (généralement des souris ou des rats) sont traités avec un inhibiteur du transporteur afin d'en diminuer sa fonction (knockdown). Il est d'une importance capitale de sélectionner un inhibiteur spécifique du transporteur pour évaluer le rôle d'un transporteur en particulier. Il existe désormais des inhibiteurs sélectifs de synthèse disponibles, tels que le GF120918 (un inhibiteur de la P-gp et de BCRP), le LY335979 (un inhibiteur spécifique de la P-gp) et le Ko143 (un inhibiteur spécifique de BCRP).

Ainsi, deux inhibiteurs du transporteur BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) de structure différente, GF120918 et Ko143, ont montré *in vitro* une diminution de la résistance à l'étoposide médiée par la Bcrp1 dans des cellules surexprimant le transporteur. Cela signifie que l'inhibition de l'activité de Bcrp1 pourrait renforcer l'activité anti-tumorale de l'étoposide en augmentant son exposition. De plus, chez des souris de type sauvage (*in vivo*), le prétraitement avec le GF120918 a eu pour conséquences une forte augmentation (de quatre à cinq fois) des concentrations plasmatiques d'étoposide. L'administration du GF120918 à des souris déficientes pour le gène codant pour la P-gp n'a pas montré d'augmentation de l'absorption orale de l'étoposide, ce qui suggère que la P-gp intestinale a un effet plus important que le transporteur Bcrp1 sur l'absorption orale de l'étoposide [197].

Le [¹¹H]-vérapamil et la ciclosporine sont souvent et respectivement utilisés comme substrat et inhibiteur de la P-gp afin de prédire l'ampleur des interactions médicamenteuses en lien avec la P-gp au niveau de la barrière hémato-encéphalique humaine [198–200]. Une étude chez l'Homme montre que la ciclosporine a entraîné une augmentation du rapport entre

l'AUC cérébrale et l'AUC plasmatique du [11C]-vérapamil d'environ 88 % sans modifier le métabolisme du [11C]-vérapamil ou sa liaison aux protéines plasmatiques [199]. Une autre étude révèle des résultats plus spectaculaires chez l'animal : comme par exemple le rapport des concentrations cerveau/plasma du vérapamil a été multiplié par 24 après un traitement à la ciclosporine, chez le rat [201].

D'autres interactions médicamenteuses mettant en jeu la P-gp ont été mises en lumière chez les souris et les rats par inhibition pharmacologique de la P-gp avec des inhibiteurs sélectifs tels que PSC833, GF120918, et LY335979 [202,203].

II.4.2. Modèles d'étude *in vivo* chez l'animal présentant des mutations naturelles pour les transporteurs

Les animaux présentant des mutations dites naturelles sont en réalité des sous-populations ayant une mutation spontanée pour un gène codant pour un transporteur. Ces modèles sont couramment utilisés pour caractériser les fonctions d'un transporteur particulier et ainsi sa contribution à la pharmacocinétique des médicaments substrats.

Par exemple, une sous-population de souris CF-1, déficientes en P-gp au niveau de l'épithélium intestinal et de l'endothélium des capillaires cérébraux, présentent des sensibilités inhabituelles à l'ivermectine, à l'abamectine et à l'ivermectine. Cela se traduit par une neurotoxicité 100 fois plus élevée que chez d'autres espèces et souches de souris. De plus, les taux plasmatiques et tissulaires d'ivermectine chez les souris présentant un déficit de P-gp étaient nettement plus élevés que chez les souris insensibles, en particulier dans le cerveau [204].

D'autres modèles animaux ont été utilisés pour l'étude de la P-gp notamment le modèle canin du border collie [205]. En effet certains border collie présentent des effets indésirables tels que dépression et hypersalivation à la suite d'un traitement vermifuge par ivermectine. Chez ces animaux, une nouvelle mutation d'insertion du gène *ABCB1* a été détecté. Cette mutation, de type non-sens était responsable d'un arrêt prématuré de la synthèse de la P-gp. De plus, cette mutation n'a par ailleurs pas été observée chez des chiens d'autres races tel que les chiens Beagle. Ainsi ce modèle animal peut être utilisés afin d'étudier l'impact de l'absence de la P-gp sur la pharmacocinétique des médicaments.

Des mutations génétiques du gène *ABCC2* codant pour MRP2 ont été signalées à la fois chez des rats Wistar TR- mutants et des rats Sprague Dawley EHBR mutants. Ces derniers présentent une hyperbilirubinémie due à une altération de l'excrétion hépato-biliaire de la bilirubine conjuguée. L'EHBR est une souche de rats mutants présentant une hyperbilirubinémie congénitale à bilirubine conjuguée, issue d'un rat Sprague Dawley. Le transport de la bilirubine conjuguée, du vert d'indocyanine et de la tétra bromosulfophtaléine

du foie vers la bile est grandement altéré chez ces rats [206,207]. Les deux modèles animaux sont très utilisés pour étudier les mécanismes du système excréteur biliaire et de la formation de la bile.

II.4.3. Modèles d'étude *in vivo* obtenus par suppression de l'expression génique des transporteurs

Les modèles d'animaux précédemment évoqués présentent certaines limites telles que l'apparition de mécanismes compensatoires en l'absence de fonctionnement du transporteur. Les modèles animaux d'extinction d'un gène dit « KO » (knockout) sont extrêmement utilisés dans plusieurs domaines dès lors que l'on souhaite étudier l'impact de l'absence d'une protéine, ou mimer une maladie.

Avec le développement des technologies d'édition du génome, de nombreux modèles de souris knockout ont été utilisés pour les transporteurs de médicaments, telles que les souris Mdr1a^{-/-} [208] pour la P-gp, des souris Mrp1^{-/-}, Mrp2^{-/-}, Mrp3^{-/-}, Mrp4^{-/-} [209–212] pour les MRP et pour les transporteurs d'influx, des souris Oct1^{-/-}, Oct2^{-/-} et Oct1/2^{-/-} (double KO) [213,214]. Des modèles plus complexes de KO mixtes tels que des souris Mdr1a^{-/-} : Mar1b^{-/-} : Bcrp^{-/-}, des souris Mdr1a^{-/-} : Mar1b^{-/-} ou Mrp2^{-/-} : Bcrp1^{-/-} ou encore des souris Mrp2^{-/-} : Mrp3^{-/-} : Bcrp1^{-/-} ont également été générés. Heureusement, la plupart de ces modèles animaux sont maintenant disponibles dans le commerce auprès de sociétés spécialisées. Ils sont devenus des outils importants pour évaluer l'absorption des médicaments, la distribution tissulaire, la clairance hépato-biliaire et les interactions médicamenteuses.

De nombreuses études ont montré l'importance des transporteurs P-gp et/ou BCRP dans l'absorption, l'élimination et la distribution des substrats médicamenteux dans les tissus. Par exemple, des souris Mdr1a^{-/-} : Mdr1b^{-/-} ont montré une exposition plus élevée à l'ivermectine dans le plasma et le cerveau par rapport aux souris de type sauvage, après administration d'une dose orale. Ceci démontre le rôle de la P-gp dans l'absorption intestinale et la distribution de l'ivermectine dans le cerveau [215]. De même, chez les souris Bcrp1^{-/-}, il a été signalé que l'AUC de la sulfasalazine, un substrat de la BCRP, était environ 111 fois plus élevée que celle des souris de type sauvage après administration orale de 20 mg/kg de sulfasalazine. Après administration intra-veineuse de 5 mg/kg de sulfasalazine, l'AUC chez les souris Bcrp1^{-/-} était environ 13 fois plus élevée que celle des souris de type sauvage. De plus, le traitement des souris de type sauvage avec un inhibiteur connu de BCRP, le gefitinib a entraîné une augmentation de l'AUC de la sulfasalazine de 13 fois par rapport à celle des souris traitées avec un placebo [216].

L'agent cancérigène d'origine alimentaire appelé 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) est transporté par la BCRP, la P-gp et les MRP. Les effets de ces

transporteurs sur la pharmacocinétique du PhIP et de ses métabolites après administration orale ou intra-veineuse de PhIP (1 mg/kg) ont été étudiés en utilisant deux souches de souris (Bcrp1^{-/-} : Mdr1a/b^{-/-} : Mrp2^{-/-} et des souris Bcrp1^{-/-} : Mrp2^{-/-} : Mrp3^{-/-}) [217]. Les résultats ont montré que, par rapport aux souris de type sauvage, les taux de PhIP dans l'intestin grêle étaient réduits de quatre à six fois chez les souris Bcrp1^{-/-} : Mdr1a/b^{-/-} : Mrp2^{-/-} et Bcrp1^{-/-} : Mrp2^{-/-} : Mrp3^{-/-}. L'excrétion fécale de PhIP a été réduite de 8-20 fois. L'excrétion biliaire de PhIP a également été réduite de 41 fois chez les souris Bcrp1^{-/-} : Mdr1a/b^{-/-} : Mrp2^{-/-}. De plus, les métabolites cancérigènes N₂-OH-PhIP et PhIP-5-sulfate (un marqueur de génotoxicité) se sont accumulés dans le foie des souris Bcrp1^{-/-} : Mrp2^{-/-} : Mrp3^{-/-} mais pas chez les souris Bcrp1^{-/-} : Mdr1a/b^{-/-} : Mrp2^{-/-}. Ceci indique que MRP3 est impliqué dans la sécrétion hépatique de ces toxines. Les résultats démontrent que Bcrp1, P-gp, MRP2 et MRP3 affectent de manière significative la distribution tissulaire, ainsi que l'élimination biliaire et fécale de la PhIP et de ses métabolites cancérigènes, et par conséquent la cancérogenèse induite par la PhIP [217].

Concernant le transporteur MRP4 des études menées chez des souris déficientes pour le gène codant pour MRP4 (souris Mrp4^{-/-}) ont démontré le rôle du transporteur dans la protection du SNC aux anticancéreux notamment le topotécan [210]. En effet, il a été observé, chez ces souris, une forte accumulation de topotécan dans le tissu cérébral ainsi que le liquide céphalorachidien (LCR). Ces observations étaient en accord avec d'autres études selon lesquelles le topotécan était un substrat de MRP4 et que les cellules surexprimant MRP4 étaient résistantes à ses effets cytotoxiques. Cette étude *in vivo* a également permis de démontrer la présence du transporteur MRP4 au niveau de la membrane basolatérale de l'épithélium des plexus choroïdes et de la membrane apicale des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. En utilisant un modèle de souris Mrp4^{-/-} une autre équipe a montré que le PME A (un des substrat MRP4 de référence), s'accumulait plus fortement dans divers tissus tel que la moelle osseuse, la rate, le thymus, SNC ainsi que le tractus gastro-intestinal [218]. Cette accumulation avait pour conséquence une augmentation de la toxicité ainsi que de la létalité du PME A démontrant ainsi le rôle protecteur de MRP4.

II.4.4. Modèles d'étude *in vivo* présentant des transporteurs humanisés

Au cours du développement précoce des médicaments, il est très important de prévoir la pharmacocinétique chez l'Homme et d'évaluer le risque de d'interactions médicamenteuses à partir de données basées sur un modèle animal préclinique *in vivo* [219]. Cependant, les différences significatives entre l'animal et l'Homme en termes de spécificité de substrat, de distribution tissulaire et d'abondance relative des transporteurs limitent souvent la prédiction chez l'Homme [220,221]. Ainsi, le développement de modèles de souris humanisées permet de diminuer les différences significatives existant entre l'animal et l'Homme.

Il existe deux approches pour générer des modèles de souris humanisées : l'une consiste à introduire les gènes humains dans le génome de la souris pour générer des modèles de souris génétiquement humanisées ; l'autre consiste à transplanter des cellules humaines chez des receveurs compétents, ce qui donne des modèles de souris humanisées tissulaires (comme le foie). Ces modèles de souris présentant des transporteurs humanisés pourraient ainsi surmonter les limitations découlant des différences d'expression des transporteurs et des spécificités des substrats entre les espèces. Jusqu'à présent, une série de modèles de souris de transporteurs humanisés ont été décrits pour les transporteurs OATP1A2 (hOATP1A2), hOATP1B1 et hOATP1B3 [222–225], hP-gp [226], hMRP2 [227], hBCRP [228].

II.4.4.1. Exemple des OATP

Trois modèles de souris transgéniques ayant une expression spécifique et fonctionnelle des transporteurs OATP1B1, OATP1B3 et OATP1A2 humains ont été générés et utilisés pour étudier chez l'Homme, le rôle des OATP dans l'élimination du méthotrexate et du paclitaxel [224]. Les résultats ont montré que par rapport aux souris *Slco1a/1b^{-/-}*, les souris humanisées pour les OATP1B1, OATP1B3 et OATP1A2 avaient des niveaux plasmatiques en méthotrexate diminués, et une augmentation de méthotrexate et de 7-hydroxyméthotrexate dans le foie et l'intestin grêle. Les souris humanisées pour les OATP1B3 et OATP1A2, contrairement à celles qui l'étaient pour OATP1B1, accumulaient le paclitaxel au niveau du foie et de l'intestin grêle dans de plus grandes proportions par rapport aux souris *Slco1a/1b^{-/-}* [224]. Dans une autre étude utilisant ces mêmes modèles de souris, l'humanisation des souris pour les transporteurs OATP1B1 ou OATP1B3 et OATP1A2 a permis d'atténuer, chez des souris *Slco1a/1b^{-/-}*, les augmentations observées des taux plasmatiques de monoglucuronide de bilirubine et de diglucuronide de bilirubine [223].

Une autre étude s'est intéressée au rôle des OATP humains dans l'absorption hépatique de la pravastatine, de l'atorvastatine et de la simvastatine chez l'Homme. Des souris humanisées pour les transporteurs OATP1B1 ou OATP1B3 ont été également utilisées. Les résultats de cette étude ont montré que l'humanisation des transporteurs OATP1B1 ou l'OATP1B3 pouvait rétablir partiellement les altérations de la clairance, du volume de distribution et de la biodisponibilité observés chez des souris *Slco1a/1b^{-/-}* [229]. Ainsi, en analysant l'expression protéique différentielle des transporteurs au niveau du foie entre les souris humanisées et l'Homme, la part de l'OATP1B1 humaine contribuant à la clairance systémique par voie orale de la pravastatine, l'atorvastatine et la simvastatine étaient respectivement estimées à 0,50, 0,46 et 0,85, selon la formule suivante :

$$\text{OATP1B1 oral clearance fraction} = 1 - \frac{1}{\left[\left(\frac{\text{OATP1A1b KO AUC}_{po}}{\text{OATP1B1 KI AUC}_{po}} - 1 \right) \times \text{REF} \right] + 1}$$

avec $oatp1a/1b$ Ko AUC_{po} représentant l'aire sous la courbe des médicaments chez l'animal KO pour OATP1A1/1B1 ; OATP1B1Ki AUC_{po} représentant l'aire sous la courbe des médicaments chez l'animal knockin (Ki) pour OATP1B1 ; REF représente l'expression relative du transporteur entre l'Homme et l'animal.

De plus, la part de l'absorption hépatique médiée par l'OATP1B1 humain était estimée à 0,77 pour la pravastatine et à 0,31 pour l'atorvastatine ; soit 1,5 fois moins que les estimations basées sur la pharmacocinétique humaine [229]. Cependant, une autre étude a montré que ni l'OATP1B3 ni l'OATP1A2 humanisé ne modifient de manière significative les concentrations hépatiques ou plasmatiques de rosuvastatine et de pitavastatine chez les souris *Slco1a/1b*^{-/-}. Par conséquent, des études supplémentaires sont nécessaires afin de définir l'utilisation potentielle et les limites du modèle de souris humanisées dans l'élimination des médicaments et les interactions médicamenteuses à prévoir chez l'Homme [225].

II.4.4.2. Exemple du transporteur BCRP

Le transporteur BCRP est exprimé dans divers tissus, tels que l'intestin, le foie, les reins et le cerveau, et joue un rôle dans la limitation de l'absorption intestinale et de la pénétration cérébrale de ses composés substrats. Une souris transgénique BCRP humanisée a été générée et largement caractérisée en utilisant plusieurs substrats de BCRP dont la sulfasalazine, la daidzéine, la génistéine, la rosuvastatine et le topotécan [228]. Les résultats de cette étude ont montré qu'à la suite d'une administration intra-veineuse ou orale de sulfasalazine, l'exposition sanguine à la sulfasalazine chez les souris *Bcrp1*^{-/-} était significativement multipliée par 8,3 (intra-veineuse) ou 117 (orale) par rapport aux souris de type sauvage. L'exposition à la sulfasalazine chez les souris transgéniques BCRP humanisées se situait entre celles observées chez les souris de type sauvage et les souris *Bcrp1*^{-/-}. La co-administration d'un inhibiteur spécifique de la BCRP (Ko143) augmentait de façon substantielle les concentrations sanguines, l'AUC et la C_{max} de la sulfasalazine chez les souris de type sauvage et les souris transgéniques BCRP humanisées, mais pas chez les souris *Bcrp1*^{-/-}.

II.4.5. Limites des modèles animaux

Le knockout génétique des transporteurs, les modèles animaux présentant une mutation spontanée et les modèles animaux humanisés ont été largement utilisés pour comprendre l'implication des transporteurs dans la pharmacocinétique et dans les interactions médicamenteuses. Cependant, il est important de savoir si le médicament a un comportement similaire en termes de pharmacocinétique et en particulier sur les voies de transport chez l'Homme et l'espèce knock-out/humanisée. Les différences entre les espèces doivent être prises en considération. Des différences, entre les rongeurs et l'humain peuvent exister au

niveau de la localisation, de l'expression, de l'affinité et de la sensibilité aux inhibiteurs des transporteurs. L'autre considération générale dans l'utilisation des modèles d'animaux knock-out/humanisés est l'altération potentielle d'autres transporteurs et d'enzymes métabolisant les médicaments. En effet, les changements compensatoires observés dans les modèles animaux knock-out ou humanisés pour les transporteurs peuvent rendre confus l'interprétation du transporteur en lien avec des interactions médicamenteuses.

II.5. Modèles d'études *in silico*

La recherche de nouveaux substrats/inhibiteurs des transporteurs revêt une importance particulière dans les domaines de la pharmacologie et de la toxicologie. Les modèles informatiques sont donc des outils très précieux et sont de plus en plus utilisés au fur et à mesure que la technologie évolue. Ces nouveaux moyens permettent d'identifier de nouveaux ligands présumés et en même temps constituent une alternative pertinente à l'expérimentation animale excessive et une approche complémentaire et préliminaire aux expériences *in vitro* et *ex vivo*, souvent très coûteuses, laborieuses et longues à réaliser.

Les modèles *in silico* fournissent des plateformes de criblage rapides et peu coûteuses. Ils reposent sur l'étude de relations structure-activité (QSAR), des études de docking permettant la prédiction des interactions ligand-transporteur ou encore le design de pharmacophores pour les substrats des transporteurs [230]. Les études de docking sont utilisées depuis longtemps afin de prédire l'interaction des composés avec leurs cibles potentielles (protéines, acides nucléiques, glucides et lipides) [231]. Selon plusieurs chercheurs, l'étude de docking est une analyse informatique stricte qui prédit l'affinité de liaison de nouvelles entités chimiques (NEC) ou de médicaments sur la base de leur structure chimique. Cette étude intègre également les avancées de la biologie moléculaire, de la biotechnologie, de la bio-informatique, des mathématiques, de la chimie avec la modélisation et de l'informatique afin d'augmenter la puissance prédictive des logiciels de docking [232].

Le processus de développement des médicaments s'avère généralement long et coûteux, et le taux d'attrition des NEC est très élevé, surtout aux stades avancés du développement. De plus, le taux d'incidence croissant des maladies et de la résistance des agents infectieux aux médicaments existants exige une accélération du processus de développement de nouveaux médicaments. Pour économiser du temps et de l'argent dans la découverte et le développement des médicaments, les études de docking sont largement utilisées pour prédire l'interaction des analogues conçus vers un récepteur particulier [233].

Plusieurs acteurs du monde scientifique et économique, tels que les gouvernements, les universités et les industries encouragent le développement et l'utilisation des études de docking à différents stades du processus de développement des médicaments [234]. Ainsi

grâce au docking, des milliers de molécules peuvent être évaluées pour leur efficacité et leur sécurité potentielles à un faible coût et dans un intervalle de temps très court [235].

Il existe actuellement diverses approches de docking pour prédire l'interaction des molécules avec des récepteurs particuliers [236]. Malheureusement, une méthode adaptée à certains types de prédiction peut ne pas fonctionner correctement (ou ne pas fonctionner du tout) [237]. De nombreux composés échouent dans les tests de dynamique moléculaire (MD) permettant de valider le docking, malgré leur score élevé de docking. De plus, il n'est pas évident de savoir si le composé est un agoniste ou un antagoniste lors des épreuves de docking. Par conséquent, pour garantir une application précise et efficace des modèles de docking, il est nécessaire de comprendre les points forts, les limites, le champ d'application et l'interprétation de la méthode, de choisir la méthode la plus efficace pour le problème en question, et d'adapter le cas échéant ces méthodes à chaque problème.

Plusieurs modèles de docking ont été développés pour cartographier des modulateurs potentiels de la P-gp, de la BCRP et de MRP1, permettant ainsi d'évaluer les modes de liaison de ces composés pour un transporteur donné [238–246]. En effet, des dérivés nouvellement synthétisés de thioxanthone ont démontré la capacité d'augmenter immédiatement l'activité de la P-gp après une courte période d'incubation, entraînant une diminution significative de la toxicité du paraquat (substrat de la P-gp). La possibilité d'un mécanisme de co-transport entre les dérivés de thioxanthone et le paraquat a été confirmée par des études de docking utilisant un modèle validé de P-gp [240]. Les auteurs ont développé et validé des modèles de pharmacophores permettant l'activation de la P-gp en se basant sur les capacités d'activation *in vitro* de la P-gp par les dérivés de thioxanthone nouvellement synthétisés et sur un ensemble d'activateurs de la P-gp connus et décrits dans la littérature. Le pharmacophore le plus efficace était composé de trois caractéristiques : un groupement hydrophobe, un cycle aromatique et un groupe accepteur de liaisons hydrogène. Ainsi, la découverte de ces caractéristiques par modèle informatique peut être un outil très utile afin de prédire efficacement et ultérieurement de nouveaux ligands ayant la capacité d'activer la P-gp.

II.6. Article 2: MRP4 is responsible for the efflux transport of mycophenolic acid β -D glucuronide (MPAG) from hepatocytes to blood.

Dans ces travaux, nous avons mené un approche combinée *in vitro* et *in silico* pour explorer le rôle du transporteur d'efflux MRP4 dans le transport de l'acide mycophénolique (MPA) et de son principal métabolite, l'acide mycophénolique β -D glucuronide (MPAG). Dans cet article, nous nous sommes également intéressé aux interactions médicamenteuses impliquant ce transport et pouvant être occasionnées lors de la co-administration de médicaments fréquemment prescrits avec le MPA et substrats de MRP4.

Après administration de mycophénolate mofétil (MMF) ou d'un sel sodique par voie orale, le MPA est métabolisé au niveau du foie, principalement par les uridine diphosphate-glucuronosyltransférases (UGT), plus précisément l'UGT1A9, pour former un métabolite glucuro-conjugué, le MPAG. Si ce dernier est dépourvu d'activité pharmacologique, il est toutefois excrété dans la bile par le transporteur MRP2, et subit une déconjugaison par les β -glucuronidases du microbiote intestinal pour reformer du MPA qui est réabsorbé (cycle entéro-hépatique) (**Figure 10**). D'autre part, des travaux ont montré que les patients présentant la toxicité hématologique fréquemment observée sous MPA, ou ceux ayant une fonction rénale détériorée, avaient des concentrations plasmatiques plus élevées en MPAG.

Il a été révélé que le MPAG est éliminé par le rein via les transporteurs OAT3. Il a également été montré que MRP2 contribue à l'élimination du MPAG au niveau rénal et hépatobiliaire. D'autre part, des travaux menés dans l'équipe ont montré que les transporteurs OATP1B3 et 1B1 participent au passage du MPAG du sang vers les hépatocytes.

Lorsque nous avons débuté ces travaux, il était fait l'hypothèse d'un transport du MPAG des hépatocytes vers la circulation sanguine, sans que le transporteur impliqué ne soit identifié. Nous avons posé l'hypothèse que ce rôle soit joué par MRP4. En effet, le transporteur MRP4 est situé au niveau de la membrane baso-latérale de l'hépatocyte et permet l'efflux de substrats vers la circulation sanguine. Plusieurs études rapportent que MRP4 puisse transporter de nombreuses molécules glucuro-conjuguées.

Pour cette étude, nous avons tout d'abord développé un modèle de transport vésiculaire afin d'étudier les interactions entre MPA et MRP4, et entre MPAG et MRP4. Ces travaux ont confirmé que le MPA n'est pas un substrat de MRP4. Par contre, nous avons démontré que MRP4 transporte le MPAG de façon spécifique et saturable. Dans un deuxième temps, nous avons testé l'inhibition de ce transport par des médicaments fréquemment prescrits avec le MMF et/ou substrat de MRP4. Parmi ces médicaments testés, l'ibuprofène, la céfazoline, le céfotaxime et la micafungine ont montré une inhibition significative du transport du MPAG par MRP4.

Dans une deuxième partie, nous avons fait appel à une approche *in silico*. Les objectifs étaient de confirmer les résultats expérimentaux et de mieux comprendre les mécanismes des interactions mises en évidence par notre modèle vésiculaire.

Pour cette partie, un modèle *in silico* précédemment développé dans l'Unité a été utilisé. Les expériences de docking ont permis de caractériser 4 zones distinctes de liaison des substrats : une située au cœur de la chambre protéique ; 2 situées plus à l'extérieur de la protéine, en contact plus étroit des têtes polaires constituant la bicouche lipidique ; et une troisième région située plus en profondeur dans la chambre, au niveau du compartiment extra-cellulaire. Les substrats avaient des probabilités de présence plus ou moins marquées en fonction des régions, pouvant expliquer ainsi le caractère compétitif ou non des inhibitions du transport du MPAG.

En complément des analyses de docking, des calculs de dynamique moléculaire ont permis de caractériser le type de liaisons (liaisons hydrogène, π - π stacking, pont salins) avec les résidus protéiques du transporteur MRP4. Ces calculs ont montré que la présence d'un résidu glucuronide sur la molécule de MPAG permet une meilleure interaction avec les résidus protéiques ; alors que le MPA montre une plus grande flexibilité de mouvement dans la chambre se traduisant par une moindre capacité de liaison.

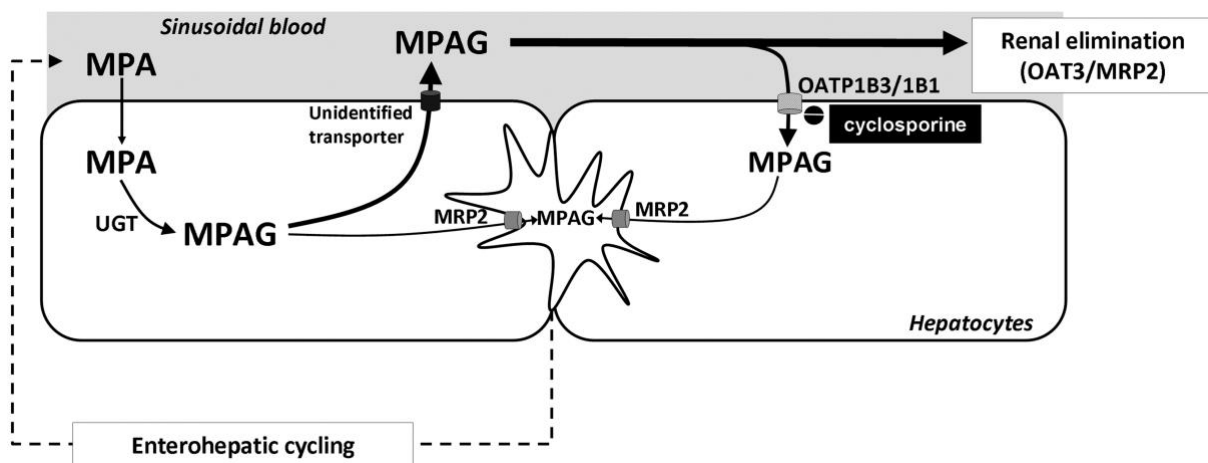


Figure 10 : Représentation des voies de transport du MPAG

Source : Picard 2013 [247]



Xenobiotica

the fate of foreign compounds in biological systems



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/ixen20>


MRP4 is responsible for the efflux transport of mycophenolic acid β -d glucuronide (MPAG) from hepatocytes to blood

Joseph Berthier , Mehdi Benmameri , François-Ludovic Sauvage , Gabin Fabre , Benjamin Chantemargue , Hélène Arnion , Pierre Marquet , Patrick Trouillas , Nicolas Picard & Franck Saint-Marcoux

To cite this article: Joseph Berthier , Mehdi Benmameri , François-Ludovic Sauvage , Gabin Fabre , Benjamin Chantemargue , Hélène Arnion , Pierre Marquet , Patrick Trouillas , Nicolas Picard & Franck Saint-Marcoux (2020): MRP4 is responsible for the efflux transport of mycophenolic acid β -d glucuronide (MPAG) from hepatocytes to blood, Xenobiotica, DOI: [10.1080/00498254.2020.1813352](https://doi.org/10.1080/00498254.2020.1813352)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/00498254.2020.1813352>

 [View supplementary material](#) 

 Accepted author version posted online: 21 Aug 2020.
Published online: 06 Sep 2020.

 [Submit your article to this journal](#) 

 Article views: 12

 [View related articles](#) 

 [View Crossmark data](#) 

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ixen20>

MRP4 is responsible for the efflux transport of mycophenolic acid β -D glucuronide (MPAG) from hepatocytes to blood

Joseph Berthier^{a,b} , Mehdi Benmameri^a, François-Ludovic Sauvage^a, Gabin Fabre^a, Benjamin Chantemargue^c, Hélène Arnion^a, Pierre Marquet^{a,b}, Patrick Trouillas^{a,d}, Nicolas Picard^{a,b} and Franck Saint-Marcoux^{a,b}

^aINSERM, UMR 1248, Univ. Limoges, Limoges, France; ^bCHU Limoges, Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, Limoges, France; ^cINSILIBIO, Limoges, France; ^dRCPTM, Univ. Palack  y of Olomouc, Olomouc, Czech Republic

ABSTRACT

1. Mycophenolic acid (MPA) has become a cornerstone of immunosuppressive therapy, in particular for transplant patients. In the gastrointestinal tract, the liver and the kidney, MPA is mainly metabolized into phenyl- β -D glucuronide (MPAG). Knowledge about the interactions between MPA/MPAG and membrane transporters is still fragmented.
2. The aim of the present study was to explore these interactions with the basolateral hepatic MRP4 transporter. The inhibition of the MRP4-driven transport by various drugs which can be concomitantly prescribed was also evaluated.
3. In vitro experiments using vesicles overexpressing MRP4 showed an ATP-dependent transport of MPAG driven by MRP4 (Michaelis-Menten constant of $233.9 \pm 32.8 \mu\text{M}$). MPA was not effluxed by MRP4. MRP4-mediated transport of MPAG was inhibited (from -43% to -84%) by ibuprofen, cefazolin, cefotaxime and micafungin. An in silico approach based on molecular docking and molecular dynamics simulations rationalized the mode of binding of MPAG to MRP4. The presence of the glucuronide moiety in MPAG was highlighted as key, being prone to make electrostatic and H-bond interactions with specific residues of the MRP4 protein chamber. This explains why MPAG is a substrate of MRP4 whereas MPA is not.

ARTICLE HISTORY

Received 15 July 2020
Revised 17 August 2020
Accepted 18 August 2020

KEYWORDS

MRP4; MPAG; MPA;
drug-drug interactions;
molecular docking

Introduction


Mycophenolic acid (MPA) is a cornerstone of immunosuppressive therapy, in particular for transplant patients. Currently, two mycophenolic acid-based compounds are available: mycophenolate mofetil and mycophenolate sodium. Following administration, both are rapidly hydrolyzed by carboxylesterases into MPA, the active moiety. MPA is a potent, selective and reversible inhibitor of type II inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), a key enzyme involved in the *de novo* synthesis of guanine nucleotides (Franklin & Cook, 1969). In the gastrointestinal tract, the liver and the kidney, MPA is mainly metabolized into a phenyl- β -D glucuronide (MPAG) and into an acyl-glucuronide (AcMPAG) by uridine diphosphate glucuronosyltransferases UGT1A9, 2B7, 1A7, 1A8 and 1A10 (Picard et al., 2005). The 6-O-desmethyl-MPA is another metabolite which is produced by cytochrome P450 3A isoforms (Picard et al., 2004).

MPAG has no pharmacological activity with respect to the inhibition of IMPDH (Shipkova et al., 1999), but some studies have reported a relationship between MPAG exposure and toxicity. Indeed, Sobiak et al. reported that concentrations of MPAG correlated negatively with hemoglobin and hematocrit

and that the highest concentrations were observed in patients with anemia. Similarly, in a prospective 12-month multicenter pharmacokinetic study conducted in renal transplant recipients, Kuypers et al. (2003) observed that patients who experienced anemia had significantly higher MPAG concentrations (trough level and AUC values) and higher AcMPAG/MPA ratios. From these studies, it was hypothesized that the mechanism of toxicity could be due to high MPAG concentrations causing MPA displacement from protein and consequently, an increase in its pharmacologically active free fraction favoring haematotoxicity. In addition, multiple studies have demonstrated that the highest exposure to MPAG is observed in patients with a deteriorated renal function (Colom et al., 2014; Kamiřska et al., 2012; Kaplan et al., 1998; Mudge et al., 2004; Sobiak et al., 2013).

The pharmacokinetics of MPA and MPAG have been well described (Bullingham et al., 1998; Staatz & Tett, 2007) but knowledge about their interactions with transporters is still fragmented. The elimination of MPAG by the kidney involves an active uptake of the metabolite by the OAT3 (SLC22A8), located at the basolateral side of proximal tubular cells (Uwai et al., 2007; Wolff et al., 2007). Using MDCKII/MRP2-transfected cells and MRP2-expressing Sf9 membrane vesicles,

CONTACT Franck Saint-Marcoux  franck.saint-marcoux@unilim.fr  CHU Limoges, B  timent CBRS, Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, 2 Avenue Martin-Luther King, Limoges, F-87042, France

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

   2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Patel et al. (Patel et al., 2013) demonstrated that MPAG is transported by MRP2 (Multidrug resistance-associated protein 2). It was also demonstrated that MRP2 contributes to the renal and hepato-biliary elimination of MPAG (Schaub et al., 1999; Trauner & Boyer, 2003). In addition, it has been reported that MPAG is a substrate for the organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B3 and 1B1 (Picard et al., 2010). These two hepatic basolateral transporters are responsible for the uptake of circulating MPAG from blood into the hepatocytes.

Using human embryonic kidney 293 (HEK293) cells and isolated perfused kidney of rats, El-Sheikh et al. (2014) have put forward the fact that MRP4 could also be involved in MPAG transport. As MPAG is present in plasma at approximately 20- to 100-fold higher concentrations than MPA (Elbarbry & Shoker, 2007), the hypothesis of an active transport from the liver to the blood is probable. Among the hepatic basolateral transporters that could be involved, MRP4 appears to be a good candidate, as it (i) transports many glucuronides; (ii) participates in the cotransport of reduced glutathione with bile salts; and (iii) is expressed at the basolateral side of hepatocytes (Järvinen et al., 2017; Kawase et al., 2016; Mizuno et al., 2007; Rius et al., 2004; Zamek-Gliszczyński et al., 2006).

The aim of the present study was to explore the interactions between MPA and MPAG and the basolateral hepatic transporter MRP4, as well as the inhibition by various drugs which can be concomitantly prescribed with MPA. In a first approach, *in vitro* experiments using vesicles overexpressing MRP4 were performed. Then, an *in silico* approach based on molecular docking and molecular dynamics simulations was used to confirm and complete the information.

Materials and methods

In vitro experiments

Chemicals and reagents

Suspensions of membrane vesicles derived from HEK 293 cells overexpressing MRP4 protein (inside-out ratio 24.7% ± 2.12) and control vesicles (both at 5 µg of total protein/µL) were purchased at Solvo Biotechnology (Hungary). Adenosine 5'-monophosphate sodium salt (AMP), adenosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate (ATP), bovine serum albumin (BSA), magnesium chloride, MK 571, ibuprofen, diclofenac sodium, cyclosporine, everolimus, tacrolimus, sirolimus, acetyl-salicylic acid, sodium chloride, sucrose, trizma® base and mycophenolic acid were purchased at Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Mycophenolic acid β-D-glucuronide, indomethacin, micafungin, cefazolin and cefotaxime were purchased at LGC standard (Teddington, UK) and were of analytical grade. Acetonitrile was obtained from Merck (Molsheim, France), ammonium formate and formic acid from Sigma. Deionized water was prepared on a direct-Q laboratory plant (Millipore, Molsheim, France).

Preliminary works to explore MRP4 time-dependent transport of MPA and MPAG

A time course of the uptake of MPAG and MPA was performed using the inside-out vesicles overexpressing MRP4. The transport studies were performed using a rapid filtration technique. Briefly, 10 µg of membrane vesicle preparations diluted into 50 µL of transport medium (10 mM Tris-HCl [pH 7], 250 mM sucrose, and 10 mM MgCl₂) containing 6 mM ATP or AMP were preincubated at 37 °C for 15 min in 96 wells plate. Then 25 µL MPA or MPAG was added, yielding a final concentration of 50 µM and 100 µM respectively. The reaction plate was incubated for 5–10–15–35 min at 37 °C under gentle shaking. It was then placed over an ice block and the reaction was stopped by the addition of 200 µL of ice-cold stop buffer containing 10 mM Tris-HCl [pH 7], 250 mM sucrose, NaCl 100 mM and BSA 0.02% w/v. The samples were then filtered through 1-µm-pore-size 96-well glass filter plate (Millipore, Bedford, MA) and washed five times with 200 µL of stop cold buffer. The filter was subsequently dried and vesicles were lysed with 210 µL of MeOH/H₂O (2:1) containing indomethacin at 50 mg/L as internal standard (IS) for HPLC analysis. The plate was then centrifuged for 2 min at 2000 g and lysates were recovered in a new plate and directly injected into HPLC-MS/MS system. To determine the transporter-specific uptake of the substrates, MRP4-overexpressing vesicles were assayed side by side with control vesicles. The accumulation of substrates in vesicles was expressed in picomoles per milligram of total proteins.

Preliminary works to explore MRP4 concentration-dependent transport of MPAG

MPAG was incubated for 35 minutes with MRP4-overexpressing vesicles at final concentrations from 10 to 500 µM to determine kinetic constants. The accumulation of MPAG in vesicles was expressed in picomoles per milligram of total proteins per minute.

Transport inhibition assays

MK 571 is known as an inhibitor of MRP4 (Rius et al., 2008). This property was used to confirm that MRP4 is involved in the transport of MPAG. For this study, vesicles were incubated with MPAG at a final concentration of 25 µM (12.41 mg/L) and MK 571 concentrations ranging from 1 to 100 µM. Some drugs frequently prescribed together with mycophenolate mofetil and mycophenolate sodium and known for interacting with MRP4 were considered. For this part of the study, the vesicles were incubated with MPAG at a final concentration of 25 µM (12.41 mg/L) and each drug separately at a concentration level close to the maximum concentration (C_{max}) observed after intake of therapeutic doses: tacrolimus 0.02 mg/L (Marfo et al., 2010), cyclosporine A 1 mg/L (Fahr, 1993), everolimus 0.13 mg/L (Moes et al., 2015), sirolimus 0.12 mg/L (Moes et al., 2015), ibuprofen 20 mg/L (Davies, 1998), diclofenac 3 mg/L (Davies & Anderson, 1997), olmesartan 1 mg/L (Kim et al., 2012; Oh et al., 2019), acetyl salicylic acid 5 mg/L (Nagelschmitz et al., 2014), cefazolin 50 mg/L (Kirby & Regamey, 1973), cefotaxime

50 mg/L (Harding et al., 1981) and micafungin 10 mg/L (Chandra et al., 2018; Mulwijk et al., 2015).

Kinetic analysis

The GraphPad Prism software version 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) was used to determine the kinetic parameters of MPAG. The K_m and V_{max} values were generated using non-linear regression by a Michaelis-Menten model.

HPLC analysis

The calibration range was 1–100 µg/L for MPAG and MPA. Each standard contained 270 µL MeOH/H₂O (2:1), 30 µL of MPAG or MPA solution and 15 µL of indomethacin at 50 mg/L. Then 210 µL of this mix was added to the filter plate, centrifuged and directly injected into the HPLC-MS/MS system.

MPA and MPAG concentrations in vesicle lysates were determined using HPLC/MS-MS. The supernatant (2 µL) was directly injected into HPLC/MS-MS system. Briefly, chromatographic separation was performed using a Shimadzu Nexera 2 LC system (Shimadzu, Noisiel, France) equipped with: a thermostated column compartment and a thermostated microwell plate autosampler with a six-port micro-switching valve. Extracted samples were injected onto a XTerra® MS C₈ column, 3.5 µm (2.1 mm × 150 mm, Waters, Guyancourt, France), thermostated at 30 °C and using a gradient of phase A, 0.1% formic acid in 2 mM ammonium formate in water and phase B, a mixture of acetonitrile and phase A (90:10, by volume). The chromatographic separation was performed using the abovementioned analytical system and elution column, and a 9 min curvilinear gradient, programmed as follows: 0–0.5 min, 10% B; 0.5–4 min, 10% to 100% B; 4–6.5 min, 100% B; 6.5–6.7 min, 100% to 10% B; 6.7–9 min, equilibration with 10% B, at a constant flow rate of 250 µL/min.

Mass spectrometric detection was performed using an LCMS 8060 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France) operated in the negative ionization mode. The source conditions were as follows: interface voltage: 1.5 kV; nebulizing gas flow: 3 L/min; heating gas flow: 10 L/min; interface temperature: 300 °C; desolvation line (DL) temperature: 250 °C; heat block temperature: 400 °C; drying gas flow: 10 L/min, collision gas pressure 270 kPa. Settings for MS/MS detection are summarized in Table 1.

In silico experiments

Molecular docking (parametrization, calculation and analysis)

The molecular docking of the different ligands studied (MPA, MPAG, ibuprofen and MK571) was performed on a 3D model of the human MRP4 protein in an inward facing (IF) conformation, recently constructed by a protein-threading and post-MD relaxation procedure (Chantemargue et al., 2018). The protein was embedded in a (3:1) POPC-Cholesterol lipid bilayer to model a mammalian cell membrane

Table 1. MRM transitions, retention time and mass spectrometric conditions of MPAG, MPA and internal standard.

Compound	Precursor ion m/z	Product ion						Retention time (min)
		1		2		3		
	m/z	m/z	CE	m/z	CE	m/z	CE	
MPA	319.1	275.05	16	191.05	23	205.05	27	5.0
MPAG	495.15	319.1	20	275.05	28	191.05	37	4.5
Indomethacin (IS)	356.1	312.1	15	297.1	20	292.1	30	5.5

(Chantemargue et al., 2018). The docking procedure was performed on five different protein conformers extracted at regular intervals from the last 100 ns of the MD relaxation. The use of these different conformers allowed sampling the flexibility of the sidechains of the amino acids, in particular those experimentally shown as key in the binding site, namely Phe368, Phe369, Glu374, Arg375, Glu378, Trp995 and Arg998 (El-Sheikh et al., 2008; Wittgen et al., 2012). Moreover, the sidechains of these residues were set as flexible during docking calculations (Supplementary Table S1).

Prior to the docking process, the four ligands studied were minimized at the molecular mechanics level using the Avogadro software (Hanwell et al., 2012) with the MMFF94s force field. Only the dihedral angles around the double bonds or in aromatic rings were set as rigid during the molecular docking calculations. The docking was performed using the Autodock Vina software (Trott & Olson, 2010). Both protein and ligand structures were prepared using AutoDockTools (Morris et al., 2009). A first docking was performed on a large search volume of 40 × 65 × 55 Å³ (Supplementary Table S1(A)), which was centered on the middle of the transmembrane MRP4 chamber. This first blind docking calculation highlighted four distinct (no overlapping) binding regions, in which a refined docking was then performed using smaller cubic search volumes of 29 × 29 × 29 Å³ (Supplementary Table S1(B-E)). To ensure a correct sampling, 20 docking replicas were achieved, providing a total of 24 000 different poses for each ligand.

For each ligand, all the poses were classified according to a probability of presence in one of the four regions, obtained by considering a Boltzmann distribution:

$$p_j = \frac{\sum_{i, \text{ for region } j} e^{-\frac{\varepsilon_i}{kT}}}{\sum_{i, j} e^{-\frac{\varepsilon_i}{kT}}}$$

where p_j is the probability of a pose to be in region j ($j = 1$ to 4), ε_i is the docking score of pose i , k is the Boltzmann's constant and T is the temperature set at 310 K.

All the poses ranging within a 1.0 kcal/mol cutoff were then focused on. A thorough analysis of non-covalent interactions, including H-bonds, π - π stacking, and salt bridges was carried out to decipher the modes of binding in the MRP4 protein chamber. Taking into account all the poses of a given region, the average numbers of H-bonds and salt-bridges were given; only numbers higher than 0.1 were considered. Values higher than 1 were observed when several moieties were capable of forming H-bonds or salt-bridges (Supplementary Table S2).

Molecular dynamics simulations (parametrization and analysis)

The four ligands (MPA, MPAG, MK571 and ibuprofen) were parameterized using both the antechamber package (Wang et al., 2006) and the GAFF2 force field (Wang et al., 2004). The parameters for the glucuronide moiety of MPAG were obtained from the GLYCAM 06-j force field (Kirschner et al., 2008). According to its low pK_a value, the COOH moiety was systematically deprotonated to study the carboxylate, predominant, form. Atomic partial charges were derived from a RESP (restrained electrostatic potential) fitting with R.E.D.III (Cornell et al., 1993) based on DFT-B3LYP/cc-pVDZ calculations performed in a diethylether implicit solvent. The ff14SB (Maier et al., 2015) and the lipid17 (Gould et al., 2018) (force fields were used for the protein and the lipids, respectively). The TIP3P model was used for water (Jorgensen & Madura, 1983; Vassetz et al., 2019).

For each ligand, the most predominant docking poses (belonging to the most energetically favorable poses) in each region were used to initiate MD simulations. The systems consisted of a (3:1) POPC-cholesterol membrane, the MRP4 model as described above and, in more detail, in a previous work (Chantemargue et al., 2018), one of the selected ligands (MPA, MPAG, MK571 or ibuprofen), water and Na^+ and Cl^- ions at physiological concentrations. They were minimized and then thermalized to 100K during 50 ps under the (N, V, T) ensemble conditions. Another thermalization step was performed during 100 ps at 310K under (N, P, T) conditions with a pressure relaxation time of 2.0 ps. An equilibration step was performed during 5 ns maintaining the temperature at 310K using Langevin dynamics (Loncharich et al., 1992) with a damping coefficient of $\gamma = 1.0 \text{ ps}^{-1}$. A constant pressure of 1 atm was maintained using Berendsen barostat (Berendsen et al., 1984). A 10 Å cut-off was used for both Coulomb and van der Waals interactions; the particle mesh Ewald method (Darden et al., 1993) was applied. The MD runs produced 20 ns (N, P, T) trajectories using a time step of 2.0 fs. MD simulations were run using the Amber18 software (Case et al., 2018).

The analysis of MD trajectories allowed assessing the stability of the poses over time, by calculating the root mean square deviation (RMSD) of the ligand with respect to the first frame (Supplementary Figure S3). The non-covalent interactions between the ligand and the residues of a given region in the MRP4 chamber (H-bonds, π - π stacking and salt bridges) were analyzed along the MD trajectories. The average number of non-covalent interactions were calculated in each region over MD simulation time; only the numbers higher than 0.1 were considered.

Results

Preliminary works

Experiments to explore MRP4 time-dependent transport of MPA and MPAG showed that MPAG (100 μM) accumulated more in MRP4-overexpressing vesicles than in control vesicles, whatever the time elapsed (Supplementary Figure

S1(A)). Conversely, MPA (50 μM) did not accumulate in vesicles overexpressing MRP4 (Supplementary Figure S1(B)). Additionally, experiments exploring the concentration-dependent transport of MPAG showed an ATP-dependent transport in MRP4 overexpressing vesicles (Supplementary Figure S2). The intravesicular concentration increased with MPAG concentration following a Michaelis-Menten model. The K_m and V_{max} values were $233.9 \pm 32.8 \mu\text{M}$ and $20.4 \pm 1.3 \text{ pmol/mg protein/min}$, respectively.

Inhibition of transport of MPAG by co-prescribed drugs

The intravesicular MPAG concentration significantly decreased when adding increasing concentrations of MK 571 (Figure 1). This result confirmed the specificity of the substrate. The four immunosuppressive drugs (everolimus, sirolimus, tacrolimus and cyclosporine) did not modify the intravesicular accumulation of MPAG in vesicles overexpressing MRP4 (Figure 2(A)). A similar result was observed for acetylsalicylic acid, diclofenac and olmesartan (Figure 2(B)). Conversely, ibuprofen, cefazolin, cefotaxime and micafungin induced a decrease in intravesicular MPAG concentrations. This can be expressed as follows: ATP-dependent uptake (measured by subtracting uptake in the presence of AMP from that measured in the presence of ATP) was decreased by 84, 61, 59 and 43% when adding ibuprofen, cefazolin, cefotaxim and micafungin, respectively (Figure 3).

Molecular docking into the MRP4 protein chamber

To unravel MRP4 activity and to describe modes of binding of substrates and inhibitors, molecular docking and MD simulations were performed on MPA and MPAG as well as on two representative inhibitors, namely MK 571, a well-known MRP4 inhibitor, and ibuprofen, shown as one of the most efficient inhibitors in this study. The blind docking into the MRP4 protein chamber highlighted four different regions for substrate binding (Figure 4). Region 1 is fully solvent-accessible, as it is located in the heart of the protein chamber. Regions 2 and 3 are located at the border of the protein in closer contact to the polar head groups of the lipid bilayer.

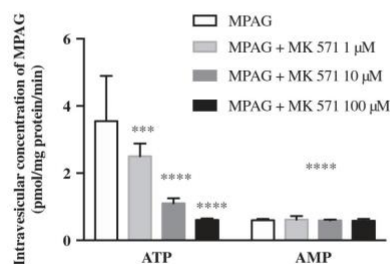


Figure 1. Inhibitory effect of MK 571 on MRP4 ATP-dependent transport of MPAG (25 μM). Vesicles were incubated for 35 min at 37 °C with MPAG and MK 571, either with ATP or AMP. Data represent the mean \pm SD of 1 experiment performed in triplicate. Statistical significance was assessed by one-way analysis of variance with Dunnett's post-test; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; compared with control.

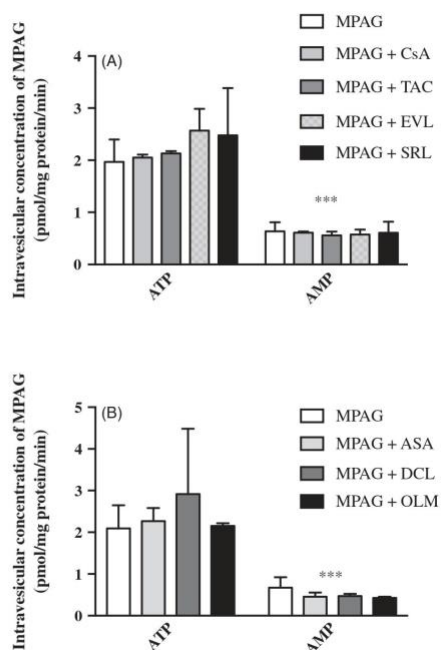


Figure 2. Effect of the immunosuppressive drugs: cyclosporine (CsA: 831 nM); tacrolimus (TAC: 24,3 nM); everolimus (EVL: 46,6 nM) and sirolimus (SRL: 43,3 nM) (A) and acetyl-salicylic acid (ASA: 27,75 μ M); diclofenac (DCL: 15,66 μ M) and olmesartan (OLM: 2,24 μ M) (B) on MRP4 ATP-dependent transport of MPAG (25 μ M). Data represent the mean \pm SD of 1 experiment performed in triplicate. Statistical significance was assessed by one-way analysis of variance with Dunnett's post-test; ***, $p < 0.001$; compared with control.

Region 4 is deeper in the chamber, i.e. in the extracellular compartment; it is likely to be a less accessible region of the IF conformer, forming a bottleneck for substrate translocation. The volume of region 4 may enlarge during the efflux process, e.g. in the IF-closed conformer (Oldham et al., 2008; Rees et al., 2009). A focused docking into each region allowed to better document the preferred location for each substrate. The docking procedure was followed by MD simulations to confirm substrate binding in a given region and to tackle local dynamical effects in the binding site, in turn elucidating the mode of binding.

Modes of binding of MPAG

Here we confirm that MPAG can efficiently bind into the MRP4 protein chamber, possibly in all four regions (green color surface in Figure 4). It preferentially binds in both regions 1 and 3 with almost equal Boltzmann distribution values, namely 0.39 and 0.46, respectively (Table 2). MPAG binds in regions rich in Arg residues, especially region 1, which contains two key residues proven experimentally to participate in the transport of substrates, namely Arg375 and Arg998 (El-Sheikh et al., 2008). The Arg879 and Arg21 residues were also highlighted here to participate in the binding

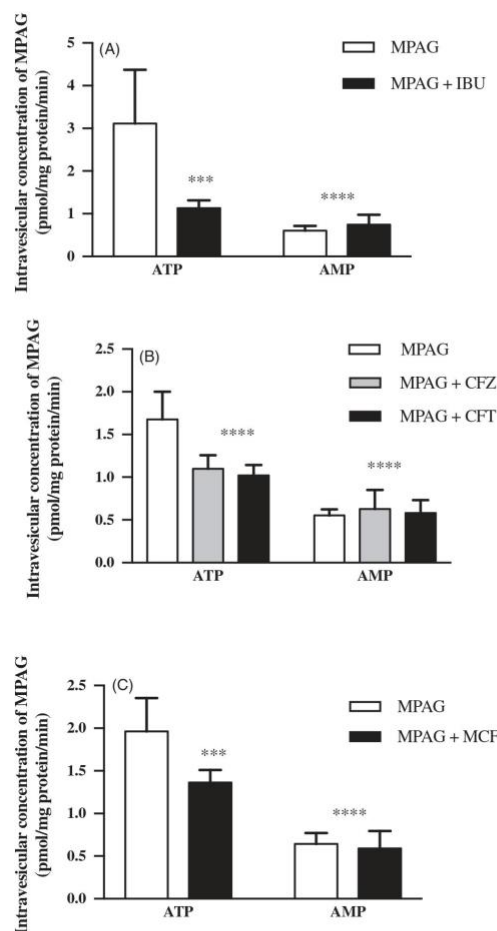


Figure 3. Inhibitory effect of the ibuprofen (IBU: 96,66 μ M) (A), cefazolin (CFZ: 110 μ M) and cefotaxime (CFT: 110 μ M) (B), and micafungin (MCF: 7,87 μ M) (C) on MRP4 ATP-dependent transport of MPAG (25 μ M). Data represent the mean \pm standard deviation (SD) of 2 independent experiments, each performed in triplicate. Statistical significance was assessed by one-way analysis of variance with Dunnett's post-test. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ compared with control.

of MPAG. In addition to electrostatic interactions with the dianionic MPAG (Table 3), the MD simulations highlighted 0.58, 3.33 and 0.10 H-bonds with Glu374, Arg375 and Arg998, respectively (Table 3). Other residues participated in H-bond interactions (Table 3). Electrostatic and H-bond interactions are also present in region 3 with Arg272, Arg303 and Arg317 residues (Table 3). Additionally, in region 3, a π - π stacking interaction was described between MPAG and Phe787.

The molecular docking also showed that, if present in the chamber, MPA is more flexible and exhibits a less specific binding to a given region (i.e. similar Boltzmann distribution in the four different regions, see Table 2). As compared to MPAG, MPA exhibits less H-bond contacts to the residues of

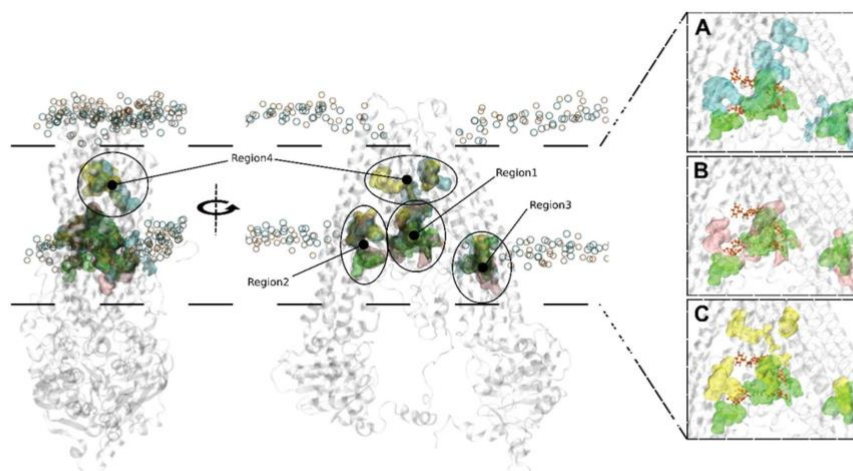


Figure 4. Binding regions (1 to 4) of MPAG, MPA, MK 571 and ibuprofen inside the chamber of the MRP4 protein (grey cartoon). (A) represents superimposition of MPAG and MPA molecular surfaces, (B) represents superimposition of MPAG and MK 571 molecular surfaces and (C) represents superimposition of MPAG and ibuprofen molecular surfaces. Key residues are highlighted in black sticks, MPAG is represented in dark grey surface; MPA, MK 571 and ibuprofen are represented in light grey surfaces.

Table 2. Boltzmann distributions for MPA, MPAG, MK 571 and ibuprofen over the preferential binding locations (Regions) in the MRP4 chamber.

	Region1	Region2	Region3	Region4
MPA	0.33	0.33	0.20	0.15
MPAG	0.39	0.09	0.46	0.06
MK 571	0.46	0.32	0.13	0.09
Ibuprofen	0.19	0.26	0.14	0.42

the chamber (e.g. with Arg21, Arg375 and Arg998 in region 1, and with Arg272, Arg303 and Arg317 in region 3, see Supplementary Table S2). This difference between both compounds is mainly explained by the presence of the glucuronide moiety in MPAG, which is prone to make electrostatic and H-bond interactions in the MRP4 protein chamber, mainly with Arg residues. This is likely to rationalize that MPAG is a substrate of MRP4, whereas MPA is not.

Modes of binding of two inhibitors of MRP4-mediated transport

As expected, MK 571 also binds efficiently in the different regions of the MRP4 protein chamber (pink color surface in Figure 4(B)), mainly in regions 1 and 2, with Boltzmann distribution values of 0.46 and 0.32, respectively. Region 3 appears to be much less explored by the MK 571 inhibitor, with a lower distribution value of 0.13 (Table 2), as in this region the binding requires strong molecular flexibility in the cavity. This suggests that the inhibition of the MRP4-driven MPAG efflux by MK 571 could be associated with a competitive inhibition in region 1.

Ibuprofen also binds to the MRP4 protein chamber (yellow color surface in Figure 4(C)), with Boltzmann distribution values of 0.19, 0.26, 0.14 and 0.42 in regions 1, 2, 3 and 4,

respectively (Table 2). Due to its small molecular size allowing great rotational and translational lability, ibuprofen can reach deeper and less solvent-accessible regions. In particular, it has a much greater occurrence in region 4 than MPAG. Here, we believe that ibuprofen can partially block region 4, which is the bottleneck of drug translocation. Although this region is highly dynamic during the transport cycle, the location of ibuprofen in this region may impair MPAG efflux.

Discussion

In this study, we demonstrate that MPAG is a substrate of the MRP4 transporter and that this transport is inhibited by ibuprofen, cefazolin, cefotaxime and micafungin. The *in silico* simulations provided molecular characteristics of substrate vs. non-substrate (MPAG vs. MPA, respectively), as well as some inhibitor activities. The binding modes in different regions of the MRP4 protein chamber were described for MPA, MPAG, MK 571 and ibuprofen, which enabled molecular rationalization of experimental observations.

Our results confirm that MPA might not be a substrate of MRP4, which was already suggested by El-Sheikh et al. (2014). In their experiments, these authors observed that intracellular MPA efflux from HEK 293-MRP4 was not significant, whereas it was for MRP2. These authors also hypothesized that MRP4 would not be involved in the excretion of MPAG, but they mentioned that "intracellular MPAG concentrations could not be measured accurately" in their experiments. Matsunaga et al. (2014) also performed vesicular transport studies to identify which human MRPs are involved in the efflux of MPAG from hepatocytes. Using sandwich-cultured human hepatocytes and human MRP-expressing

Table 3. (a) Average number of H-bonds over the MD trajectories for MPAG, MK 571 and ibuprofen for the four different binding regions.

	Residues	MPAG	MK 571	Ibuprofen	
Region1	Gln54	–	–	–	
	Ser371	–	–	–	
	Glu374	0.58	–	–	
	Arg375	3.33	–	–	
	Arg879	–	–	–	
	Gln994	–	0.55	–	
	Trp995	–	–	1.13	
	Arg998	0.10	0.54	–	
	Sum over residues	4.15	1.18	1.14	
	Region2	Gln207	0.92	0.92	–
Arg951		–	2.90	1.00	
Tyr881		0.43	–	–	
Ser886		0.28	–	–	
Ser894		0.18	–	–	
Thr896		2.50	–	–	
Arg897		3.81	–	–	
Sum over residues		8.38	3.85	2.06	
Region3		Arg262	0.59	0.48	–
		Thr265	0.15	0.22	–
	Arg272	–	2.14	–	
	Arg303	–	0.46	–	
	Ser314	1.39	–	–	
	Arg317	5.22	–	2.96	
	Sum over residues	7.39	3.37	3.00	
Region4	Lys106	–	–	0.41	
	Gln221	–	–	0.30	
	Thr364	–	–	1.02	
	Ala957	–	–	0.20	
	Sum over residues	–	–	1.94	

	Residues	MPAG	MK 571	Ibuprofen
Region1	Arg998	–	0.61	–
Region2	Arg951	–	2.90	1.00
	Arg887	–	–	1.21
Region3	Arg897	0.93	–	–
	Arg272	–	1.96	–
	Arg303	–	0.28	–
	Arg317	2.23	–	3.02
Region4	Lys106	–	–	0.51

(b) Average number of salt-bridges, over the MD trajectories, between the carboxylate group (COO⁻) of the ligands and the Arg guanidinium or Lys α -amino moieties of the MRP4 protein chamber.

Residues of interest are highlighted in grey.

Values higher than 1 were observed when several moieties were capable of forming H-bonds or salt-bridges.

membrane vesicles, they observed that MPAG was a substrate of one apical MRP (MRP2), and two basolateral ones (MRP3 and MRP4). For MRP4, the K_m value was 501 μ M. In the present study, we used similar range of MPAG concentrations and we found a lower K_m value (233.9 \pm 32.8 μ M). One limitation of this study is that we did not investigate the contribution of MRP3 in the transport of MPAG. Indeed, MRP3 is also located at the basolateral side of the liver at highly variable levels as it is highly inducible (Lang et al., 2004; Scheffer et al., 2002; Wang et al., 2015). The regulation and substrate specificity of MRP3 suggests that its main role is to protect the liver from an accumulation of hepatotoxic compounds (Deeley et al., 2006). MRP3 handles common substrates with MRP4, as bile salts and their glucuronides or acetaminophen metabolites (McGill & Jaeschke, 2013; Zamek-Gliszczyński et al., 2006). It might also contribute to MPAG efflux from hepatocytes and deserves further investigations.

In a second step, we tested the impact of different drugs on the transport of MPAG by MRP4. These drugs were chosen on the basis of two criteria: (i) the drug is known to

be a substrate or an inhibitor of MRP4 and (ii) the drug is frequently prescribed to patients receiving MPA. In the literature, ibuprofen can inhibit the transport of methotrexate and estradiol-17- β -D-glucuronide (E₂17 β G) which are MRP4 substrates (El-Sheikh et al., 2007; Kawase et al., 2016; Reid et al., 2003). Ci et al. (2007) identified cefazolin and cefotaxime (with other cephalosporins) as MRP4 substrates. They also demonstrated that cefazolin and cefotaxime inhibited the ATP-dependent uptake of [3H]-DHEAS using MRP4 expressing membrane vesicles. Lempers et al. (2016) showed that micafungin strongly inhibited the MRP4 ATP-dependent transport of E₂17 β G using inside-out membrane vesicles isolated from HEK 293-MRP4 cells. Two studies demonstrated that diclofenac inhibits MRP4 ATP-dependent transport of [3H]-MTX with a low affinity (El-Sheikh et al., 2007; Kawase et al., 2016). Yamada et al., using membrane vesicles expressing human MRP2 and MRP4, demonstrated that olmesartan could be transported by MRP2 and MRP4 (Yamada et al., 2007), whereas Mattiello et al. (2011) also clearly demonstrated that aspirin and salicylic acid are transported by MRP4 (Berthier et al., 2019).

In our experiments, we used in vitro concentrations close to those used in the above-mentioned studies. The concentrations were close to C_{max} observed after intake of therapeutic doses. The choice of inhibitor concentrations to explore the interactions with transporters remains difficult and controversial. Many equations have been proposed by the US Food and Drug Administration (FDA), the Japanese Pharmaceutical and Medical Devices Agency (PMDA) and the European Medicines Agency (EMA) to extrapolate the actual concentration of inhibitors at the interaction site. The parameters required for these calculations are not available for every drug. Parkinson A. discussed these recommendations and mentioned that for efflux transporters testing, a relevant concentration would be the so-called " $I_{max,u}$ " (the unbound maximum concentration of test drug in plasma following dosing to steady state ($C_{max,ss}$) with the highest intended clinical dose), which is calculated from plasma $C_{max,ss} \times fuP$ (fuP being the fraction of unbound drug in plasma) (Parkinson, 2019). Here, we did not consider the unbound fraction, because the amount of inhibitors reaching the hepatocytes at the hepatic first pass highly exceeds circulating plasma concentrations. Clinical data are required to explore more precisely the relevance of the interactions reported in the present study.

MPAG represents a significant source of MPA exposition through an entero-hepatic cycle which contributes to approximately 40% of the AUC of mycophenolic acid. (Bullingham et al., 1998). Consequently, the inhibition of the efflux of MPAG from hepatocytes is likely to have a direct impact on MPA pharmacokinetics and effect. The inhibition of MRP4 at the basolateral side of hepatocytes, may favor MPAG accumulation in the hepatocytes. As a consequence, it may be more excreted into the bile by MRP2 where it is deconjugated back to MPA and reabsorbed in the colon. This could increase MPAG gastro-intestinal toxicity or enhance the entero-hepatic cycle, hence MPA concentration.

Conclusion

MPA is an immunosuppressive drug largely prescribed in multiple contexts, with a complex and highly variable pharmacokinetics. Our experiments showed that MRP4 transports MPAG, its main metabolite. As MRP4 is located at the basolateral side of hepatocytes, this result suggests that MRP4 could contribute to the efflux of MPAG from the liver to the bloodstream, where the metabolite circulates at high concentrations. We also demonstrated that some drugs frequently prescribed with MPA can inhibit this transport. This inhibition could favor the accumulation of MPAG in the liver, hence its excretion into the bile and consequently the enterohepatic cycle of MPA. Further studies in animals should be performed to determine the effective contribution of MRP4 or other transporters in MPAG transport and the relevance of drug–drug interactions between mycophenolate and MRP4 inhibitors should be investigated.

Acknowledgments

Benmameri, Fabre, Chantemargue and Trouillas thank CALI (CALcul en Limousin) for computational facilities. Benmameri, Fabre and Chantemargue thank Florent Di Meo for his insight.

Author contributions

Participated in research design: Berthier, Arnion, Marquet, Trouillas, Picard and Saint-Marcoux. Conducted vesicular assay experiments and analysis: Berthier. Conducted HPLC analysis: Sauvage and Berthier. Conducted in silico experiments and analysis: Benmameri, Fabre, Chantemargue and Trouillas. Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Berthier, Benmameri Trouillas, Picard, Sauvage and Saint-Marcoux.

Disclosure statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding

The computational work was supported by the Region Nouvelle Aquitaine (Project MEMCROSS) and the French Research Agency [Grant ANR-19-CE17-0020 IMOTEP].

ORCID

Joseph Berthier  <http://orcid.org/0000-0003-2857-8245>

References

- Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, et al. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81: 3684–90.
- Berthier J, Arnion H, Saint-Marcoux F, Picard N. (2019). Multidrug resistance-associated protein 4 in pharmacology: overview of its contribution to pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics. *Life Sci* 231:116540.
- Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. (1998). Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 34:429–55.
- Case DA, Ben-Shalom IY, Brozell SR, et al. (2018). AMBER 2018, University of California, San Francisco.
- Chandra S, Fukuda T, Mizuno K, et al. (2018). Micafungin antifungal prophylaxis in children undergoing HSCT: can we give higher doses, less frequently? A pharmacokinetic study. *J Antimicrob Chemother* 73: 1651–8.
- Chantemargue B, Di Meo F, Berka K, et al. (2018). Structural patterns of the human ABCC4/MRP4 exporter in lipid bilayers rationalize clinically observed polymorphisms. *Pharmacol Res* 133:318–27.
- Ci L, Kusuhara H, Adachi M, et al. (2007). Involvement of MRP4 (ABCC4) in the luminal efflux of ceftizoxime and cefazolin in the kidney. *Mol Pharmacol* 71:1591–7.
- Colom H, Lloberas N, Andreu F, et al. (2014). Pharmacokinetic modeling of enterohepatic circulation of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Kidney Int* 85:1434–43.
- Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Kollman PA. (1993). Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation. *J Am Chem Soc* 115:9620–31.
- Darden T, York D, Pedersen L. (1993). Particle mesh Ewald: an N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98:10089–92.
- Davies NM, Anderson KE. (1997). Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin Pharmacokinet* 33:184–213.
- Davies NM. (1998). Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin Pharmacokinet* 34:101–54.
- Deeley RG, Westlake C, Cole SPC. (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* 86:849–99.
- Elbarby FA, Shoker AS. (2007). Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients. *Clin Biochem* 40: 752–64.
- El-Sheikh AAK, Koenderink JB, Wouterse AC, et al. (2014). Renal glucuronidation and multidrug resistance protein 2-/multidrug resistance protein 4-mediated efflux of mycophenolic acid: interaction with cyclosporine and tacrolimus. *Transl Res* 164:46–56.
- El-Sheikh AAK, van den Heuvel JJMW, Koenderink JB, Russel FGM. (2007). Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate transport. *J Pharmacol Exp Ther* 320:229–35.
- El-Sheikh AAK, van den Heuvel JJMW, Krieger E, et al. (2008). Functional role of arginine 375 in transmembrane helix 6 of multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4). *Mol Pharmacol* 74:964–71.
- Fahr A. (1993). Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 24:472–95.
- Franklin TJ, Cook JM. (1969). The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J* 113:515–24.
- Gould IR, Skjevik AA, Dickson CJ, et al. (2018). Lipid17: a comprehensive AMBER force field for the simulation of zwitterionic and anionic lipids. *Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, et al. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. J Cheminformatics* 4:17.
- Harding SM, Monro AJ, Thornton JE, et al. (1981). The comparative pharmacokinetics of ceftazidime and cefotaxime in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 8 Suppl B:263–72.
- Järvinen E, Troberg J, Kidron H, Finel M. (2017). Selectivity in the efflux of glucuronides by human transporters: MRP4 is highly active toward 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronides, while MRP3 exhibits stereoselective propranolol glucuronide transport. *Mol. Pharm* 14:3299–311.
- Jorgensen WL, Madura JD. (1983). Quantum and statistical mechanical studies of liquids. 25. Solvation and conformation of methanol in water. *J Am Chem Soc* 105:1407–13.
- Kamińska J, Glyda M, Sobiak J, Chrzanowska M. (2012). Pharmacokinetics of mycophenolic acid and its phenyl glucuronide metabolite in kidney transplant recipients with renal impairment. *Arch Med Sci* 1:88–96.
- Kaplan B, Gruber SA, Nallamathou R, et al. (1998). Decreased protein binding of mycophenolic acid associated with leukopenia in a pancreas transplant recipient with renal failure. *Transplantation* 65: 1127–1129.
- Kawase A, Yamamoto T, Egashira S, Iwaki M. (2016). Stereoselective inhibition of methotrexate excretion by glucuronides of nonsteroidal

- anti-inflammatory drugs via multidrug resistance proteins 2 and 4. *J Pharmacol Exp Ther* 356:366–74.
- Kim CO, Cho SK, Oh ES, et al. (2012). Influence of ABCC2, SLCO1B1, and ABCG2 polymorphisms on the pharmacokinetics of olmesartan. *J Cardiovasc Pharmacol* 60:49–54.
- Kirby WM, Regamey C. (1973). Pharmacokinetics of cefazolin compared with four other cephalosporins. *J Infect Dis* 128:S341–56.
- Kirschner KN, Yongye AB, Tschampel SM, et al. (2008). GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. *carbohydrates*. *J Comput Chem* 29: 622–55.
- Kuypers DRJ, Vanreenterghem Y, Squifflet JP, et al. (2003). Twelve-month evaluation of the clinical pharmacokinetics of total and free mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in renal allograft recipients on low dose tacrolimus in combination with mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 25:609–622.
- Lang T, Hitzl M, Burk O, et al. (2004). Genetic polymorphisms in the multidrug resistance-associated protein 3 (ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver. *Pharmacogenetics* 14:155–64.
- Lempers VJC, van den Heuvel JJMW, Russel FGM, et al. (2016). Inhibitory potential of antifungal drugs on ATP-binding cassette transporters P-glycoprotein, MRP1 to MRP5, BCRP, and BSEP. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3372–79.
- Loncharich RJ, Brooks BR, Pastor RW. (1992). Langevin dynamics of peptides: the frictional dependence of isomerization rates of N-acetylalanine-N'-methylamide. *Biopolymers* 32:523–35.
- Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, et al. (2015). ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput* 11:3696–713.
- Marfo K, Altshuler J, Lu A. (2010). Tacrolimus pharmacokinetic and pharmacogenomic differences between adults and pediatric solid organ transplant recipients. *Pharmaceutics* 2:291–99.
- Matsunaga N, Wada S, Nakanishi T, et al. (2014). Mathematical modeling of the in vitro hepatic disposition of mycophenolic acid and its glucuronide in sandwich-cultured human hepatocytes. *Mol Pharm* 11: 568–79.
- Mattiello T, Guerriero R, Lotti LV, et al. (2011). Aspirin extrusion from human platelets through multidrug resistance protein-4-mediated transport: evidence of a reduced drug action in patients after coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol* 58:752–61.
- McGill MR, Jaeschke H. (2013). Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharm Res* 30:2174–87.
- Mizuno N, Takahashi T, Kusahara H, et al. (2007). Evaluation of the role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the urinary excretion of sulfate and glucuronide metabolites of edaravone (MCI-186; 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one). *Drug Metab Dispos* 35: 2045–2052.
- Moes DJAR, Guchelaar H-J, de Fijter JW. (2015). Sirolimus and everolimus in kidney transplantation. *Drug Discov Today* 20:1243–49.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30:2785–91.
- Mudge DW, Atcheson BA, Taylor PJ, et al. (2004). Severe toxicity associated with a markedly elevated mycophenolic acid free fraction in a renal transplant recipient. *Ther Drug Monit* 26:453–55.
- Muilwijk EW, Lempers VJC, Burger DM, et al. (2015). Impact of special patient populations on the pharmacokinetics of echinocandins. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13:799–815.
- Nagelschmitz J, Blunck M, Kraetzschmar J, et al. (2014). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetylsalicylic acid after intravenous and oral administration to healthy volunteers. *Clin Pharmacol* 6:51–59.
- Oh M, Shin J-G, Ahn S, et al. (2019). Pharmacokinetic comparison of a fixed-dose combination versus concomitant administration of amlodipine, olmesartan, and rosuvastatin in healthy adult subjects. *Drug Des Dev Ther* 13:991–97.
- Oldham ML, Davidson AL, Chen J. (2008). Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 18:726–33.
- Parkinson A. (2019). Regulatory recommendations for calculating the unbound maximum hepatic inlet concentration: a complicated story with a surprising and happy ending. *Drug Metab Dispos* 47: 779–84.
- Patel CG, Ogasawara K, Akhlaghi F. (2013). Mycophenolic acid glucuronide is transported by multidrug resistance-associated protein 2 and this transport is not inhibited by cyclosporine, tacrolimus or sirolimus. *Xenobiotica* 43:229–35.
- Picard N, Cresteil T, Prémaud A, Marquet P. (2004). Characterization of a phase I metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* 26:600–608.
- Picard N, Ratanasavanh D, Prémaud A, et al. (2005). Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab. Dispos* 33:139–46.
- Picard N, Yee SW, Woillard J-B, et al. (2010). The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 87: 100–108.
- Rees DC, Johnson E, Lewinson O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:218–27.
- Reid G, Wielinga P, Zelcer N, et al. (2003). The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9244–49.
- Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Keppler D. (2008). ATP-dependent transport of leukotrienes B4 and C4 by the multidrug resistance protein ABCC4 (MRP4). *J Pharmacol Exp Ther* 324:86–94.
- Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, et al. (2004). The export pump MRP4 (ABCC4) is localized to the basolateral membrane of hepatocytes and mediates cotransport of reduced glutathione with bile salts. *Z Gastroenterol* 42:AB_2_70.
- Schaub T P, Kartenbeck J, König J, et al. (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.
- Scheffer GL, Kool M, de Haas M, et al. (2002). Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab Invest* 82: 193–201.
- Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, et al. (1999). Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol* 126:1075–1082.
- Sobiak J, Kamińska J, Glyda M, et al. (2013). Effect of mycophenolate mofetil on hematological side effects incidence in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 27:E407–14.
- Staatz CE, Tett SE. (2007). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 46:13–58.
- Trauner M, Boyer JL. (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633–71.
- Trott O, Olson AJ. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31:455–61.
- Uwai Y, Motohashi H, Tsuji Y, et al. (2007). Interaction and transport characteristics of mycophenolic acid and its glucuronide via human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3. *Biochem Pharmacol* 74:161–68.
- Vassetti D, Pagliari M, Procacci P. (2019). Assessment of GAFF2 and OPLS-AA general force fields in combination with the water models TIP3P, SPCE, and OPC3 for the solvation free energy of druglike organic molecules. *J Chem Theory Comput* 15:1983–95.
- Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA. (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graphics Model* 25:247–60.
- Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, et al. (2004). Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem* 25:1157–74.
- Wang L, Prasad B, Salphati L, et al. (2015). Interspecies variability in expression of hepatobiliary transporters across human, dog, monkey, and rat as determined by quantitative proteomics. *Drug Metab Dispos* 43:367–74.

- Wittgen HGM, van den Heuvel JJMW, Krieger E, et al. (2012). Phenylalanine 368 of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) plays a crucial role in substrate-specific transport activity. *Biochem Pharmacol* 84:366–73.
- Wolff NA, Burckhardt BC, Burckhardt G, et al. (2007). Mycophenolic acid (MPA) and its glucuronide metabolites interact with transport systems responsible for excretion of organic anions in the basolateral membrane of the human kidney. *Nephrol Dial Transplant* 22: 2497–503.
- Yamada A, Maeda K, Kamiyama E, 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* 35:2166–76.
- Zamek-Gliszczyński MJ, Hoffmaster KA, Nezasa K-I, et al. (2006). Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *Eur J Pharm Sci* 27:447–86.
- Zamek-Gliszczyński MJ, Nezasa K-I, Tian X, et al. (2006). Evaluation of the role of multidrug resistance-associated protein (Mrp) 3 and Mrp4 in hepatic basolateral excretion of sulfate and glucuronide metabolites of acetaminophen, 4-methylumbelliferone, and harmol in *Abcc3*^{-/-} and *Abcc4*^{-/-} mice. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1485–91.

Table S1: Docking search spaces (square-box) for every region of the human MRP4 model (first column). Coordinates of box centers (second column) for: (A) the whole MRP4 chamber; (B) region 1; (C) region 2; (D) region 3; and (E) region 4. The box volume was $40 \times 65 \times 55 \text{ \AA}^3$ and $29 \times 29 \times 29 \text{ \AA}^3$ for the whole chamber and the regions, respectively. The flexible residues used in docking calculations are mentioned for each MRP4 model and region (third column).

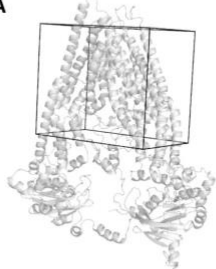
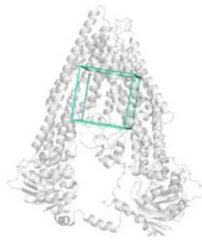
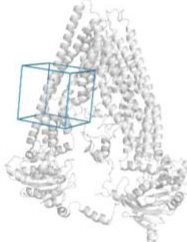
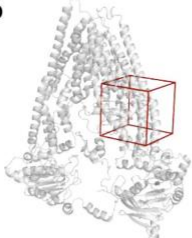

3D box representation	Coordinates of box centers (Å) for MRP4 conformer 1-5 (from top to bottom)	Residues taken flexible during the docking calculation
A 	1.432 ; -0.127 ; 28.799	Phe368, Phe369, Glu374, Arg375, Glu378, Trp995, Arg998
B 	3.067 ; 5.653 ; 21.564 ----- 3.067 ; 5.653 ; 21.564 ----- 3.067 ; 5.653 ; 21.564 ----- 3.067 ; 5.653 ; 21.564 ----- 3.067 ; 5.653 ; 21.564	Phe368, Phe369, Glu374, Arg375, Glu378, Trp995, Arg998
C 	0.416 ; 13.991 ; 19.202 ----- -10.945 ; -24.296 ; 15.23 ----- -8.584 ; 24.324, 18.341 ----- -10.945 ; 20.713 ; 17.424 ----- -10.945 ; 23.506 ; 17.424	Phe368, Phe369, Glu374, Arg375, Glu378 ----- ----- ----- ----- -----
D 	9.420 ; -21.263 ; 9.749 ----- 11.503 ; - 17.013 ; 12.777 ----- 11.254 ; - 17.485 ; 9.746 ----- 11.254 ; - 17.485 ; 9.746 ----- 11.254 ; - 17.485 ; 9.746	-
E 	11.567 ; 11.514 ; 31.120 ----- 13.995 ; 12.571 ; 28.162 ----- 11.254 ; -17.485 ; 9.746 ----- 10.253 ; 13.154 ; 28.162 ----- 8.389 ; 14.960 ; 32.384	Phe368, Phe369

Table S2: Average number of H-bonds over the total number of docking poses for MPA, MPAG, MK 571 and ibuprofen in the four different binding regions. Residues of interest are highlighted in grey. Values higher than 1 were observed when several moieties were capable of forming H-bonds.

	Residues	MPA	MPAG	MK571	Ibuprofen
Region 1	Arg21	-	0.21	0.16	-
	Gln54	0.33	-	0.13	-
	Ile373	-	0.10	-	-
	Glu374	0.58	0.43	0.48	-
	Arg375	0.43	0.79	0.66	-
	Arg879	0.42	0.49	0.14	0.59
	Gln994	0.11	0.15	-	0.15
	Trp995	-	-	0.26	0.28
	Arg998	0.15	0.56	-	0.35
Region 2	Gln54	-	0.12	-	-
	Glu374	0.1	0.33	-	-
	Arg375	-	0.34	-	-
	Arg879	0.24	0.11	-	-
	Arg887	0.17	0.19	-	0.14
	Ser894	0.1	0.43	-	-
	Thr896	0.18	0.31	-	-
	Arg897	0.33	0.48	-	-
	Ser945	0.13	-	-	-
Arg951	0.56	0.27	1.45	0.69	
Region 3	Trp26	0.15	-	-	-
	Arg272	-	0.65	0.48	-
	Ser259	0.1	-	-	-
	Arg303	0.34	0.50	0.42	0.20
	Arg317	0.78	1.91	0.52	0.38
	His798	-	-	0.12	-
	Lys827	-	-	-	0.16
	Asp834	-	0.11	-	-
Region 4	Gln54	0.315	-	-	-
	Arg362	0.36	-	0.82	0.15
	Glu374	0.3	-	-	-
	Trp995	0.11	-	-	-
	Arg998	0.14	-	-	-

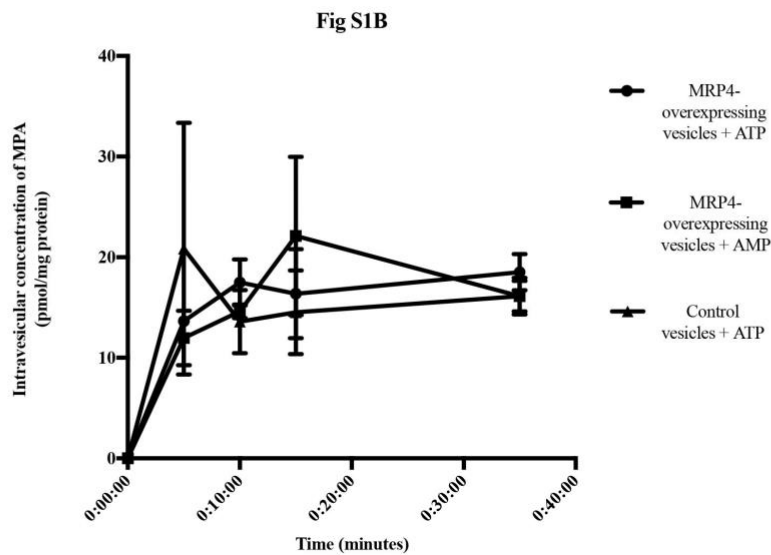
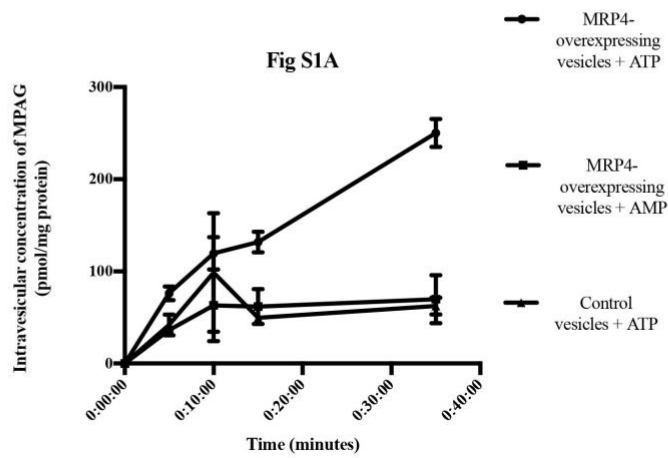


Figure S1: Uptake of MPAG (100 μ M) into membrane vesicles derived from HEK 293 MRP4 overexpressing cells or control cells. Addition of ATP (circle), but not AMP (square) stimulated the uptake of MPAG into MRP4 overexpressing vesicles or into control vesicles (triangle) (A). No specific increase in the accumulation of MPA (50 μ M) was observed in MRP4 vesicles when adding ATP (B).

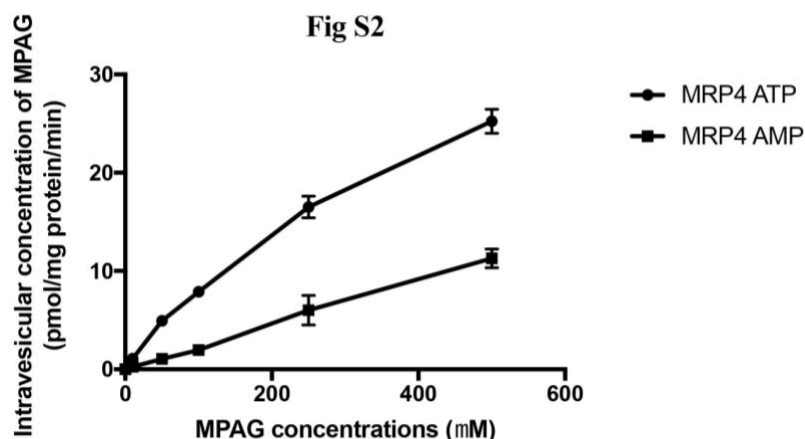


Figure S2: Concentration-dependent uptake of MPAG in MRP4 membrane vesicles. Vesicles were incubated for 35 min at 37°C with increasing MPAG concentrations. Addition of ATP (circles) but not AMP (square) stimulated the uptake of MPAG into MRP4 vesicles. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) (experiment performed in triplicate).

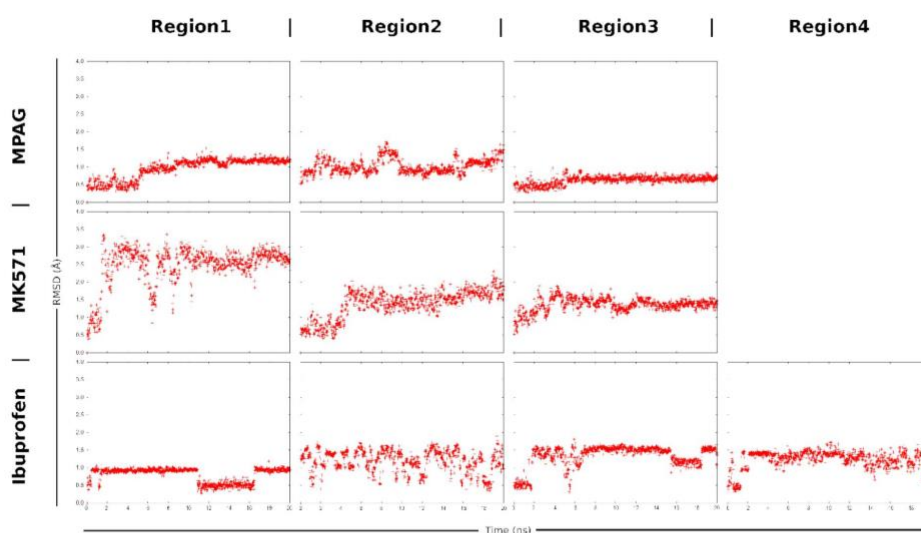


Figure S3: Evolution of the RMSD (root mean square deviation) of MPAG, MK571 and ibuprofen geometries along the 20 ns MD simulations, calculated with respect to the first frame, over the different regions. For ibuprofen in region 1, the jumps observed in between 0-2 ns and 11-16 ns occurred when the H-bond between ibuprofen and TRP995 was formed or broken. This H-bond appears relatively weak and the dynamics of the formation/breaking process was caught during the 20 ns simulation time.

Partie III. Discussion et perspectives

Dans nos travaux, nous avons notamment exploré les interactions entre le MPA et d'autres immunosuppresseurs.

Les modifications pharmacocinétiques du MPA en présence de ciclosporine ont été largement observées dans plusieurs études. Les conclusions générales de ces études indiquent que la ciclosporine n'affecte pas l'absorption du MPA mais interagirait plutôt sur la réabsorption (par le cycle entéro-hépatique) de son métabolite, l'acide mycophénolique β -D glucuronide (MPAG), ce qui entraîne une diminution du pic secondaire et donc de l'exposition au MPA [248].

La littérature suggère que les interactions médicamenteuses entre le MPA et la ciclosporine sont plus susceptibles de se produire au niveau de l'excrétion biliaire plutôt qu'au niveau de la glucuronidation hépatique [249]. Deux mécanismes contribuant à cette interaction médicamenteuse ont été proposés : la première est l'inhibition du transporteur biliaire MRP2 ; la deuxième est l'inhibition des transporteurs d'influx hépatiques, notamment les OATP par la ciclosporine [250–252]. Ainsi, en inhibant l'un ou l'autre de ces transporteurs, la ciclosporine diminuerait l'excrétion du MPAG dans la bile ce qui réduirait en conséquence la réabsorption ultérieure du MPA par le tractus gastro-intestinal [253,254]. D'ailleurs, une étude a montré que la ciclosporine a un effet inhibiteur sur MRP2 [250,251], alors qu'une autre plus récente est arrivée à une conclusion contradictoire [255]. Dans cette dernière étude, les auteurs ont utilisé un modèle cellulaire humain alors que les autres études utilisaient des modèles murins, ce qui peut avoir des conséquences en termes de quantité et de qualité de transporteurs.

De ce fait, les auteurs suggèrent que la ciclosporine inhibe l'influx hépatocytaire du MPAG par les OATP1B1/B3 plutôt que son efflux biliaire par MRP2. Cette hypothèse est aussi soutenue par le fait que la ciclosporine est un puissant inhibiteur de l'OATP1B3 et de l'OATP1B1 dans les cellules HEK-293 [256], alors qu'elle ne montre pas d'effet inhibiteur sur l'entrée du MPAG dans les vésicules humaines surexprimant MRP2 [255]. Cependant, de nouveaux travaux montrent que la ciclosporine peut inhiber le transport du MPAG médié par MRP2 dans des cellules HEK-293 [257].

Comme la ciclosporine est principalement excrétée dans la bile et que seule une petite fraction est éliminée par les reins [258], il n'est pas certain que cette interaction potentielle soit liée à une inhibition des transporteurs rénaux, d'autant plus que le MPAG est éliminé par les reins via les transporteurs OAT1 et OAT3 et que la ciclosporine n'a pas montré d'effet inhibiteur sur ces transporteurs [259,260].

De nombreuses études montrent que l'exposition globale au MPA chez les patients recevant du MMF avec des inhibiteurs de mTOR (sirolimus et évérolimus) est plus élevée que chez ceux prenant du MMF avec la ciclosporine [261–265]. Les résultats observés suggèrent que le sirolimus peut affecter l'exposition globale au MPA de manière différente à la ciclosporine, et qu'il ne modifie pas l'absorption du MPA [265]. Comme pour le sirolimus, des patients ayant reçu une greffe rénale et traités avec la combinaison d'évérolimus et de MMF présentaient des concentrations résiduelles et une AUC_{0-12h} significativement plus élevées que ceux traités avec la ciclosporine [266]. En accord avec ces observations cliniques, des études *in vitro* ont montré que le sirolimus et l'évérolimus n'affectent pas la glucuro-conjugaison hépatique du MPA dans des microsomes de foie humain [265], et qu'ils n'ont aucun effet inhibiteur sur le transport du MPAG médié par MRP2 [255]. Cependant, bien que le sirolimus et l'évérolimus montrent des effets inhibiteurs sur les principaux transporteurs OATP, notamment l'OATP1B3 et l'OATP1B1, dans les cellules HEK-293T, le degré d'inhibition par ces inhibiteurs mTOR dans le contexte clinique réel est nettement inférieur à celui de la ciclosporine [256]. Ainsi, il est peu probable que des interactions médicamenteuses entre les inhibiteurs mTOR et le MMF aient un impact significatif dans des contextes cliniques [256,267].

Une étude clinique a observé une diminution du cycle entéro-hépatique du MPA lorsque des AINS (nabumétone, célécoxib, diclofénac et acide acétylsalicylique) étaient administrés [268] chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique. Les conclusions de ces observations suggèrent que les AINS utilisés puissent inhiber l'efflux biliaire du MPAG par MRP2.

D'autre part, nos travaux montrent que plusieurs médicaments habituellement co-administrés (ibuprofène, céfazoline, céfotaxime et micafungine) chez le patient transplanté recevant du MPA peuvent inhiber le transport du MPAG du foie vers la circulation sanguine via le transporteur MRP4. Les conséquences d'une telle inhibition pourraient favoriser le transport du MPAG par MRP2 du foie vers la bile conduisant à une augmentation des concentrations de MPAG dans les intestins, et donc potentiellement reformer du MPA (par l'action du microbiote intestinal).

A ce niveau, plusieurs mécanismes sont évoqués pour expliquer la toxicité gastro-intestinale provoquée par le MPA ou son métabolite toxique l'Acyl-MPAG [269,270]. Parmi ces mécanismes, la formation d'Acyl-MPAG (AcMPAG) au niveau intestinal à partir du MPA pourrait conduire à la formation d'adduits protéiques [271]; lesquels peuvent directement interférer avec les fonctions cellulaires ou déclencher le système immunitaire, entraînant une hypersensibilité et des réactions auto-immunes. En effet, une étude a montré que des protéines provenant de foie et d'homogénats de colons de rat telles que les chaînes α et β de l'ATPase/ATP synthase, la protéine de liaison au sélénium de type 2 ainsi que la protéine

disulfite isomérase, pouvaient former des adduits avec l'AcMPAG [272]. Une autre étude tend à démontrer que l'AcMPAG est responsable de la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- α) [273]. De plus, dans les cellules du tractus gastro-intestinal, des formes d'UGT capables de générer des métabolites glucuronides d'AINS ont été détectées [274]. Une étude sur des microsomes intestinaux humains montre que les cellules du tractus gastro-intestinal peuvent produire à la fois du MPAG et de l'acyl-MPAG. Dans cette étude, les deux principales enzymes UGT1A9 et 2B7 étaient présentes dans les microsomes intestinaux et ont permis une production (faible) de MPAG inactif et d'acyl-MPAG [275]. Ainsi, la capacité des entérocytes à participer au métabolisme du MPA pourrait potentiellement entraîner la production locale d'acyl-MPAG conduisant à des effets toxiques directs sur le tractus gastro-intestinal.

Une autre hypothèse est de considérer le MPA comme directement toxique via l'inhibition de la synthèse des bases puriques dans l'intestin. Cependant, il est peu probable que l'effet local du MPA sur le tractus gastro-intestinal soit en réalité lié à son effet inhibiteur sur la quantité de purines des cellules intestinales. En effet, la lumière intestinale est riche en purines provenant des acides nucléiques libérés pendant la digestion, de sorte que les cellules du tractus intestinal sont essentiellement entourées de purines qu'elles peuvent ensuite absorber car leurs membranes sont perméables aux nucléosides [276]. En effet, les membranes des cellules de l'intestin grêle semblent posséder des transporteurs spécifiques pour les nucléosides [277] s'ajoutant à la diffusion passive des purines. Des modèles animaux ont montré que les nucléosides pénètrent dans l'épithélium intestinal via un processus médié par transport [278,279]. Ainsi, cela va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle le MPA exerce des effets toxiques sur l'intestin via son effet inhibiteur sur l'IMPDH, car la synthèse des purines ne constituerait pas une étape limitante de l'absorption locale de nucléosides dans la paroi intestinale. En conséquence, il semblerait plus probable que les perturbations de la fonction gastro-intestinale résultent plutôt d'un contact local direct entre le MPA et la paroi intestinale.

Les modifications du transport du MPAG pourraient donc être en lien avec la toxicité de l'acide mycophénolique, car plusieurs médicaments co-administrés ont montré une modification de son exposition.

Par exemple, une étude de phase I montre que l'AUC du MPA était augmentée de 35 % en présence d'isavuconazole. alors que l'AUC du MPAG était diminuée de 32 % [280]. Selon les auteurs, ces observations seraient attribuables à une diminution du métabolisme du MPA, l'isavuconazole étant un inhibiteur des UGT (*in vitro*).

Dans une autre étude menée chez des volontaires sains recevant du MMF, la co-administration de norfloxacine et de métronidazole montre une diminution significative de

l'AUC du MPA ainsi que du MPAG [281]. Cette observation s'explique par une diminution du cycle entéro-hépatique car les antibiotiques éliminent les bactéries responsables de la transformation du MPA en MPAG.

Une étude démontre une interaction entre le MPA et la rifampicine. Dans cette étude, l'utilisation de rifampicine montre une diminution de l'AUC_{0-12h}, AUC_{6-12h} ainsi que de la concentration résiduelle du MPA et une augmentation des concentrations de MPAG et d'Ac-MPAG [282]. Le mécanisme de cette interaction est probablement lié à une induction du métabolisme du MPA. En effet, la rifampicine est un inducteur des enzymes de la famille des UGT1A [283]. Inversement, plusieurs AINS, utilisés à des doses thérapeutiques ont montré qu'ils pouvaient inhiber *in vitro* la glucuro-conjugaison du MPA. En effet, en utilisant des microsomes de foie et de reins humains, il a été montré que l'acide niflumique peut fortement inhiber la glucuro-conjugaison du MPA. L'acide flufénamique, l'acide méfénamique et le diflunisal ont également inhibé la glucuronidation du MPA (jusqu'à 74 % pour le diflunisal) [284].

Conclusion

L'exposition aux médicaments immunosuppresseurs chez les patients transplantés est étroitement surveillée avec la mise en place du suivi thérapeutique pharmacologique qui permet d'ajuster les posologies sur la base des concentrations thérapeutiques. Certaines interactions médicamenteuses concernant les enzymes du métabolisme sont connues et peuvent donc être évitées. La P-gp, les OATP ainsi que les CYP3A4/5 jouent un rôle très important dans l'exposition aux inhibiteurs de la calcineurine (tacrolimus, ciclosporine) et aux inhibiteurs de mTOR (sirolimus, évérolimus). Pourtant, peu d'interactions médicamenteuses sont recensées concernant ces transporteurs.

Concernant le MPA, les voies de métabolisme et de transport sont complexes et mettent en jeu de nombreux métabolites, dont le MPAG. Ce dernier joue un rôle central dans l'exposition au MPA. Or, le MPAG est substrat de plusieurs transporteurs d'influx et d'efflux. Au niveau de la membrane hépato-biliaire, le MPAG est sécrété dans la bile par le transporteur MRP2 et subit une déconjugaison par le microbiote intestinal permettant de générer une quantité non négligeable de MPA pouvant être réabsorbé dans la circulation sanguine. Au niveau de la membrane baso-latérale des hépatocytes, le MPAG est transporté par le transporteur MRP4, contribuant ainsi au maintien de concentrations élevées dans le sang.

Certains médicaments potentiellement co-administrés avec le MMF tels que l'ibuprofène, la céfazoline, la micafungine et le céfotaxime peuvent inhiber ce transport (du foie vers le sang) et donc favoriser l'élimination biliaire du MPAG et ainsi accroître la toxicité locale gastro-intestinale du MPA. Ce résultat obtenu *in vitro* au cours de nos travaux, devra être confirmé par l'utilisation de modèle animaux adéquats ou par l'observation de cohortes de patients transplantés recevant du MMF et des inhibiteurs de MRP4, ou présentant des polymorphismes génétiques du gène *ABCC4*. D'autres transporteurs tel que MRP3 devraient également faire l'objet d'études approfondies afin d'apprécier leurs contributions au transport du MPAG.

La question de l'implication des transporteurs membranaires dans la toxicité des médicaments administrés chez le patient transplanté s'ajoute à la question des enzymes du métabolisme. Il est difficile de déterminer quel mécanisme a le plus d'importance dans l'exposition aux médicaments immunosuppresseurs et l'incidence de leur toxicité. Lorsque qu'une voie de métabolisme est majoritaire, bien que des voies alternatives puissent exister pour contrebalancer des phénomènes d'inhibition, anticiper ou corriger une toxicité peut être relativement simple. Cependant, pour les transporteurs membranaires, le phénomène est plus complexe, car au moins 2 phénomènes existent : (i) de nombreux transporteurs non apparentés, ou d'une même famille (MRP), peuvent prendre en charge les mêmes substrats ;

(ii) l'inhibition d'un transporteur entraîne généralement un phénomène de compensation par la surexpression d'un autre transporteur.

Références bibliographiques

- [1] R.L. Juliano, V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants., *Biochim. Biophys. Acta.* 455 (1976) 152–162.
- [2] M. Dean, A. Rzhetsky, R. Allikmets, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily., *Genome Res.* 11 (2001) 1156–1166.
- [3] A.H. Schinkel, J.W. Jonker, Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 3–29.
- [4] A.J. Slot, S.V. Molinski, S.P.C. Cole, Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs), *Essays Biochem.* 50 (2011) 179–207.
- [5] Y. Shitara, K. Maeda, K. Ikejiri, K. Yoshida, T. Horie, Y. Sugiyama, Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption., *Biopharm. Drug Dispos.* 34 (2013) 45–78.
- [6] M. Roth, A. Obaidat, B. Hagenbuch, OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies., *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 1260–1287.
- [7] O. Kis, K. Robillard, G.N.Y. Chan, R. Bendayan, The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters., *Trends Pharmacol. Sci.* 31 (2010) 22–35.
- [8] S.K. Nigam, What do drug transporters really do?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 29–44.
- [9] C.D. Klaassen, L.M. Aleksunes, Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation., *Pharmacol. Rev.* 62 (2010) 1–96.
- [10] D.R. de Waart, C.C. Paulusma, C. Kunne, R.P.J. Oude Elferink, Multidrug resistance associated protein 2 mediates transport of prostaglandin E₂., *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.* 26 (2006) 362–368.
- [11] D. Liu, L. Ji, X. Tong, B. Pan, J.-Y. Han, Y. Huang, Y.E. Chen, S. Pennathur, Y. Zhang, L. Zheng, Human apolipoprotein A-I induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I-2 release in endothelial cells through ATP-binding cassette transporter A1., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301 (2011) C739–48.
- [12] N. Kanai, R. Lu, J.A. Satriano, Y. Bao, A.W. Wolkoff, V.L. Schuster, Identification and characterization of a prostaglandin transporter., *Science.* 268 (1995) 866–869.
- [13] C. Sánchez-Moreno, J.F. Dashe, T. Scott, D. Thaler, M.F. Folstein, A. Martin, Decreased levels of plasma vitamin C and increased concentrations of inflammatory and oxidative stress markers after stroke., *Stroke.* 35 (2004) 163–168.
- [14] J. Davidson, H.T. Abul, A.S. Milton, D. Rotondo, Cytokines and cytokine inducers stimulate prostaglandin E₂ entry into the brain., *Pflugers Arch.* 442 (2001) 526–533.
- [15] S. Akanuma, K. Hosoya, S. Ito, M. Tachikawa, T. Terasaki, S. Ohtsuki, Involvement of multidrug resistance-associated protein 4 in efflux transport of prostaglandin E₂ across mouse blood-brain barrier and its inhibition by intravenous administration of cephalosporins., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333 (2010) 912–919.
- [16] M. Tachikawa, K. Hosoya, T. Terasaki, Pharmacological significance of prostaglandin E₂ and D₂ transport at the brain barriers., *Adv. Pharmacol. San Diego Calif.* 71 (2014) 337–360.
- [17] M. Tachikawa, G. Ozeki, T. Higuchi, S. Akanuma, K. Tsuji, K. Hosoya, Role of the blood-cerebrospinal fluid barrier transporter as a cerebral clearance system for prostaglandin E₂ produced in the brain., *J. Neurochem.* 123 (2012) 750–760.
- [18] M. Tachikawa, K. Tsuji, R. Yokoyama, T. Higuchi, G. Ozeki, A. Yashiki, S. Akanuma, K. Hayashi, A. Nishiura, K. Hosoya, A clearance system for prostaglandin D₂, a sleep-promoting factor, in cerebrospinal fluid: role of the blood-cerebrospinal barrier transporters., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343 (2012) 608–616.
- [19] S. Akanuma, Y. Uchida, S. Ohtsuki, M. Tachikawa, T. Terasaki, K. Hosoya, Attenuation of prostaglandin E₂ elimination across the mouse blood-brain barrier in

lipopolysaccharide-induced inflammation and additive inhibitory effect of cefmetazole., *Fluids Barriers CNS*. 8 (2011) 24–11.

- [20] K. Oizumi, K. Onuma, A. Watanabe, M. Motomiya, Clinical study of drug fever induced by parenteral administration of antibiotics., *Tohoku J. Exp. Med.* 159 (1989) 45–56.
- [21] S. Wilartratsami, P. Jutasompakorn, P. Luksanapruksa, Cefazolin-related fever in postoperative spine surgery: a case report., *J. Med. Assoc. Thai. Chotmaiht Thangphaet*. 97 Suppl 9 (2014) S144–8.
- [22] V.S. Guleria, M. Dhillon, S. Gill, N. Naithani, Ceftriaxone induced drug rash with eosinophilia and systemic symptoms., *J. Res. Pharm. Pract.* 3 (2014) 72–74.
- [23] K. Shiraya, T. Hirata, R. Hatano, S. Nagamori, P. Wiriyasermkul, P. Jutabha, M. Matsubara, S. Muto, H. Tanaka, S. Asano, N. Anzai, H. Endou, A. Yamada, H. Sakurai, Y. Kanai, A novel transporter of SLC22 family specifically transports prostaglandins and co-localizes with 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in renal proximal tubules., *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 22141–22151.
- [24] A. Gessner, J. König, M.F. Fromm, Clinical Aspects of Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions., *Clin. Pharmacol. Ther.* 105 (2019) 1386–1394.
- [25] A. Asberg, A. Hartmann, E. Fjelds'aa, S. Bergan, H. Holdaas, Bilateral pharmacokinetic interaction between cyclosporine A and atorvastatin in renal transplant recipients., *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 1 (2001) 382–386.
- [26] M. Hermann, A. Asberg, H. Christensen, H. Holdaas, A. Hartmann, J.L.E. Reubsaet, Substantially elevated levels of atorvastatin and metabolites in cyclosporine-treated renal transplant recipients., *Clin. Pharmacol. Ther.* 76 (2004) 388–391.
- [27] W.P.D. Lemahieu, M. Hermann, A. Asberg, K. Verbeke, H. Holdaas, Y. Vanrenterghem, B.D. Maes, Combined therapy with atorvastatin and calcineurin inhibitors: no interactions with tacrolimus., *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5 (2005) 2236–2243.
- [28] W. Mück, I. Mai, L. Fritsche, K. Ochmann, G. Rohde, S. Unger, A. Johne, S. Bauer, K. Budde, I. Roots, H.H. Neumayer, J. Kuhlmann, Increase in cerivastatin systemic exposure after single and multiple dosing in cyclosporine-treated kidney transplant recipients., *Clin. Pharmacol. Ther.* 65 (1999) 251–261.
- [29] J.W. Park, R. Siekmeier, P. Lattke, M. Merz, C. Mix, S. Schüler, W. Jaross, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluvastatin in heart transplant recipients taking cyclosporine A., *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 6 (2001) 351–361.
- [30] C. Olbricht, C. Wanner, T. Eisenhauer, V. Kliem, R. Doll, M. Boddaert, P. O'Grady, M. Krekler, B. Mangold, U. Christians, Accumulation of lovastatin, but not pravastatin, in the blood of cyclosporine-treated kidney graft patients after multiple doses., *Clin. Pharmacol. Ther.* 62 (1997) 311–321.
- [31] M.B. Regazzi, I. Iacona, C. Campana, V. Raddato, C. Lesi, G. Perani, A. Gavazzi, M. Viganò, Altered disposition of pravastatin following concomitant drug therapy with cyclosporin A in transplant recipients., *Transplant. Proc.* 25 (1993) 2732–2734.
- [32] M. Hedman, P.J. Neuvonen, M. Neuvonen, C. Holmberg, M. Antikainen, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin in pediatric and adolescent cardiac transplant recipients on a regimen of triple immunosuppression., *Clin. Pharmacol. Ther.* 75 (2004) 101–109.
- [33] S.G. Simonson, A. Raza, P.D. Martin, P.D. Mitchell, J.A. Jarcho, C.D.A. Brown, A.S. Windass, D.W. Schneck, Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine., *Clin. Pharmacol. Ther.* 76 (2004) 167–177.
- [34] M. Arnadottir, L.O. Eriksson, H. Thysell, J.D. Karkas, Plasma concentration profiles of simvastatin 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase inhibitory activity in kidney transplant recipients with and without ciclosporin., *Nephron.* 65 (1993) 410–413.
- [35] N. Ichimaru, S. Takahara, Y. Kokado, J.D. Wang, M. Hatori, H. Kameoka, T. Inoue, A. Okuyama, Changes in lipid metabolism and effect of simvastatin in renal transplant recipients induced by cyclosporine or tacrolimus., *Atherosclerosis.* 158 (2001) 417–423.

- [36] P.J. Neuvonen, M. Niemi, J.T. Backman, Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance., *Clin. Pharmacol. Ther.* 80 (2006) 565–581.
- [37] M. Niemi, J.T. Backman, L.I. Kajosaari, J.B. Leathart, M. Neuvonen, A.K. Daly, M. Eichelbaum, K.T. Kivistö, P.J. Neuvonen, Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics., *Clin. Pharmacol. Ther.* 77 (2005) 468–478.
- [38] L.I. Kajosaari, M. Niemi, M. Neuvonen, J. Laitila, P.J. Neuvonen, J.T. Backman, Cyclosporine markedly raises the plasma concentrations of repaglinide., *Clin. Pharmacol. Ther.* 78 (2005) 388–399.
- [39] I. Binet, A. Wallnöfer, C. Weber, R. Jones, G. Thiel, Renal hemodynamics and pharmacokinetics of bosentan with and without cyclosporine A., *Kidney Int.* 57 (2000) 224–231.
- [40] P.L.M. van Giersbergen, A. Halabi, J. Dingemanse, Single- and multiple-dose pharmacokinetics of bosentan and its interaction with ketoconazole., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 53 (2002) 589–595.
- [41] A. Treiber, R. Schneiter, S. Delahaye, M. Clozel, Inhibition of organic anion transporting polypeptide-mediated hepatic uptake is the major determinant in the pharmacokinetic interaction between bosentan and cyclosporin A in the rat., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308 (2004) 1121–1129.
- [42] A. Treiber, R. Schneiter, S. Häusler, B. Stieger, Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 35 (2007) 1400–1407.
- [43] R.H. Mathijssen, R.J. van Alphen, J. Verweij, W.J. Loos, K. Nooter, G. Stoter, A. Sparreboom, Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11)., *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7 (2001) 2182–2194.
- [44] T. Nozawa, H. Minami, S. Sugiura, A. Tsuji, I. Tamai, Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 33 (2005) 434–439.
- [45] X. Xiang, S.R. Jada, H.H. Li, L. Fan, L.S. Tham, C.I. Wong, S.C. Lee, R. Lim, Q.Y. Zhou, B.C. Goh, E.H. Tan, B. Chowbay, Pharmacogenetics of SLCO1B1 gene and the impact of *1b and *15 haplotypes on irinotecan disposition in Asian cancer patients., *Pharmacogenet. Genomics.* 16 (2006) 683–691.
- [46] F. Innocenti, S.D. Undevia, J. Ramírez, S. Mani, R.L. Schilsky, N.J. Vogelzang, M. Prado, M.J. Ratain, A phase I trial of pharmacologic modulation of irinotecan with cyclosporine and phenobarbital., *Clin. Pharmacol. Ther.* 76 (2004) 490–502.
- [47] J.D. Chester, S.P. Joel, S.L. Cheeseman, G.D. Hall, M.S. Braun, J. Perry, T. Davis, C.J. Button, M.T. Seymour, Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral cyclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer., *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21 (2003) 1125–1132.
- [48] L. Agius, Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism., *Biochem. J.* 414 (2008) 1–18.
- [49] A. Bergman, Y.-A. Bi, S. Mathialagan, J. Litchfield, D.J. Kazierad, J.A. Pfefferkorn, M.V.S. Varma, Effect of Hepatic Organic Anion-Transporting Polypeptide 1B Inhibition and Chronic Kidney Disease on the Pharmacokinetics of a Liver-Targeted Glucokinase Activator: A Model-Based Evaluation., *Clin. Pharmacol. Ther.* 106 (2019) 792–802.
- [50] S. Ouwerkerk-Mahadevan, J. Snoeys, M. Peeters, M. Beumont-Mauviel, A. Simion, Drug-Drug Interactions with the NS3/4A Protease Inhibitor Simeprevir., *Clin. Pharmacokinet.* 55 (2016) 197–208.
- [51] B.J. Brennan, S.A. Moreira, P.N. Morcos, M.T. Navarro, J. Asthappan, P. Goelzer, P. Weigl, P.F. Smith, Pharmacokinetics of a three-way drug interaction between danoprevir, ritonavir and the organic anion transporting polypeptide (OATP) inhibitor cyclosporin., *Clin. Pharmacokinet.* 52 (2013) 805–813.
- [52] S. Vaidyanathan, G. Camenisch, H. Schuetz, C. Reynolds, C.-M. Yeh, M.-N. Bizot,

- H.-A. Dieterich, D. Howard, W.P. Dole, Pharmacokinetics of the oral direct renin inhibitor aliskiren in combination with digoxin, atorvastatin, and ketoconazole in healthy subjects: the role of P-glycoprotein in the disposition of aliskiren., *J. Clin. Pharmacol.* 48 (2008) 1323–1338.
- [53] T. Tapaninen, J.T. Backman, K.J. Kurkinen, P.J. Neuvonen, M. Niemi, Itraconazole, a P-glycoprotein and CYP3A4 inhibitor, markedly raises the plasma concentrations and enhances the renin-inhibiting effect of aliskiren., *J. Clin. Pharmacol.* 51 (2011) 359–367.
- [54] S. Rebello, S. Compain, A. Feng, S. Hariry, H.-A. Dieterich, V. Jarugula, Effect of cyclosporine on the pharmacokinetics of aliskiren in healthy subjects., *J. Clin. Pharmacol.* 51 (2011) 1549–1560.
- [55] I.A. de Lannoy, M. Silverman, The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189 (1992) 551–557.
- [56] A.H. Schinkel, E. Wagenaar, L. van Deemter, C.A. Mol, P. Borst, Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A., *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 1698–1705.
- [57] P. Dorian, M. Strauss, C. Cardella, T. David, S. East, R. Ogilvie, Digoxin-cyclosporine interaction: severe digitalis toxicity after cyclosporine treatment., *Clin. Investig. Med. Med. Clin. Exp.* 11 (1988) 108–112.
- [58] I. Robieux, P. Dorian, J. Klein, D. Chung, D. Zborowska-Sluis, R. Ogilvie, G. Koren, The effects of cardiac transplantation and cyclosporine therapy on digoxin pharmacokinetics., *J. Clin. Pharmacol.* 32 (1992) 338–343.
- [59] K. Westphal, A. Weinbrenner, T. Giessmann, M. Stuhr, G. Franke, M. Zschesche, R. Oertel, B. Terhaag, H.K. Kroemer, W. Siegmund, Oral bioavailability of digoxin is enhanced by talinolol: evidence for involvement of intestinal P-glycoprotein., *Clin. Pharmacol. Ther.* 68 (2000) 6–12.
- [60] N. Okamura, M. Hirai, Y. Tanigawara, K. Tanaka, M. Yasuhara, K. Ueda, T. Komano, R. Hori, Digoxin-cyclosporin A interaction: modulation of the multidrug transporter P-glycoprotein in the kidney., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266 (1993) 1614–1619.
- [61] A. Dahan, H. Sabit, G.L. Amidon, Multiple efflux pumps are involved in the transepithelial transport of colchicine: combined effect of p-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 leads to decreased intestinal absorption throughout the entire small intestine., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37 (2009) 2028–2036.
- [62] T. Tateishi, P. Soucek, Y. Caraco, F.P. Guengerich, A.J. Wood, Colchicine biotransformation by human liver microsomes. Identification of CYP3A4 as the major isoform responsible for colchicine demethylation., *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997) 111–116.
- [63] S. Wason, J.L. Digiacinto, M.W. Davis, Effect of cyclosporine on the pharmacokinetics of colchicine in healthy subjects., *Postgrad. Med.* 124 (2012) 189–196.
- [64] C. Garrouste, C. Philipponnet, S. Kaysi, I. Enache, A. Tiple, A.E. Heng, Severe colchicine intoxication in a renal transplant recipient on cyclosporine., *Transplant. Proc.* 44 (2012) 2851–2852.
- [65] R. Bouquié, G. Deslandes, C. Renaud, E. Dailly, A. Haloun, P. Jolliet, Colchicine-induced rhabdomyolysis in a heart/lung transplant patient with concurrent use of cyclosporin, pravastatin, and azithromycin., *J. Clin. Rheumatol. Pract. Rep. Rheum. Musculoskelet. Dis.* 17 (2011) 28–30.
- [66] R.A. Terkeltaub, D.E. Furst, J.L. Digiacinto, K.A. Kook, M.W. Davis, Novel evidence-based colchicine dose-reduction algorithm to predict and prevent colchicine toxicity in the presence of cytochrome P450 3A4/P-glycoprotein inhibitors., *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 2226–2237.
- [67] K. Nooter, G. Stoter, Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy., *Pathol. Res. Pract.* 192 (1996) 768–780.
- [68] D. Nielsen, C. Maare, T. Skovsgaard, Cellular resistance to anthracyclines., *Gen. Pharmacol.* 27 (1996) 251–255.
- [69] J.S. Lagas, L. Fan, E. Wagenaar, M.L.H. Vlaming, O. van Tellingen, J.H. Beijnen, A.H. Schinkel, P-glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the

pharmacokinetics of etoposide., *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16 (2010) 130–140.

[70] J. CárceI-Trullols, F. Torres-Molina, A. Araico, A. Saadeddin, J.E. Peris, Effect of cyclosporine A on the tissue distribution and pharmacokinetics of etoposide., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54 (2004) 153–160.

[71] B.L. Lum, S. Kaubisch, A.M. Yahanda, K.M. Adler, L. Jew, M.N. Ehsan, N.A. Brophy, J. Halsey, M.P. Gosland, B.I. Sikic, Alteration of etoposide pharmacokinetics and pharmacodynamics by cyclosporine in a phase I trial to modulate multidrug resistance., *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 10 (1992) 1635–1642.

[72] N.L. Bartlett, B.L. Lum, G.A. Fisher, N.A. Brophy, M.N. Ehsan, J. Halsey, B.I. Sikic, Phase I trial of doxorubicin with cyclosporine as a modulator of multidrug resistance., *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 12 (1994) 835–842.

[73] C. Erlichman, M. Moore, J.J. Thiessen, I.G. Kerr, S. Walker, P. Goodman, G. Bjarnason, C. DeAngelis, P. Bunting, Phase I pharmacokinetic study of cyclosporin A combined with doxorubicin., *Cancer Res.* 53 (1993) 4837–4842.

[74] T. Saito, Z.-J. Zhang, T. Ohtsubo, I. Noda, M. Tokuriki, Y. Shibamori, T. Yamamoto, H. Saito, Inhibitory effect of cyclosporin A on p-glycoprotein function in peripheral nerves of mice treated with doxorubicin and vinblastine., *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*. 124 (2004) 313–317.

[75] S.A. Veltkamp, C. Alderden-Los, A. Sharma, H. Rosing, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, A pharmacokinetic and safety study of a novel polymeric paclitaxel formulation for oral application., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 59 (2007) 43–50.

[76] J.M. Meerum Terwogt, M.M. Malingré, J.H. Beijnen, W.W. ten Bokkel Huinink, H. Rosing, F.J. Koopman, O. van Tellingen, M. Swart, J.H. Schellens, Coadministration of oral cyclosporin A enables oral therapy with paclitaxel., *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5 (1999) 3379–3384.

[77] M.M. Malingré, J.M. Terwogt, J.H. Beijnen, H. Rosing, F.J. Koopman, O. van Tellingen, K. Duchin, W.W. Huinink, M. Swart, J. Lieverst, J.H. Schellens, Phase I and pharmacokinetic study of oral paclitaxel., *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18 (2000) 2468–2475.

[78] A.A. El Ela, S. Härtter, U. Schmitt, C. Hiemke, H. Spahn-Langguth, P. Langguth, Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds—implications for pharmacokinetics of selected substrates., *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (2004) 967–975.

[79] U. Schmitt, A. Abou El-Ela, L.J. Guo, H. Glavinas, P. Krajcsi, J.M. Baron, C. Tillmann, C. Hiemke, P. Langguth, S. Härtter, Cyclosporine A (CsA) affects the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the atypical antipsychotic amisulpride probably via inhibition of P-glycoprotein (P-gp)., *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996. 113 (2006) 787–801.

[80] K. Tsujikawa, Y. Dan, K. Nogawa, H. Sato, Y. Yamada, H. Murakami, H. Ohtani, Y. Sawada, T. Iga, Potentiation of domperidone-induced catalepsy by a P-glycoprotein inhibitor, cyclosporin A., *Biopharm. Drug Dispos.* 24 (2003) 105–114.

[81] G.K. Dresser, J.D. Spence, D.G. Bailey, Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition., *Clin. Pharmacokinet.* 38 (2000) 41–57.

[82] M. Dorababu, A. Nishimura, T. Prabha, K. Naruhashi, N. Sugioka, K. Takada, N. Shibata, Effect of cyclosporine on drug transport and pharmacokinetics of nifedipine., *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 63 (2009) 697–702.

[83] X.D. Liu, L. Zhang, L. Xie, Effect of P-glycoprotein inhibitors erythromycin and cyclosporin A on brain pharmacokinetics of nimodipine in rats., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 28 (2003) 309–313.

[84] C.-P. Yu, P.-P. Wu, Y.-C. Hou, S.-P. Lin, S.-Y. Tsai, C.-T. Chen, P.-D.L. Chao, Quercetin and rutin reduced the bioavailability of cyclosporine from Neoral, an immunosuppressant, through activating P-glycoprotein and CYP 3A4., *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 4644–4648.

[85] V.L. Oliveira-Freitas, T. Dalla Costa, R.C. Manfro, L.B. Cruz, G. Schwartzmann,

- Influence of purple grape juice in cyclosporine bioavailability., *J. Ren. Nutr. Off. J. Counc. Ren. Nutr. Natl. Kidney Found.* 20 (2010) 309–313.
- [86] B.J. Kirby, J.D. Unadkat, Grapefruit juice, a glass full of drug interactions?, *Clin. Pharmacol. Ther.* 81 (2007) 631–633. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100185>.
- [87] J. Grenier, C. Fradette, G. Morelli, G.J. Merritt, M. Vrandeć, M.P. Ducharme, Pomelo juice, but not cranberry juice, affects the pharmacokinetics of cyclosporine in humans., *Clin. Pharmacol. Ther.* 79 (2006) 255–262.
- [88] F.M. Bader, M.E. Hagan, J.A. Crompton, E.M. Gilbert, The effect of beta-blocker use on cyclosporine level in cardiac transplant recipients., *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 24 (2005) 2144–2147.
- [89] K. Takara, T. Sakaeda, K. Okumura, Carvedilol: a new candidate for reversal of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance., *Anticancer. Drugs.* 15 (2004) 303–309.
- [90] S. Yigitaslan, K. Erol, C. Cengelli, The Effect of P-Glycoprotein Inhibition and Activation on the Absorption and Serum Levels of Cyclosporine and Tacrolimus in Rats., *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.* 25 (2016) 237–242.
- [91] K. Miyake, L. Mickley, T. Litman, Z. Zhan, R. Robey, B. Cristensen, M. Brangi, L. Greenberger, M. Dean, T. Fojo, S.E. Bates, Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes., *Cancer Res.* 59 (1999) 8–13.
- [92] D.D. Ross, W. Yang, L.V. Abruzzo, W.S. Dalton, E. Schneider, H. Lage, M. Dietel, L. Greenberger, S.P. Cole, L.A. Doyle, Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines., *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (1999) 429–433.
- [93] L.A. Doyle, W. Yang, L.V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A.K. Rishi, D.D. Ross, A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 15665–15670.
- [94] R. Allikmets, L.M. Schriml, A. Hutchinson, V. Romano-Spica, M. Dean, A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance., *Cancer Res.* 58 (1998) 5337–5339.
- [95] J.S. Lee, S. Scala, Y. Matsumoto, B. Dickstein, R. Robey, Z. Zhan, G. Altenberg, S.E. Bates, Reduced drug accumulation and multidrug resistance in human breast cancer cells without associated P-glycoprotein or MRP overexpression., *J. Cell. Biochem.* 65 (1997) 513–526.
- [96] M. Maliepaard, M.A. van Gastelen, L.A. de Jong, D. Pluim, R.C. van Waardenburg, M.C. Ruevekamp-Helmers, B.G. Floot, J.H. Schellens, Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line., *Cancer Res.* 59 (1999) 4559–4563.
- [97] L.A. Doyle, D.D. Ross, Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2), *Oncogene.* 22 (2003) 7340–7358.
- [98] M. Maliepaard, G.L. Scheffer, I.F. Faneyte, M.A. van Gastelen, A.C. Pijnenborg, A.H. Schinkel, M.J. van De Vijver, R.J. Scheper, J.H. Schellens, Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues., *Cancer Res.* 61 (2001) 3458–3464.
- [99] M. Qadir, K.L. O’Loughlin, S.M. Fricke, N.A. Williamson, W.R. Greco, H. Minderman, M.R. Baer, Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator., *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11 (2005) 2320–2326.
- [100] A. Gupta, Y. Dai, R.R. Vethanayagam, M.F. Hebert, K.E. Thummel, J.D. Unadkat, D.D. Ross, Q. Mao, Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58 (2006) 374–383.
- [101] V. Aslanis, J. Zhang, B. Lomeli, K. Grosch, T. Ouatas, Effect of cyclosporine coadministration on the pharmacokinetics of eltrombopag in healthy volunteers., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 82 (2018) 847–855.
- [102] L. Wang, D. Zhang, N. Raghavan, M. Yao, L. Ma, C.E. Frost, C.A. Frost, B.D.

- Maxwell, S. Chen, K. He, T.C. Goosen, W.G. Humphreys, S.J. Grossman, In vitro assessment of metabolic drug-drug interaction potential of apixaban through cytochrome P450 phenotyping, inhibition, and induction studies., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 38 (2010) 448–458.
- [103] D. Zhang, K. He, J.J. Herbst, J. Kolb, W. Shou, L. Wang, P.V. Balimane, Y.-H. Han, J. Gan, C.E. Frost, W.G. Humphreys, Characterization of efflux transporters involved in distribution and disposition of apixaban., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 41 (2013) 827–835.
- [104] B. Bashir, D.F. Stickle, I. Chervoneva, W.K. Kraft, Drug-Drug Interaction Study of Apixaban with Cyclosporine and Tacrolimus in Healthy Volunteers., *Clin. Transl. Sci.* 11 (2018) 590–596.
- [105] C. Zhou, X. Li, W. Du, Y. Feng, X. Kong, Y. Li, L. Xiao, P. Zhang, Antitumor effects of ginkgolic acid in human cancer cell occur via cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis., *Chemotherapy.* 56 (2010) 393–402.
- [106] H. Itokawa, N. Totsuka, K. Nakahara, M. Maezuru, K. Takeya, M. Kondo, M. Inamatsu, H. Morita, A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long-chain phenols from *Ginkgo biloba* L., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 37 (1989) 1619–1621.
- [107] X. Yang, J. Chen, Z. Qian, T. Guo, [Study on the antibacterial activity of ginkgolic acids]., *Zhong Yao Cai Zhongyaocai J. Chin. Med. Mater.* 25 (2002) 651–653.
- [108] L. Li, Q.-Q. Yao, S.-Y. Xu, H.-H. Hu, Q. Shen, Y. Tian, L.-Y. Pan, H. Zhou, H. Jiang, C. Lu, L.-S. Yu, S. Zeng, Cyclosporin A affects the bioavailability of ginkgolic acids via inhibition of P-gp and BCRP., *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV.* 88 (2014) 759–767.
- [109] T. Saeki, K. Ueda, Y. Tanigawara, R. Hori, T. Komano, Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506., *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 6077–6080.
- [110] H. Saitoh, Y. Saikachi, M. Kobayashi, M. Yamaguchi, M. Oda, Y. Yuhki, K. Achiwa, K. Tadano, Y. Takahashi, B.J. Aungst, Limited interaction between tacrolimus and P-glycoprotein in the rat small intestine., *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 28 (2006) 34–42.
- [111] D.A. Pierce, A.M. Reeves-Daniel, Ranolazine-tacrolimus interaction., *Ann. Pharmacother.* 44 (2010) 1844–1849.
- [112] M. Jerling, Clinical pharmacokinetics of ranolazine., *Clin. Pharmacokinet.* 45 (2006) 469–491.
- [113] L.C. Floren, I. Bekersky, L.Z. Benet, Q. Mekki, D. Dressler, J.W. Lee, J.P. Roberts, M.F. Hebert, Tacrolimus oral bioavailability doubles with coadministration of ketoconazole., *Clin. Pharmacol. Ther.* 62 (1997) 41–49.
- [114] S. Tuteja, R.R. Alloway, J.A. Johnson, A.O. Gaber, The effect of gut metabolism on tacrolimus bioavailability in renal transplant recipients., *Transplantation.* 71 (2001) 1303–1307.
- [115] N. Watanabe, H. Higashi, S. Nakamura, K. Nomura, Y. Adachi, M. Taguchi, The possible clinical impact of risperidone on P-glycoprotein-mediated transport of tacrolimus: A case report and in vitro study., *Biopharm. Drug Dispos.* 39 (2018) 30–37.
- [116] T. Shiraga, H. Matsuda, K. Nagase, K. Iwasaki, K. Noda, H. Yamazaki, T. Shimada, Y. Funae, Metabolism of FK506, a potent immunosuppressive agent, by cytochrome P450 3A enzymes in rat, dog and human liver microsomes., *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994) 727–735.
- [117] R.K. Drobitch, R.A. McLellan, K.W. Renton, Amlodipine inhibits rat microsomal cytochrome P450-mediated drug biotransformation., *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 1501–1503.
- [118] M. Katoh, M. Nakajima, H. Yamazaki, T. Yokoi, Inhibitory potencies of 1,4-dihydropyridine calcium antagonists to P-glycoprotein-mediated transport: comparison with the effects on CYP3A4., *Pharm. Res.* 17 (2000) 1189–1197.
- [119] Y. Zhou, B. Zhang, J. Li, X. Zuo, H. Yuan, G. Yang, Z. Cheng, Z. Liu, P. Li, H. Tan, L. Zhou, C. Wang, M. Yang, Effect of amlodipine on the pharmacokinetics of tacrolimus in rats., *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 43 (2013) 699–704.
- [120] M.D. Pescovitz, R. Bloom, J. Pirsch, J. Johnson, S. Gelone, S.A. Villano, A

randomized, double-blind, pharmacokinetic study of oral maribavir with tacrolimus in stable renal transplant recipients., *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9 (2009) 2324–2330.

[121] S. Falkowski, J.-B. Woillard, Therapeutic Drug Monitoring of Everolimus in Oncology: Evidences and Perspectives., *Ther. Drug Monit.* 41 (2019) 568–574.

[122] A. Crowe, A. Bruelisauer, L. Duerr, P. Guntz, M. Lemaire, Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 27 (1999) 627–632.

[123] W. Jacobsen, N. Serkova, B. Hausen, R.E. Morris, L.Z. Benet, U. Christians, Comparison of the in vitro metabolism of the macrolide immunosuppressants sirolimus and RAD., *Transplant. Proc.* 33 (2001) 514–515.

[124] C. Chu, C. Abbara, M.S. Noël-Hudson, L. Thomas-Bourgneuf, P. Gonin, R. Farinotti, L. Bonhomme-Faivre, Disposition of everolimus in *mdr1a/-1b-* mice and after a pre-treatment of lapatinib in Swiss mice., *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 1629–1634.

[125] S.M. Gadgeel, D.L. Lew, T.W. Synold, P. LoRusso, V. Chung, S.D. Christensen, D.C. Smith, L. Kingsbury, A. Hoering, R. Kurzrock, Phase I study evaluating the combination of lapatinib (a Her2/Neu and EGFR inhibitor) and everolimus (an mTOR inhibitor) in patients with advanced cancers: South West Oncology Group (SWOG) Study S0528., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 72 (2013) 1089–1096.

[126] F. Pea, P. Cojutti, V. Tursi, U. Livi, M. Baraldo, Everolimus overexposure in a heart transplant patient receiving clarithromycin for the treatment of pneumonia., *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 17 (2015) 926–928.

[127] A.R. Miesner, M. Ausman, B. Dagraedt, J. Zieminski, Probable Drug Interaction Between Everolimus and Clarithromycin., *Ann. Pharmacother.* 50 (2016) 689–690.

[128] S. Homma, K.-I. Takahashi, S. Nihei, F. Kato, S. Sugihara, S. Nunoda, The successful management of respiratory complications with long-term, low-dose macrolide administration in pediatric heart transplant recipients., *Int. Heart. J.* 55 (2014) 560–563.

[129] J.M. Kovarik, D. Beyer, M.N. Bizot, Q. Jiang, M.J. Allison, R.L. Schmouder, Pharmacokinetic interaction between verapamil and everolimus in healthy subjects., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 60 (2005) 434–437.

[130] S. Lefevre, S. Rebaudet, E.M. Billaud, B. Wyplosz, Management of rifamycins-everolimus drug-drug interactions in a liver-transplant patient with pulmonary tuberculosis., *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 25 (2012) e120–3.

[131] American Thoracic Society, CDC, Infectious Diseases Society of America, Treatment of tuberculosis., 2003.

[132] J.M. Kovarik, S. Hartmann, J. Figueiredo, M. Rouilly, A. Port, C. Rordorf, Effect of rifampin on apparent clearance of everolimus., *Ann. Pharmacother.* 36 (2002) 981–985.

[133] B. Reinach, G. de Sousa, P. Dostert, R. Ings, J. Gugenheim, R. Rahmani, Comparative effects of rifabutin and rifampicin on cytochromes P450 and UDP-glucuronosyl-transferases expression in fresh and cryopreserved human hepatocytes, *Chem. Biol. Interact.* 121 (1999) 37–48. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(99\)00089-7](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(99)00089-7).

[134] A. Weber, M. Kaplan, S.A. Chughtai, L.A. Cohn, A.L. Smith, J.D. Unadkat, CYP3A inductive potential of the rifamycins, rifabutin and rifampin, in the rabbit, *Biopharm. Drug Dispos.* 22 (2001) 157–168. <https://doi.org/10.1002/bdd.268>.

[135] M.C. Verdier, S. Patrat-Delon, F. Lemaitre, M. Revest, J. Rivalan, C. Michelet, E. Bellissant, Suspicion of interaction between maribavir and everolimus in a renal transplant recipient., *Transplantation.* 98 (2014) e20–1.

[136] A. Broniscer, J.N. Baker, M. Tagen, A. Onar-Thomas, R.J. Gilbertson, A.M. Davidoff, A.S. Pai Panandiker, A.P. Panandiker, W. Leung, T.K. Chin, C.F. Stewart, M. Kocak, C. Rowland, T.E. Merchant, S.C. Kaste, A. Gajjar, Phase I study of vandetanib during and after radiotherapy in children with diffuse intrinsic pontine glioma., *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28 (2010) 4762–4768.

[137] J. Drappatz, A.D. Norden, E.T. Wong, L.M. Doherty, D.C. Lafrankie, A. Ciampa, S. Kesari, C. Sceppa, M. Gerard, P. Phan, D. Schiff, T.T. Batchelor, K.L. Ligon, G. Young, A. Muzikansky, S.E. Weiss, P.Y. Wen, Phase I study of vandetanib with radiotherapy and

- temozolomide for newly diagnosed glioblastoma., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 78 (2010) 85–90.
- [138] M. Minocha, V. Khurana, B. Qin, D. Pal, A.K. Mitra, Co-administration strategy to enhance brain accumulation of vandetanib by modulating P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediated efflux with m-TOR inhibitors., *Int. J. Pharm.* 434 (2012) 306–314.
- [139] M.E. Pavel, C. Becerra, K. Grosch, W. Cheung, J. Hasskarl, J.C. Yao, Effect of everolimus on the pharmacokinetics of octreotide long-acting repeatable in patients with advanced neuroendocrine tumors: An analysis of the randomized phase III RADIANT-2 trial., *Clin. Pharmacol. Ther.* 101 (2017) 462–468.
- [140] K. McKeage, S. Cheer, A.J. Wagstaff, Octreotide long-acting release (LAR): a review of its use in the management of acromegaly., *Drugs.* 63 (2003) 2473–2499.
- [141] T. Yamada, K. Niinuma, M. Lemaire, T. Terasaki, Y. Sugiyama, Carrier-mediated hepatic uptake of the cationic cyclopeptide, octreotide, in rats. Comparison between in vivo and in vitro., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 25 (1997) 536–543.
- [142] H. Gutmann, D.S. Miller, A. Droulle, J. Drewe, A. Fahr, G. Fricker, P-glycoprotein- and mrp2-mediated octreotide transport in renal proximal tubule., *Br. J. Pharmacol.* 129 (2000) 251–256.
- [143] A. Lampen, Y. Zhang, I. Hackbarth, L.Z. Benet, K.F. Sewing, U. Christians, Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285 (1998) 1104–1112.
- [144] A. Crowe, M. Lemaire, In vitro and in situ absorption of SDZ-RAD using a human intestinal cell line (Caco-2) and a single pass perfusion model in rats: comparison with rapamycin., *Pharm. Res.* 15 (1998) 1666–1672.
- [145] J.J. Zimmerman, Exposure-response relationships and drug interactions of sirolimus., *AAPS J.* 6 (2004) e28–12.
- [146] D.R. Kuypers, K. Claes, P. Evenepoel, B. Maes, S. Vandecasteele, Y. Vanrenterghem, B. Van Damme, K. Desmet, Drug interaction between itraconazole and sirolimus in a primary renal allograft recipient., *Transplantation.* 79 (2005) 737.
- [147] J.M. Kovarik, C.H. Hsu, L. McMahon, S. Berthier, C. Rordorf, Population pharmacokinetics of everolimus in de novo renal transplant patients: impact of ethnicity and comedication., *Clin. Pharmacol. Ther.* 70 (2001) 247–254.
- [148] B. Sádaba, M.A. Campanero, E.G. Quetglas, J.R. Azanza, Clinical relevance of sirolimus drug interactions in transplant patients., *Transplant. Proc.* 36 (2004) 3226–3228.
- [149] J.C. Masters, M.M. Shah, A.A. Feist, Drug Interaction between Sirolimus and Ranolazine in a Kidney Transplant Patient., *Case Rep. Transplant.* 2014 (2014) 548243–4.
- [150] A.C. Allison, Mechanisms of action of mycophenolate mofetil., *Lupus.* 14 Suppl 1 (2005) s2–8.
- [151] V. Lamba, K. Sangkuhl, K. Sanghavi, A. Fish, R.B. Altman, T.E. Klein, PharmGKB summary: mycophenolic acid pathway., *Pharmacogenet. Genomics.* 24 (2014) 73–79.
- [152] T.L. Steck, R.S. Weinstein, J.H. Straus, D.F. Wallach, Inside-out red cell membrane vesicles: preparation and purification., *Science.* 168 (1970) 255–257.
- [153] T.L. Steck, J.A. Kant, Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes., *Methods Enzymol.* 31 (1974) 172–180.
- [154] E.L. Volk, E. Schneider, Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter., *Cancer Res.* 63 (2003) 5538–5543.
- [155] D.W. Loe, K.C. Almquist, R.G. Deeley, S.P. Cole, Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 9675–9682.
- [156] B. Sarkadi, E.M. Price, R.C. Boucher, U.A. Germann, G.A. Scarborough, Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 4854–4858.
- [157] B. Stieger, K. Fattinger, J. Madon, G.A. Kullak-Ublick, P.J. Meier, Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat

- liver., *Gastroenterology*. 118 (2000) 422–430.
- [158] K. Szabó, E. Welker, Bakos, M. Müller, I. Roninson, A. Váradi, B. Sarkadi, Drug-stimulated nucleotide trapping in the human multidrug transporter MDR1. Cooperation of the nucleotide binding domains., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 10132–10138.
- [159] A. Bodo, E. Bakos, F. Szeri, A. Váradi, B. Sarkadi, Differential modulation of the human liver conjugate transporters MRP2 and MRP3 by bile acids and organic anions., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23529–23537.
- [160] P.J. Meier, E.S. Sztul, A. Reuben, J.L. Boyer, Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver., *J. Cell Biol.* 98 (1984) 991–1000.
- [161] U.A. Germann, T.C. Chambers, S.V. Ambudkar, T. Licht, C.O. Cardarelli, I. Pastan, M.M. Gottesman, Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 1708–1716.
- [162] A. Pál, D. Méhn, E. Molnár, S. Gedey, P. Mészáros, T. Nagy, H. Glavinas, T. Janáky, O. von Richter, G. Báthori, L. Szente, P. Krajcsi, Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: improved in vitro model to study function of human ABCG2., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321 (2007) 1085–1094.
- [163] H. Glavinas, D. Méhn, M. Jani, B. Oosterhuis, K. Herédi-Szabó, P. Krajcsi, Utilization of membrane vesicle preparations to study drug-ABC transporter interactions., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4 (2008) 721–732.
- [164] T. Kondo, G.L. Dale, E. Beutler, Simple and rapid purification of inside-out vesicles from human erythrocytes., *Biochim. Biophys. Acta.* 602 (1980) 127–130.
- [165] S. Ruetz, M. Raymond, P. Gros, Functional expression of P-glycoprotein encoded by the mouse *mdr3* gene in yeast cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 11588–11592.
- [166] E. Bakos, R. Evers, E. Sinkó, A. Váradi, P. Borst, B. Sarkadi, Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions., *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 760–768.
- [167] A. Lespine, J. Dupuy, S. Orłowski, T. Nagy, H. Glavinas, P. Krajcsi, M. Alvinerie, Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3)., *Chem. Biol. Interact.* 159 (2006) 169–179.
- [168] G. Williamson, I. Aeberli, L. Miguët, Z. Zhang, M.-B. Sanchez, V. Crespy, D. Barron, P. Needs, P.A. Kroon, H. Glavinas, P. Krajcsi, M. Grigorov, Interaction of positional isomers of quercetin glucuronides with the transporter ABCC2 (cMOAT, MRP2)., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 35 (2007) 1262–1268.
- [169] C.A. Doige, F.J. Sharom, Transport properties of P-glycoprotein in plasma membrane vesicles from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells., *Biochim. Biophys. Acta.* 1109 (1992) 161–171.
- [170] S.J. Currier, K. Ueda, M.C. Willingham, I. Pastan, M.M. Gottesman, Deletion and insertion mutants of the multidrug transporter., *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 14376–14381.
- [171] H.J. Broxterman, H.M. Pinedo, C.M. Kuiper, L.C. Kaptein, G.J. Schuurhuis, J. Lankelma, Induction by verapamil of a rapid increase in ATP consumption in multidrug-resistant tumor cells., *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2 (1988) 2278–2282.
- [172] T. Litman, D. Nielsen, T. Skovsgaard, T. Zeuthen, W.D. Stein, ATPase activity of P-glycoprotein related to emergence of drug resistance in Ehrlich ascites tumor cell lines., *Biochim. Biophys. Acta.* 1361 (1997) 147–158.
- [173] E. Buxbaum, Co-operative binding sites for transported substrates in the multiple drug resistance transporter *Mdr1*., *Eur. J. Biochem.* 265 (1999) 64–70.
- [174] M.K. Al-Shawi, M.K. Polar, H. Omote, R.A. Figler, Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 52629–52640.
- [175] Y. Shirasaka, Y. Onishi, A. Sakurai, H. Nakagawa, T. Ishikawa, S. Yamashita, Evaluation of human P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) ATPase activity assay method by comparing with in vitro transport measurements: Michaelis-Menten kinetic analysis to estimate the affinity of P-glycoprotein to drugs., *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 2465–2471.
- [176] H. Goldberg, V. Ling, P.Y. Wong, K. Skorecki, Reduced cyclosporin accumulation in

- multidrug-resistant cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152 (1988) 552–558.
- [177] E. Bakos, R. Evers, G. Szakács, G.E. Tusnády, E. Welker, K. Szabó, M. de Haas, L. van Deemter, P. Borst, A. Váradi, B. Sarkadi, Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32167–32175.
- [178] H. Zeng, G. Liu, P.A. Rea, G.D. Kruh, Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3., *Cancer Res.* 60 (2000) 4779–4784.
- [179] F.J. Sharom, X. Yu, P. Lu, R. Liu, J.W. Chu, K. Szabó, M. Müller, C.D. Hose, A. Monks, A. Váradi, J. Seprödi, B. Sarkadi, Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells., *Biochem. Pharmacol.* 58 (1999) 571–586.
- [180] N. Zelcer, M.T. Huisman, G. Reid, P. Wielinga, P. Breedveld, A. Kuil, P. Knipscheer, J.H.M. Schellens, A.H. Schinkel, P. Borst, Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2)., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23538–23544.
- [181] B. Stieger, B. O'Neill, P.J. Meier, ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles., *Biochem. J.* 284 (Pt 1) (1992) 67–74.
- [182] S.S. Strautnieks, L.N. Bull, A.S. Knisely, S.A. Kocoshis, N. Dahl, H. Arnell, E. Sokal, K. Dahan, S. Childs, V. Ling, M.S. Tanner, A.F. Kagalwalla, A. Németh, J. Pawlowska, A. Baker, G. Mieli-Vergani, N.B. Freimer, R.M. Gardiner, R.J. Thompson, A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis., *Nat. Genet.* 20 (1998) 233–238.
- [183] W. Zhang, J. Li, S.M. Allen, E.A. Weiskircher, Y. Huang, R.A. George, R.G. Fong, A. Owen, I.J. Hidalgo, Silencing the breast cancer resistance protein expression and function in caco-2 cells using lentiviral vector-based short hairpin RNA., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37 (2009) 737–744.
- [184] D. Keppler, Uptake and efflux transporters for conjugates in human hepatocytes., *Methods Enzymol.* 400 (2005) 531–542.
- [185] B. Feng, J.B. Mills, R.E. Davidson, R.J. Mireles, J.S. Janiszewski, M.D. Troutman, S.M. de Moraes, In vitro P-glycoprotein assays to predict the in vivo interactions of P-glycoprotein with drugs in the central nervous system., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 36 (2008) 268–275.
- [186] C. Gui, A. Obaidat, R. Chaguturu, B. Hagenbuch, Development of a cell-based high-throughput assay to screen for inhibitors of organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3., *Curr. Chem. Genomics.* 4 (2010) 1–8.
- [187] M. Gameiro, R. Silva, C. Rocha-Pereira, H. Carmo, F. Carvalho, M. de L. Bastos, F. Remião, Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP., *Mol. Basel Switz.* 22 (2017) 600.
- [188] M. Hirouchi, H. Kusuhara, R. Onuki, B.W. Ogilvie, A. Parkinson, Y. Sugiyama, Construction of triple-transfected cells [organic anion-transporting polypeptide (OATP) 1B1/multidrug resistance-associated protein (MRP) 2/MRP3 and OATP1B1/MRP2/MRP4] for analysis of the sinusoidal function of MRP3 and MRP4, *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37 (2009) 2103–2111. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.027193>.
- [189] Y. Chen, X. Yuan, Z. Xiao, H. Jin, L. Zhang, Z. Liu, Discovery of novel multidrug resistance protein 4 (MRP4) inhibitors as active agents reducing resistance to anticancer drug 6-Mercaptopurine (6-MP) by structure and ligand-based virtual screening, *PloS One.* 13 (2018) e0205175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205175>.
- [190] W. Jäger, E. Gehring, B. Hagenauer, S. Aust, A. Senderowicz, T. Thalhammer, Biliary excretion of flavopiridol and its glucuronides in the isolated perfused rat liver: role of multidrug resistance protein 2 (Mrp2)., *Life Sci.* 73 (2003) 2841–2854.
- [191] R. Mallants, K. Van Oosterwyck, L. Van Vaeck, R. Mols, E. De Clercq, P. Augustijns, Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) affects hepatobiliary elimination but not the intestinal disposition of tenofovir disoproxil fumarate and its metabolites., *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 35 (2005) 1055–1066.
- [192] X. Tian, J. Li, M.J. Zamek-Gliszczynski, A.S. Bridges, P. Zhang, N.J. Patel, T.J. Raub, G.M. Pollack, K.L.R. Brouwer, Roles of P-glycoprotein, Bcrp, and Mrp2 in biliary excretion of

- spiramycin in mice., *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 3230–3234.
- [193] Y.Y. Lau, C.-Y. Wu, H. Okochi, L.Z. Benet, Ex situ inhibition of hepatic uptake and efflux significantly changes metabolism: hepatic enzyme-transporter interplay., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308 (2004) 1040–1045.
- [194] R. Hori, N. Okamura, T. Aiba, Y. Tanigawara, Role of P-glycoprotein in renal tubular secretion of digoxin in the isolated perfused rat kidney, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266 (1993) 1620–1625.
- [195] A. Rostami-Hodjegan, Physiologically based pharmacokinetics joined with in vitro-in vivo extrapolation of ADME: a marriage under the arch of systems pharmacology., *Clin. Pharmacol. Ther.* 92 (2012) 50–61.
- [196] N. Scheer, C.R. Wolf, Genetically humanized mouse models of drug metabolizing enzymes and transporters and their applications., *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 44 (2014) 96–108.
- [197] J.D. Allen, S.C. Van Dort, M. Buitelaar, O. van Tellingen, A.H. Schinkel, Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein., *Cancer Res.* 63 (2003) 1339–1344.
- [198] S. Eyal, B. Ke, M. Muzi, J.M. Link, D.A. Mankoff, A.C. Collier, J.D. Unadkat, Regional P-glycoprotein activity and inhibition at the human blood-brain barrier as imaged by positron emission tomography., *Clin. Pharmacol. Ther.* 87 (2010) 579–585.
- [199] L. Sasongko, J.M. Link, M. Muzi, D.A. Mankoff, X. Yang, A.C. Collier, S.C. Shoner, J.D. Unadkat, Imaging P-glycoprotein transport activity at the human blood-brain barrier with positron emission tomography., *Clin. Pharmacol. Ther.* 77 (2005) 503–514.
- [200] M. Muzi, D.A. Mankoff, J.M. Link, S. Shoner, A.C. Collier, L. Sasongko, J.D. Unadkat, Imaging of cyclosporine inhibition of P-glycoprotein activity using ¹¹C-verapamil in the brain: studies of healthy humans., *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 50 (2009) 1267–1275.
- [201] N.H. Hendrikse, W. Vaalburg, Dynamics of multidrug resistance: P-glycoprotein analyses with positron emission tomography., *Methods San Diego Calif.* 27 (2002) 228–233.
- [202] J.H. Lin, M. Yamazaki, Clinical relevance of P-glycoprotein in drug therapy., *Drug Metab. Rev.* 35 (2003) 417–454.
- [203] C.J. Endres, P. Hsiao, F.S. Chung, J.D. Unadkat, The role of transporters in drug interactions., *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 27 (2006) 501–517.
- [204] G.R. Lankas, M.E. Cartwright, D. Umbenhauer, P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143 (1997) 357–365.
- [205] J.-I. Han, H.-W. Son, S.-C. Park, K.-J. Na, Novel insertion mutation of ABCB1 gene in an ivermectin-sensitive Border Collie, *J. Vet. Sci.* 11 (2010) 341–344.
<https://doi.org/10.4142/jvs.2010.11.4.341>.
- [206] P.L. Jansen, W.H. Peters, W.H. Lamers, Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transport., *Hepatology* 5 (1985) 573–579.
- [207] H. Kurisu, K. Kamisaka, T. Koyo, S. Yamasuge, H. Igarashi, H. Maezawa, T. Uesugi, O. Tagaya, Organic anion transport study in mutant rats with autosomal recessive conjugated hyperbilirubinemia., *Life Sci.* 49 (1991) 1003–1011.
- [208] A.H. Schinkel, J.J. Smit, O. van Tellingen, J.H. Beijnen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C.A. Mol, M.A. van der Valk, E.C. Robanus-Maandag, H.P. te Riele, Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs., *Cell.* 77 (1994) 491–502.
- [209] M.G. Belinsky, P.A. Dawson, I. Shchaveleva, L.J. Bain, R. Wang, V. Ling, Z.-S. Chen, A. Grinberg, H. Westphal, A. Klein-Szanto, A. Lerro, G.D. Kruh, Analysis of the in vivo functions of Mrp3., *Mol. Pharmacol.* 68 (2005) 160–168.
- [210] M. Leggas, M. Adachi, G.L. Scheffer, D. Sun, P. Wielinga, G. Du, K.E. Mercer, Y. Zhuang, J.C. Panetta, B. Johnston, R.J. Scheper, C.F. Stewart, J.D. Schuetz, Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy., *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 7612–7621.

- [211] M.L.H. Vlaming, K. Mohrmann, E. Wagenaar, D.R. de Waart, R.P.J.O. Elferink, J.S. Lagas, O. van Tellingen, L.D. Vainchtein, H. Rosing, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, A.H. Schinkel, Carcinogen and anticancer drug transport by Mrp2 in vivo: studies using Mrp2 (Abcc2) knockout mice., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318 (2006) 319–327.
- [212] J. Wijnholds, R. Evers, M.R. van Leusden, C.A. Mol, G.J. Zaman, U. Mayer, J.H. Beijnen, M. van der Valk, P. Krimpenfort, P. Borst, Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein., *Nat. Med.* 3 (1997) 1275–1279.
- [213] J.W. Jonker, E. Wagenaar, C.A. Mol, M. Buitelaar, H. Koepsell, J.W. Smit, A.H. Schinkel, Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1 [Slc22a1]) gene., *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 5471–5477.
- [214] J.W. Jonker, E. Wagenaar, S. Van Eijl, A.H. Schinkel, Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations., *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 7902–7908.
- [215] J. Geyer, O. Gavrilova, E. Petzinger, Brain penetration of ivermectin and selamectin in mdr1a,b P-glycoprotein- and bcrp- deficient knockout mice., *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 32 (2009) 87–96.
- [216] H. Zaher, A.A. Khan, J. Palandra, T.G. Brayman, L. Yu, J.A. Ware, Breast cancer resistance protein (Bcrp/abcg2) is a major determinant of sulfasalazine absorption and elimination in the mouse., *Mol. Pharm.* 3 (2006) 55–61.
- [217] M.L.H. Vlaming, S.F. Teunissen, E. van de Steeg, A. van Esch, E. Wagenaar, L. Brunsveld, T.F.A. de Greef, H. Rosing, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, A.H. Schinkel, Bcrp1;Mdr1a/b;Mrp2 combination knockout mice: altered disposition of the dietary carcinogen PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine) and its genotoxic metabolites., *Mol. Pharmacol.* 85 (2014) 520–530.
- [218] M.G. Belinsky, P. Guo, K. Lee, F. Zhou, E. Kotova, A. Grinberg, H. Westphal, I. Shchavaleva, A. Klein-Szanto, J.M. Gallo, G.D. Kruh, Multidrug resistance protein 4 protects bone marrow, thymus, spleen, and intestine from nucleotide analogue-induced damage, *Cancer Res.* 67 (2007) 262–268. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2680>.
- [219] X. Chu, K. Bleasby, R. Evers, Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 9 (2013) 237–252.
- [220] J.H. Lin, Species similarities and differences in pharmacokinetics., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 23 (1995) 1008–1021.
- [221] M. Martignoni, G.M.M. Groothuis, R. de Kanter, Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2 (2006) 875–894.
- [222] E. van de Steeg, C.M.M. van der Kruijssen, E. Wagenaar, J.E.C. Burggraaff, E. Mesman, K.E. Kenworthy, A.H. Schinkel, Methotrexate pharmacokinetics in transgenic mice with liver-specific expression of human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (SLCO1B1)., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37 (2009) 277–281.
- [223] E. van de Steeg, V. Stránecký, H. Hartmannová, L. Nosková, M. Hřebíček, E. Wagenaar, A. van Esch, D.R. de Waart, R.P.J. Oude Elferink, K.E. Kenworthy, E. Sticová, M. al-Edreesi, A.S. Knisely, S. Kmoch, M. Jirsa, A.H. Schinkel, Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver., *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 519–528.
- [224] E. van de Steeg, A. van Esch, E. Wagenaar, K.E. Kenworthy, A.H. Schinkel, Influence of human OATP1B1, OATP1B3, and OATP1A2 on the pharmacokinetics of methotrexate and paclitaxel in humanized transgenic mice., *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19 (2013) 821–832.
- [225] L. Salphati, X. Chu, L. Chen, B. Prasad, S. Dallas, R. Evers, D. Mamaril-Fishman, E.G. Geier, J. Kehler, J. Kunta, M. Mezler, L. Laplanche, J. Pang, A. Rode, M.G. Soars, J.D. Unadkat, R.A.B. van Waterschoot, J. Yabut, A.H. Schinkel, N. Scheer, Evaluation of organic anion transporting polypeptide 1B1 and 1B3 humanized mice as a translational model to

- study the pharmacokinetics of statins., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 42 (2014) 1301–1313.
- [226] M.W. Sadiq, Y. Uchida, Y. Hoshi, M. Tachikawa, T. Terasaki, M. Hammarlund-Udenaes, Validation of a P-Glycoprotein (P-gp) Humanized Mouse Model by Integrating Selective Absolute Quantification of Human MDR1, Mouse Mdr1a and Mdr1b Protein Expressions with In Vivo Functional Analysis for Blood-Brain Barrier Transport., *PLoS One.* 10 (2015) e0118638.
- [227] N. Scheer, P. Balimane, M.D. Hayward, S. Buechel, G. Kauselmann, C.R. Wolf, Generation and characterization of a novel multidrug resistance protein 2 humanized mouse line., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 40 (2012) 2212–2218.
- [228] S. Dallas, L. Salphati, D. Gomez-Zepeda, T. Wanek, L. Chen, X. Chu, J. Kunta, M. Mezler, M.-C. Menet, S. Chasseigneaux, X. Declèves, O. Langer, E. Pierre, K. DiLoreto, C. Hoff, L. Laplanche, J. Pang, T. Pereira, C. Andonian, D. Simic, A. Rode, J. Yabut, X. Zhang, N. Scheer, Generation and Characterization of a Breast Cancer Resistance Protein Humanized Mouse Model., *Mol. Pharmacol.* 89 (2016) 492–504.
- [229] J.W. Higgins, J.Q. Bao, A.B. Ke, J.R. Manro, J.K. Fallon, P.C. Smith, M.J. Zamek-Gliszczynski, Utility of Oatp1a/1b-knockout and OATP1B1/3-humanized mice in the study of OATP-mediated pharmacokinetics and tissue distribution: case studies with pravastatin, atorvastatin, simvastatin, and carboxydichlorofluorescein., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 42 (2014) 182–192.
- [230] R. Silva, V. Vilas-Boas, H. Carmo, R.J. Dinis-Oliveira, F. Carvalho, M. de Lourdes Bastos, F. Remião, Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy., *Pharmacol. Ther.* 149 (2015) 1–123.
- [231] D.B. Kitchen, H. Decornez, J.R. Furr, J. Bajorath, Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications., *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 935–949.
- [232] R.J. Kavlock, G. Ankley, J. Blancato, M. Breen, R. Conolly, D. Dix, K. Houck, E. Hubal, R. Judson, J. Rabinowitz, A. Richard, R.W. Setzer, I. Shah, D. Villeneuve, E. Weber, Computational toxicology—a state of the science mini review., *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 103 (2008) 14–27.
- [233] G. Sliwoski, S. Kothiwale, J. Meiler, E.W. Lowe, Computational methods in drug discovery., *Pharmacol. Rev.* 66 (2014) 334–395.
- [234] Y.Z. Chen, D.G. Zhi, Ligand-protein inverse docking and its potential use in the computer search of protein targets of a small molecule., *Proteins.* 43 (2001) 217–226.
- [235] M.F. Festing, Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments., *Lab. Anim.* 28 (1994) 212–221.
- [236] T. Hou, X. Xu, Recent development and application of virtual screening in drug discovery: an overview., *Curr. Pharm. Des.* 10 (2004) 1011–1033.
- [237] R. Abagyan, M. Totrov, High-throughput docking for lead generation., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 375–382.
- [238] V. Vilas-Boas, R. Silva, A. Palmeira, E. Sousa, L.M. Ferreira, P.S. Branco, F. Carvalho, M. de L. Bastos, F. Remião, Development of novel rifampicin-derived P-glycoprotein activators/inducers. synthesis, in silico analysis and application in the RBE4 cell model, using paraquat as substrate., *PLoS One.* 8 (2013) e74425.
- [239] R. Silva, E. Sousa, H. Carmo, A. Palmeira, D.J. Barbosa, M. Gameiro, M. Pinto, M. de L. Bastos, F. Remião, Induction and activation of P-glycoprotein by dihydroxylated xanthenes protect against the cytotoxicity of the P-glycoprotein substrate paraquat., *Arch. Toxicol.* 88 (2014) 937–951.
- [240] R. Silva, A. Palmeira, H. Carmo, D.J. Barbosa, M. Gameiro, A. Gomes, A.M. Paiva, E. Sousa, M. Pinto, M. de L. Bastos, F. Remião, P-glycoprotein induction in Caco-2 cells by newly synthesized thioxanthenes prevents paraquat cytotoxicity., *Arch. Toxicol.* 89 (2015) 1783–1800.
- [241] R. Silva, H. Carmo, V. Vilas-Boas, D.J. Barbosa, A. Palmeira, E. Sousa, F. Carvalho, M. de L. Bastos, F. Remião, Colchicine effect on P-glycoprotein expression and activity: in silico and in vitro studies., *Chem. Biol. Interact.* 218 (2014) 50–62.

- [242] Y.-K. Zhang, X.-Y. Zhang, G.-N. Zhang, Y.-J. Wang, H. Xu, D. Zhang, S. Shukla, L. Liu, D.-H. Yang, S.V. Ambudkar, Z.-S. Chen, Selective reversal of BCRP-mediated MDR by VEGFR-2 inhibitor ZM323881., *Biochem. Pharmacol.* 132 (2017) 29–37.
- [243] L. László, B. Sarkadi, T. Hegedüs, Jump into a New Fold-A Homology Based Model for the ABCG2/BCRP Multidrug Transporter., *PLoS One.* 11 (2016) e0164426.
- [244] T. Shafi, I. Jabeen, Grid-independent Descriptors (GRIND) Analysis and SAR Guided Molecular Docking Studies to Probe Selectivity Profiles of Inhibitors of Multidrug Resistance Transporters ABCB1 and ABCG2., *Curr. Cancer Drug Targets.* 17 (2017) 177–190.
- [245] J.-G. Qiu, Y.-J. Zhang, Y. Li, J.-M. Zhao, W.-J. Zhang, Q.-W. Jiang, X.-L. Mei, Y.-Q. Xue, W.-M. Qin, Y. Yang, D.-W. Zheng, Y. Chen, M.-N. Wei, Z. Shi, Trametinib modulates cancer multidrug resistance by targeting ABCB1 transporter., *Oncotarget.* 6 (2015) 15494–15509.
- [246] S. Sreenivasan, S. Ravichandran, U. Vetrivel, S. Krishnakumar, In vitro and In silico studies on inhibitory effects of curcumin on multi drug resistance associated protein (MRP1) in retinoblastoma cells., *Bioinformation.* 8 (2012) 13–19.
- [247] N. Picard, The pharmacokinetic interaction between mycophenolic acid and cyclosporine revisited: a commentary on “Mycophenolic acid glucuronide is transported by multidrug resistance-associated protein 2 and this transport is not inhibited by cyclosporine, tacrolimus or sirolimus”., *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 43 (2013) 836–838.
- [248] G. Filler, N. Lepage, B. Delisle, I. Mai, Effect of cyclosporine on mycophenolic acid area under the concentration-time curve in pediatric kidney transplant recipients., *Ther. Drug Monit.* 23 (2001) 514–519.
- [249] T. van Gelder, J. Klupp, M.J. Barten, U. Christians, R.E. Morris, Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid., *Ther. Drug Monit.* 23 (2001) 119–128.
- [250] I.S. Westley, L.R. Brogan, R.G. Morris, A.M. Evans, B.C. Sallustio, Role of Mrp2 in the hepatic disposition of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites: effect of cyclosporine., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 34 (2006) 261–266.
- [251] D.A. Hesselink, R.M. van Hest, R.A.A. Mathot, F. Bonthuis, W. Weimar, R.W.F. de Bruin, T. van Gelder, Cyclosporine interacts with mycophenolic acid by inhibiting the multidrug resistance-associated protein 2., *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5 (2005) 987–994.
- [252] Y. Shitara, K. Takeuchi, Y. Nagamatsu, S. Wada, Y. Sugiyama, T. Horie, Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake., *Drug Metab. Pharmacokinet.* 27 (2012) 368–378.
- [253] N. Picard, S.W. Yee, J.-B. Woillard, Y. Lebranchu, Y. Le Meur, K.M. Giacomini, P. Marquet, The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics., *Clin. Pharmacol. Ther.* 87 (2010) 100–108.
- [254] M. Shipkova, V.W. Armstrong, D. Kuypers, F. Perner, V. Fabrizi, H. Holzer, E. Wieland, M. Oellerich, MMF Creeping Creatinine Study Group, Effect of cyclosporine withdrawal on mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplant recipients with deteriorating renal function: preliminary report., *Ther. Drug Monit.* 23 (2001) 717–721.
- [255] C.G. Patel, K. Ogasawara, F. Akhlaghi, Mycophenolic acid glucuronide is transported by multidrug resistance-associated protein 2 and this transport is not inhibited by cyclosporine, tacrolimus or sirolimus., *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 43 (2013) 229–235.
- [256] N. Picard, K. Rouguieg-Malki, N. Kamar, L. Rostaing, P. Marquet, CYP3A5 genotype does not influence everolimus in vitro metabolism and clinical pharmacokinetics in renal transplant recipients., *Transplantation.* 91 (2011) 652–656.
- [257] A.A.K. El-Sheikh, J.B. Koenderink, A.C. Wouterse, P.H.H. van den Broek, V.G.M. Verweij, R. Masereeuw, F.G.M. Russel, Renal glucuronidation and multidrug resistance protein 2-/ multidrug resistance protein 4-mediated efflux of mycophenolic acid: interaction with cyclosporine and tacrolimus., *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 164 (2014) 46–56.
- [258] G.J. Burckart, R. Venkataramanan, R.J. Ptachcinski, T.E. Starzl, B.P. Griffith, T.R. Hakala, J.T. Rosenthal, R.L. Hardesty, S. Iwatsuki, J. Brady, Cyclosporine pharmacokinetic

- profiles in liver, heart, and kidney transplant patients as determined by high-performance liquid chromatography., *Transplant. Proc.* 18 (1986) 129–136.
- [259] Y. Uwai, H. Motohashi, Y. Tsuji, H. Ueo, T. Katsura, K. Inui, Interaction and transport characteristics of mycophenolic acid and its glucuronide via human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3., *Biochem. Pharmacol.* 74 (2007) 161–168.
- [260] N.A. Wolff, B.C. Burckhardt, G. Burckhardt, M. Oellerich, V.W. Armstrong, Mycophenolic acid (MPA) and its glucuronide metabolites interact with transport systems responsible for excretion of organic anions in the basolateral membrane of the human kidney., *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 22 (2007) 2497–2503.
- [261] H. Kreis, J.M. Cisterne, W. Land, L. Wramner, J.P. Squifflet, D. Abramowicz, J.M. Campistol, J.M. Morales, J.M. Grinyo, G. Mourad, F.C. Berthou, C. Brattström, Y. Lebranchu, P. Vialtel, Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients., *Transplantation.* 69 (2000) 1252–1260.
- [262] W. El Haggan, M. Ficheux, D. Debruyne, N. Rognant, T. Lobbedez, C. Allard, A. Coquerel, J.P. Ryckelynck, B. Hurault de Ligny, Pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplant patients receiving sirolimus versus cyclosporine., *Transplant. Proc.* 37 (2005) 864–866.
- [263] M. Büchler, Y. Lebranchu, M. Bénétou, Y. Le Meur, A.E. Heng, P.F. Westeel, C. le Guellec, F. Libert, L. Hary, P. Marquet, G. Paintaud, Higher exposure to mycophenolic acid with sirolimus than with cyclosporine cotreatment., *Clin. Pharmacol. Ther.* 78 (2005) 34–42.
- [264] D. Cattaneo, S. Merlini, S. Zenoni, S. Baldelli, E. Gotti, G. Remuzzi, N. Perico, Influence of co-medication with sirolimus or cyclosporine on mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplantation., *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5 (2005) 2937–2944.
- [265] N. Picard, A. Prémaud, A. Rousseau, Y. Le Meur, P. Marquet, A comparison of the effect of ciclosporin and sirolimus on the pharmacokinetics of mycophenolate in renal transplant patients., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 62 (2006) 477–484.
- [266] A. Noreikaitė, F. Saint-Marcoux, P. Marquet, E. Kaduševičius, E. Stankevičius, Influence of cyclosporine and everolimus on the main mycophenolate mofetil pharmacokinetic parameters: Cross-sectional study., *Medicine (Baltimore).* 96 (2017) e6469.
- [267] T. Farasyn, A. Crowe, O. Hatley, S. Neuhoff, K. Alam, J. Kanyo, T.T. Lam, K. Ding, W. Yue, Preincubation With Everolimus and Sirolimus Reduces Organic Anion-Transporting Polypeptide (OATP)1B1- and 1B3-Mediated Transport Independently of mTOR Kinase Inhibition: Implication in Assessing OATP1B1- and OATP1B3-Mediated Drug-Drug Interactions., *J. Pharm. Sci.* 108 (2019) 3443–3456.
- [268] T. Fukuda, H.I. Brunner, A.C.P. Sagcal-Gironella, A.A. Vinks, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may reduce enterohepatic recirculation of mycophenolic acid in patients with childhood-onset systemic lupus erythematosus., *Ther. Drug Monit.* 33 (2011) 658–662.
- [269] N.M. Davies, J. Grinyó, R. Heading, B. Maes, H.-U. Meier-Kriesche, M. Oellerich, Gastrointestinal side effects of mycophenolic acid in renal transplant patients: a reappraisal., *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 22 (2007) 2440–2448.
- [270] W. Arns, Noninfectious gastrointestinal (GI) complications of mycophenolic acid therapy: a consequence of local GI toxicity?, *Transplant. Proc.* 39 (2007) 88–93.
- [271] M. Shipkova, V.W. Armstrong, L. Weber, P.D. Niedmann, E. Wieland, J. Haley, B. Tönshoff, M. Oellerich, German Study Group on Mycophenolate Mofetil Therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients, Pharmacokinetics and protein adduct formation of the pharmacologically active acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients., *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 390–399.
- [272] M. Shipkova, H. Beck, A. Voland, V.W. Armstrong, H.-J. Gröne, M. Oellerich, E. Wieland, Identification of protein targets for mycophenolic acid acyl glucuronide in rat liver and colon tissue., *Proteomics.* 4 (2004) 2728–2738.
- [273] E. Wieland, M. Shipkova, U. Schellhaas, E. Schütz, P.D. Niedmann, V.W. Armstrong,

- M. Oellerich, Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: a link to side effects?, *Clin. Biochem.* 33 (2000) 107–113.
- [274] N. Sabolovic, J.-M. Heydel, X. Li, J.M. Little, A.-C. Humbert, A. Radomska-Pandya, J. Magdalou, Carboxyl nonsteroidal anti-inflammatory drugs are efficiently glucuronidated by microsomes of the human gastrointestinal tract., *Biochim. Biophys. Acta.* 1675 (2004) 120–129.
- [275] N. Picard, D. Ratanasavanh, A. Prémaud, Y. Le Meur, P. Marquet, Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism., *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 33 (2005) 139–146.
- [276] D.W. WILSON, H.C. WILSON, Studies in vitro of the digestion and absorption of purine ribonucleotides by the intestine., *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1643–1647.
- [277] V. Harms, C.E. Stirling, Transport of purine nucleotides and nucleosides by in vitro rabbit ileum., *Am. J. Physiol.* 233 (1977) E47–55.
- [278] E. Scharrer, L. Stubenhofer, W. Tiemeyer, C. Bindl, Active pyrimidine absorption by chicken colon., *Comp. Biochem. Physiol. A.* 77 (1984) 85–88.
- [279] N. Kolassa, R. Stengg, K. Turnheim, Adenosine uptake by the isolated epithelium of guine pig jejunum., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55 (1977) 1033–1038.
- [280] A.H. Groll, A. Desai, D. Han, C. Howieson, K. Kato, S. Akhtar, D. Kowalski, C. Lademacher, W. Lewis, H. Pearlman, D. Mandarino, T. Yamazaki, R. Townsend, Pharmacokinetic Assessment of Drug-Drug Interactions of Isavuconazole With the Immunosuppressants Cyclosporine, Mycophenolic Acid, Prednisolone, Sirolimus, and Tacrolimus in Healthy Adults., *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 6 (2017) 76–85.
- [281] O.J. Naderer, R.E. Dupuis, E.L. Heinzen, K. Wiwattanawongsa, M.W. Johnson, P.C. Smith, The influence of norfloxacin and metronidazole on the disposition of mycophenolate mofetil., *J. Clin. Pharmacol.* 45 (2005) 219–226.
- [282] M. Naesens, D.R.J. Kuypers, F. Streit, V.W. Armstrong, M. Oellerich, K. Verbeke, Y. Vanrenterghem, Rifampin induces alterations in mycophenolic acid glucuronidation and elimination: implications for drug exposure in renal allograft recipients., *Clin. Pharmacol. Ther.* 80 (2006) 509–521.
- [283] J.M. Rae, M.D. Johnson, M.E. Lippman, D.A. Flockhart, Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299 (2001) 849–857.
- [284] M. Vietri, A. Pietrabissa, F. Mosca, G.M. Pacifici, Mycophenolic acid glucuronidation and its inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drugs in human liver and kidney., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56 (2000) 659–664.

Transport membranaire des médicaments utilisés en transplantation : étude du transporteur MRP4.

Les transporteurs membranaires sont des déterminants majeurs de la pharmacocinétique des médicaments, au même titre que les enzymes du métabolisme. Parmi eux, rares sont ceux dont les rôles dans l'organisme sont parfaitement définis. Pourtant, de multiples observations cliniques suggèrent que des transporteurs membranaires soient impliqués dans la survenue d'interactions médicamenteuses, et plus largement dans la survenue d'échecs aux traitements par inefficacité ou toxicité.

Dans ce contexte, nos travaux avaient pour objectif d'étudier le rôle des transporteurs membranaires dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs prescrits chez le patient transplanté. Il s'agit de médicaments à marge thérapeutique étroite, avec une cinétique très complexe, sujets à de très nombreuses interactions médicamenteuses, et pour lesquels il est connu que la P-gp, les transporteurs de la famille des OATP, ou encore le transporteur BCRP, jouent un rôle très important dans leur pharmacologie.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux relations entre le transporteur MRP4 et l'acide mycophénolique (MPA). Ces travaux ont fait appel au développement de modèles de transport vésiculaire (approche *in vitro*) et à de la modélisation moléculaire (approche *in silico*). Ils ont montré que l'acide mycophénolique β -D glucuronide (MPAG), métabolite majeur du MPA, est transporté par MRP4. Ce phénomène participe très certainement à la variabilité de l'exposition au MPA. Nous avons également mis en évidence que des médicaments fréquemment co-prescrits (anti-infectieux et anti-inflammatoires) peuvent inhiber ce transport. Cet exemple montre tout l'intérêt d'une exploration des mécanismes de transport par des études *in vitro* et *in silico* pour mieux comprendre et anticiper des interactions médicamenteuses.

Mots-clés : **MPA, MPAG, MRP4, Interactions médicamenteuses**

Membrane transport of drugs used in transplantation: study of the transporter MRP4

Membrane transporters are major determinants of the pharmacokinetics of drugs, in the same way as the enzymes of the metabolism. Among them, only a few have roles in the organism which are perfectly defined. However, numerous clinical observations suggest that membrane transporters are involved in the occurrence of drug-drug interactions, and more generally in the occurrence of treatment failures due to inefficiency or toxicity.

The aim of our work was to study the role of membrane transporters in the pharmacokinetics of immunosuppressants prescribed in transplanted patients. These are drugs with a narrow therapeutic index and very complex kinetic profiles. They are subject to numerous drug-drug interactions and it is known that the P-gp, the OATP family of transporters, or the BCRP transporter play an important role in their pharmacology.

We were particularly interested in the relationship between the MRP4 transporter and mycophenolic acid (MPA). For this, we developed vesicular transport models (*in vitro* approach) and molecular modelling (*in silico* approach). They showed that mycophenolic acid β -D glucuronide (MPAG), a major metabolite of MPA, is transported by MRP4. Obviously, this phenomenon contributes to the inter- and intra-individual variability in the exposure to MPA. This work also demonstrated that some frequently co-prescribed drugs (anti-infectious and anti-inflammatory drugs) can inhibit this transport.

This example illustrates the value of exploring transport mechanisms through *in vitro* and *in silico* studies to better understand and anticipate drug-drug interactions

Keywords: **MPA, MPAG, MRP4, Drug-drug interactions**

